

00322



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

215

FACULTAD DE CIENCIAS

"Identificación de los receptores para plasminógeno humano de *Mycobacterium tuberculosis*"

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:  
B I O L O G A  
P R E S E N T A:  
XOLALPA VILLANUEVA WENDY



DIVISION DE ESTUDIOS PROFESIONALES  
DIRECTORA DE TESIS  
DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN  
2003  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECRETARÍA ACADÉMICA

A



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**TESIS CON  
FALLA DE  
ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AGRICOLA DE MERIDA

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

**DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA**

Jefa de la División de Estudios Profesionales de la  
Facultad de Ciencias  
Presente

Comunicamos a Usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Identificación de los  
receptores para plasminógeno humano de Mycobacterium tuberculosis"  
realizado por Wendy Kololpa Villanueva con número de cuenta 9423035-2  
quién cubrió los créditos de la carrera de Biología  
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis

Propietario

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

Propietario

Dra. Annie Fardo Seno

Propietario

MVL. Jaime Campuzano Granados

Suplente

M. en C. Ma. De los Remedios Josefina Ramirez Rangel

Suplente

M. en IBB. Gustavo Jesus Ortega Lule

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA  
DE BIOLOGIA

B

**El presente trabajo se realizó bajo la dirección de la Dra. Clara Espitia del departamento de Inmunología en el Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México y con la colaboración del Grupo del Dr. Mahavir Singh del Centro Biotecnológico Alemán GBF Braunschweig de Alemania.**

**Trabajo de tesis apoyado por el proyecto CONACYT 33580M.**

## *Dedicatoria*

A mis padres Antonio Xolalpa y  
Silvia Villanueva por todo el amor que me  
han brindado y por su incansable apoyo.  
Gracias por todo lo que me han dado y  
por haberme enseñado el valor de la vida.

A mis hermanos Jessica y José  
Antonio quienes me han acompañado,  
apoyado y soportado en todo momento  
haciéndome más dichoso este caminar.

A Alejandro Martínez, por tu amor e  
incondicional apoyo que me han hecho  
resistir los malos momentos y disfrutar los  
buenos ayudándome a alcanzar este  
objetivo. Gracias.

## *Agradecimientos*

A la Dra. Clara Espitia por haberme dado la oportunidad de aprender en su grupo de trabajo, de realizar esta tesis, de conocer nuevos horizontes y de continuar en este camino.

A Angélica Amador a quien admiro y respeto, gracias a sus enseñanzas, dedicación y paciencia pude dar los primeros pasos y despertar este amor por la investigación.

A mis compañeros y amigos del laboratorio: Angélica Amador, Mariano Reyes, Rafael Cervantes, Jaime Campuzano, Javier Flores, Marco Santillán, Elizabeth Mendoza, Pedro Estévez, Ingrid Cohen, Cristina Parada, Antonio Vallecillo, Ma. Antonieta Mojica, Martha Lara, Edén y Fernando. Por sus observaciones y orientación en mi trabajo, pero lo más importante, por su invaluable amistad.

Al Dr. Mahavir Singh y a mis amigos de GBF en Braunschweig Alemania, Marcelo Comini, Timo Jagér, Helke Budde y Marlela Bolatl.

A mis tutores, Dra. Annie Pardo, M.V.Z. Jaime Campuzano, M. en C. Remedios Ramírez y M. en IBB. Gustavo Ortega. Por su tiempo y dedicación para la revisión de esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros de la Universidad, de la prepa, de la secundaria, de la primaria, del trabajo, de los Scouts y de muchos otros lugares.

A cada uno de mis familiares y a todos los que me han rodeado siempre.

A mis profesores que en cada paso de esta carrera han dejando huella en mi formación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por abrirme sus puertas y brindarme lo necesario para mi formación como bióloga.

Muchas Gracias!!!!!!

E

# Índice

	Página.
<b>I. Introducción.</b> .....	1
<b>1.1. Tuberculosis. Ayer y hoy.</b> .....	1
<b>Figura I.1.</b> .....	2
<b>1.2. Tuberculosis en México.</b> .....	2
<b>Figura I.2.</b> .....	3
<b>1.3. Tuberculosis. La enfermedad.</b> .....	3
<b>1.4. Tuberculosis. El agente causal.</b> .....	4
<b>1.5. <i>M. tuberculosis</i> y su interacción con el hospedero.</b> .....	5
<b>1.6. El sistema plasminógeno/plasmina.</b> .....	7
<b>Figura I.3.</b> .....	7
<b>Figura I.4.</b> .....	8
<b>1.6.1. Importancia de la plasmina unida a una superficie celular.</b> .....	9
<b>Tabla 1.</b> .....	10
<b>1.6.2. La plasmina y la matriz extracelular.</b> .....	10
<b>1.6.3. El papel de la interacción del plasminógeno con componentes bacterianos.</b> .....	11
<b>Tabla 2.</b> .....	12
<b>Figura I.5.</b> .....	13



II.	Hipótesis. ....	14
III.	Objetivo General. ....	14
III.1.	Objetivos Específicos. ....	14
IV.	Diseño Experimental. ....	15
V.	Materiales y Métodos. ....	16
V.1.	Obtención de diferentes fracciones de <i>M. tuberculosis</i> . ....	16
V.2.	Unión de las proteínas de la micobacteria a Plg por Westernblot. ....	16
V.3.	Inmunoblot. ....	16
V.4.	Inhibición de la unión de las proteínas micobacterinas a Plg. ....	17
V.5.	Análisis por 2D SDS-PAGE. ....	17
V.6.	Identificación de las proteínas por secuencia. ....	17
V.7.	Producción de proteínas recombinantes. ....	18
V.8.	Ensayos de unión a Plg con las proteínas recombinantes. ....	18
V.9.	Ensayos de activación de Plg. ....	19
VI.	Resultados. ....	20
VI.1.	Unión de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> a Plg. ....	20
Figura VI.1.	.....	20

<b>VI.2.</b>	<b>Análisis de las proteínas del ES que unen Plg por 2D SDS-PAGE e inmunoblot. ....</b>	<b>21</b>
	<b>Figura VI.2. ....</b>	<b>21</b>
<b>VI.3.</b>	<b>Identificación de las proteínas que unen Plg por análisis de secuencia. ....</b>	<b>22</b>
	<b>Figura VI.3. ....</b>	<b>23</b>
<b>VI.4.</b>	<b>Producción de proteínas recombinantes. ....</b>	<b>23</b>
	<b>Figura VI.4. ....</b>	<b>23</b>
<b>VI.5.</b>	<b>Unión de las proteínas recombinantes a Plg por Inmunoblot. ....</b>	<b>24</b>
	<b>Figura VI.5. ....</b>	<b>24</b>
<b>VI.6.</b>	<b>Unión de las proteínas recombinantes a Plg por ELISA. ....</b>	<b>25</b>
	<b>Figura VI.6. ....</b>	<b>25</b>
<b>VI.7.</b>	<b>Formación del complejo Plg-Hsp70. ....</b>	<b>26</b>
	<b>Figura VI.7. ....</b>	<b>26</b>
<b>VI.8.</b>	<b>Caracterización de la unión de Hsp70 a Plg. ....</b>	<b>27</b>
	<b>Figura VI.8. ....</b>	<b>27</b>
<b>VI.9.</b>	<b>Ensayos de Activación de Plg. ....</b>	<b>28</b>
	<b>Figura VI.9. ....</b>	<b>28</b>
	<b>Figura VI.10. ....</b>	<b>29</b>
<b>VII.</b>	<b>Discusión. ....</b>	<b>31</b>
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones. ....</b>	<b>33</b>

<b>IX.</b>	<b>Bibliografia. ....</b>	<b>34</b>
<b>X.</b>	<b>Anexo. ....</b>	<b>39</b>

# I. Introducción

## I.1. Tuberculosis. Ayer y hoy.

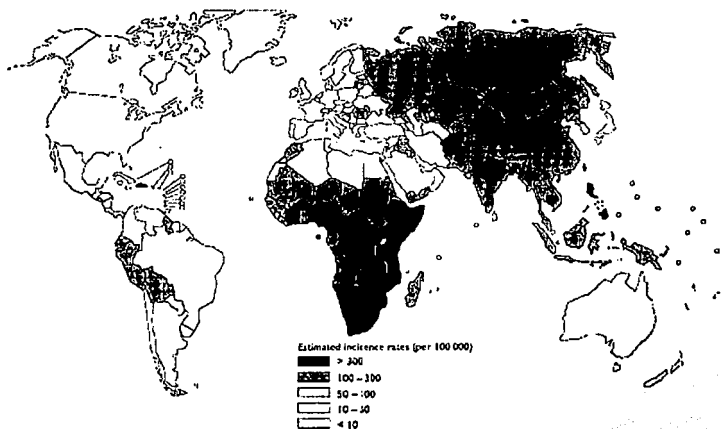
Sin duda, una de las enfermedades más antiguas que ha afectado a la humanidad desde hace más de 5000 años es la tuberculosis (Crubezy et.al., 1998). Enfermedad infecciosa que, a través de la desnutrición y las decadentes condiciones de vida, llegó a ser epidémica en la civilización occidental y una causa importante de mortalidad en el siglo XVIII y XIX, arrasando con una cuarta parte de la población de Europa en la primera mitad del siglo XIX (Bloom and Murray, 1992).

El término tuberculosis (TB) se acuñó cuando en el siglo XVII en Holanda, Franciscus de la Boe, conocido como el Dr. Silvius, describió y registró la patología exacta de la enfermedad al observar el cambio característico en los pulmones que asemejaban "tubérculos reales". Pero no fue sino hasta 1882, cuando el bacteriólogo alemán Robert Koch identificó que el agente causante era una bacteria de forma bacilar, a la cual posteriormente se le dio el nombre de *Mycobacterium tuberculosis* (Bloom B., 1994).

En la actualidad, a pesar de la vacunación con BCG (Bacillus Calmette-Guerin) y todas las drogas disponibles, la TB sigue siendo un problema en muchos países, cuya frecuencia además se ha incrementado con la incidencia del VIH (Virus de Inmunodeficiencia Humana) como factor de riesgo. Las incidencias más altas están en los países de los continentes: Africano, Asiático, y Americano (Bloom B., 1994), tal como se muestra en la Figura I.1.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que cada año 2 millones de personas mueren de TB y 8 millones se infectan con el bacilo, de estos últimos el 95% corresponde a personas que viven en países en vías de desarrollo. Asimismo se estima que entre el 2002 y el 2020, aproximadamente 1000 millones de personas estarán infectadas, más de 150 millones se enfermarán y 36 millones morirán de TB si su control no es consolidado. Por ello desde 1993, la OMS la ha declarado emergencia global (WHO Report 2002).

## Tuberculosis



**Figura I.1** Distribución de las tasas de incidencia de TB en el mundo en el año 2000, estimadas por la Organización Mundial de la Salud. (Tomado de WHO Report 2002).

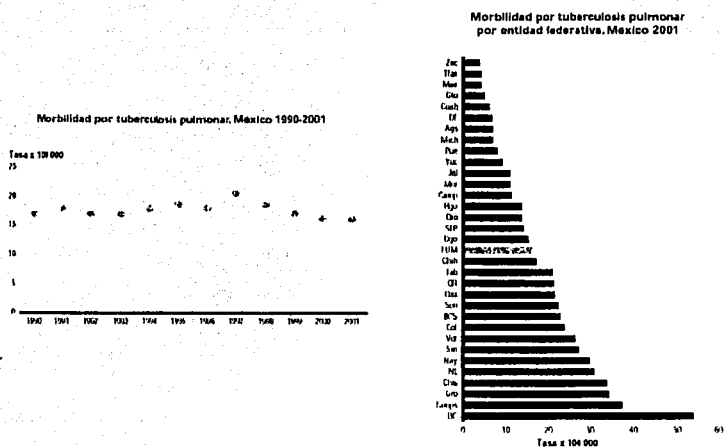
### I.2. Tuberculosis en México.

En México la incidencia de TB pulmonar es de 17.5 por cada 100,000 habitantes, siendo inferior al promedio latinoamericano que a mediados de los años noventa se ubicaba en 32 casos nuevos por cada 100,000 habitantes. Esta tasa se ha mantenido en México relativamente estable en los últimos años, sin embargo, las diferencias entre entidades federativas son considerables (Salud: México, 2001) como se puede ver en la Figura I.2. En 1996 se registró un promedio de 16,000 casos nuevos al año, de los cuales el 85% ocurrieron en mayores de 15 años. De los casos notificados en ese mismo año, el 81.7% correspondieron a tuberculosis pulmonar y el 18.3% a tuberculosis extrapulmonar (La Salud en las Americas, 1998).

Entre las causas generales de muerte, en México la TB ocupa el décimo lugar (Secretaría de Salud, 1993). La tasa de mortalidad reportada a nivel nacional en 1992 fue de 6 por cada 100,000 habitantes; según esta notificación 13.6% de estas muertes se debieron a TB extrapulmonar.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

En la actualidad, se estima que en México ocurren 6,000 defunciones al año a causa de la TB (Secretaría de Salud, 1993., Salud Publica de México, 1995).



**Figura 1.2.** Morbilidad por TB pulmonar en México. A la izquierda se representan las tasas de morbilidad de 1990 al 2001. A la derecha se muestran las tasas de morbilidad en el 2001 por entidad federativa. (Tomado de Salud: México, 2001).

### 1.3. Tuberculosis. La enfermedad.

La TB es una enfermedad crónica e infecciosa de fácil transmisión. Los individuos se infectan por inhalación del bacilo tuberculoso a través de las gotas que son desprendidas mediante estornudo, tos o de la simple charla con un paciente infectado. Después de ser inhalados, los bacilos no son atrapados en los conductos aéreos ni en las porciones ciliadas del árbol traqueobronquial sino que pasan directamente a los alvéolos; es entonces cuando se considera a la enfermedad como una tuberculosis primaria. Este tipo de tuberculosis puede progresar dependiendo de la susceptibilidad del huésped, (aproximadamente 10% de los casos) o bien sanar y mantener a los organismos inactivos (latentes, 90%). En este último caso, puede haber una reinfección exógena posterior o bien una reactivación de los bacilos endógenos con los que se estuvo en contacto previamente, generando así a la tuberculosis secundaria.

La infección por *M. tuberculosis*, afecta principalmente a los pulmones por ser estos los de contacto inmediato, de ahí que sea la TB pulmonar la forma más frecuente de la enfermedad. La tos es el síntoma más común de la enfermedad y se acompaña de la producción de esputo en los estadios tempranos de la enfermedad conforme la inflamación y necrosis aparecen. Otros síntomas resultado del progreso de la enfermedad son: dolor en el pecho, dificultad para respirar, hemoptisis (tos con sangre) e incluso fallo respiratorio. En el caso de tuberculosis primaria, se observa en la región media e inferior del pulmón, zonas de infiltración y si esta persiste más allá del tiempo en el que la inmunidad celular específica se desarrolla, la cavitación (destrucción del tejido del pulmón) puede ocurrir (Bloom B.,1994).

La tuberculosis extrapulmonar y miliar (distribuida en pequeños nódulos), es la forma diseminada de la enfermedad y es causada por la expansión de los bacilos a través de vasos linfáticos y sanguíneos. En este tipo de tuberculosis, ya no sólo se encuentran afectados los pulmones sino también los nodos linfáticos y otros órganos importantes como riñones, médula ósea, bazo, hígado, cerebro, meníngea y genitales. Debido a que la TB extrapulmonar involucra sitios relativamente inaccesibles y a la naturaleza de esos órganos, un número pequeño de bacilos puede causar un daño mayor, complicando su diagnóstico y su confirmación bacteriológica, por lo que el proceso invasivo es frecuentemente requerido para establecer un diagnóstico (Bloom B.,1994).

#### **I.4. Tuberculosis. El agente causal.**

*M. tuberculosis* es una bacteria muy peculiar debido a sus propiedades constitutivas. Es un microorganismo intracelular aerobio facultativo, de lento crecimiento (replicación cada 18 hrs). Tiene una pared celular muy particular que impide su tinción por Gram ya que está compuesta por una gran cantidad de lípidos muy complejos (aproximadamente 60%) entre los que se encuentran los ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena muy larga) y las ceras D. Esta característica permite la retención del colorante carbol fucsina fenificada aún después de ser tratados con una mezcla de ácido hidroclicóricó-etanól, por lo que también se les considera bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Levinson W. and E. Jawetz, 2000).

*M. tuberculosis* pertenece a la Clase Actinobacteridae; Orden Actinomycetales; Familia Mycobacteriaceae; Genero Mycobacterium; y al complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. microti* y *M. tuberculosis*).

### **I.5. *M. tuberculosis* y su interacción con el hospedero.**

La interacción de los patógenos con sus hospederos ha sido considerada como un evento dinámico y de lucha constante. Los patógenos exitosos han desarrollado estrategias de virulencia que promueven su capacidad de adhesión, colonización, multiplicación e invasión. Esto ha sido logrado por muchas bacterias a través de productos de superficie y de secreción que facilitan su unión a las células del hospedero y a través de la competencia y/o evasión de los mecanismos de defensa del hospedero (Casadevall A. and L. Pirofski, 2001).

*M. tuberculosis* ha sido reconocido como un patógeno muy exitoso debido a su habilidad para sobrevivir en su hospedero (el humano) evadiendo la respuesta del sistema inmune. La micobacteria regularmente persiste en macrófagos contenidos en granulomas en los órganos de los hospederos infectados. Los granulomas o tubérculos se componen de macrófagos, células gigantes, células T, células B y fibroblastos y son producto de una fuerte respuesta inflamatoria para contener la infección (Flynn J. L. and J. Chan, 2001). Dentro del macrófago, la bacteria evita la destrucción inhibiendo la formación del fagolisosoma y empleando mecanismos que aún no son del todo conocidos.

Al igual que en la mayoría de los patógenos, *M. tuberculosis* posee moléculas que interactúan con su hospedero y permiten su colonización e invasión. Aunque la micobacteria exhibe un tropismo por los pulmones en donde coloniza principalmente macrófagos. Existen evidencias de que puede unirse, invadir y replicarse en células epiteliales, constituyendo un nicho ideal para que la bacteria pueda persistir y establecer la infección evadiendo el ambiente hostil del macrófago (Pethe K., Puech V. et.al., 2001). Se sabe que *M. tuberculosis* sintetiza sobre su superficie una adhesina hemoaglutinina de unión a heparina (HBHA, heparin-binding haemagglutinin adhesin), la cual está involucrada en la interacción con células epiteliales pero no con fagocitos profesionales. La adherencia micobacteriana mediada por HBHA recae en la interacción de su dominio carboxi-terminal rico en lisinas con proteoglicanos que contengan heparan sulfato (HSPGs) (Menozi F. D. et.al., 2002). Se ha observado en mutantes de *M. tuberculosis* deficientes de HBHA el papel tan



importante que juega esta proteína en la diseminación extrapulmonar (Pethe K., Alonso S. et.al, 2001).

Recientemente se ha encontrado que *M. smegmatis* y *M. leprae* poseen adhesinas con características muy semejantes a las de la HB11A de *M. tuberculosis* como la propiedad de tener un dominio carboxi-terminal rico en lisinas (Pethe K., Puech V. et.al., 2001). Tanto la HB11A como las proteínas de *M. smegmatis* y *M. leprae* descritas como proteínas tipo histonas (hlp, histone like-protein) tienen la capacidad de unir laminina, un componente importante de membranas basales y matriz extracelular. En *M. leprae*, se ha reportado que la unión a laminina mediada por la hlp es un factor importante en la adherencia de la micobacteria a las células de Schwann, lo cual contribuye a la patogénesis del daño en el sistema nervioso mediado por *M. leprae* (Marques M.A. de M. et.al., 2000).

La presencia de este tipo de adhesinas en micobacterias virulentas como *M. tuberculosis* y *M. leprae* es indicio de que estos patógenos han desarrollado más de una estrategia para interactuar con las células del hospedero.

## 1.6. El sistema plasminógeno/plasmina.

El papel del sistema del plasminógeno en los mamíferos ha sido tradicionalmente resaltado en el contexto de la fibrinólisis como la vía central para la disolución de los coágulos de fibrina. (Plow E.F. et.al., 1995). Si bien es cierto que esta función es esencial para mantener la hemostasis, juega también un papel importante en otras cascadas de activación tales como la activación de metaloproteinasas y en otros procesos como angiogénesis, remodelación de tejidos, embriogénesis, activación de ciertas prohormonas y factores de crecimiento, así como en la migración e invasión de células tumorales. (Lottenberg R. 1997; Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001).

El plasminógeno (Plg) es una glicoproteína inactiva de entre 90 y 92 kDa constituida por 791 aminoácidos. Es sintetizada en el hígado y circula en la sangre normalmente en una concentración de  $2\mu\text{M}$ . Tiene un residuo de ácido glutámico en su extremo amino terminal por lo que se le denomina glu-plasminógeno, este residuo se pierde junto con 76 aminoácidos cuando es modificado a la forma lis-plasminógeno (porque es una lisina la que se encuentra en su extremo N-terminal). El lis-plasminógeno puede ser activado a plasmina cuando es escindido en el enlace peptídico arg560 – val561, manteniéndose la molécula unida mediante puentes disulfuro (Winram S. B. And R. Lottenberg 1998), Figura 1.3.

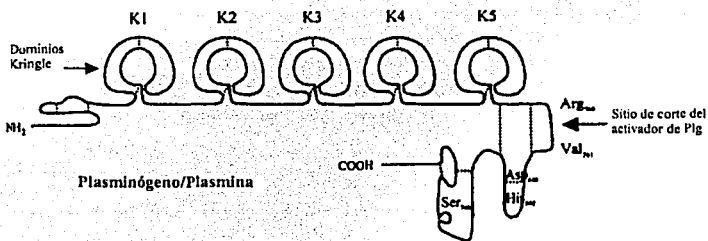
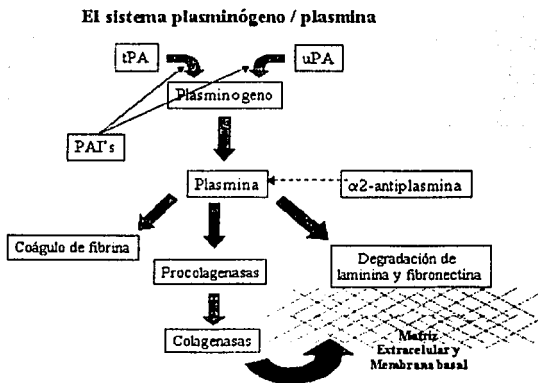


Figura 1.3 Representación de los dominios kringle de la molécula Plasminógeno. (Tomado de Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001).

La plasmina es una proteasa de serina de amplio espectro que cataliza la hidrólisis de enlaces peptídicos sobre los sitios C-terminal de residuos de lisina y arginina (Andreasen P.A., Egelund R. and H.H. Petersen. 2000). A diferencia del Plg que es la proenzima de una sola cadena, la plasmina está formada por dos cadenas: una pesada y una ligera. La cadena pesada N-terminal presenta cinco dominios denominados "kringle" mientras que la cadena ligera C-terminal contiene el dominio catalítico típico de proteasa de serina (Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001), Figura I.3. Los dominios kringle presentan sitios de unión a lisina (LBS "lisine binding sites"), los cuales reconocen preferencialmente lisinas carboxi-terminal y además median la localización del Plg a fibrina. (Parry M. et.al. 2000).

La conversión de Plg a plasmina puede ser catalizada por cualquiera de los dos principales activadores de Plg en mamíferos: el activador tisular de Plg (tPA, "tissue plasminogen activator") o por el activador tipo urokinasa de Plg (uPA, "urokinase plasminogen activator"), ambos con actividad de proteasa de serina. (Plow E.F. et.al. 1995), Figura I.4. El papel del tPA ha sido descrito principalmente en la fibrinólisis mientras que el del uPA ha dominado en migración celular.



**Figura I.4.** Regulación del sistema plasminógeno/plasmina.

Debido a su alta concentración en el plasma y a su participación en numerosos procesos, la activación de Plg a la forma enzimáticamente activa está regulada por los inhibidores de los activadores de plasminógeno (PAI's, "plasminogen activators inhibitors") y por la inhibición directa de la plasmina a través de la serpina  $\alpha 2$ -antiplasmina o de la  $\alpha 2$ -macroglobulina. La  $\alpha 2$ -antiplasmina es el principal inhibidor de plasmina soluble; forma un complejo 1:1 con la plasmina mediado por los LBS. Sin embargo, si la plasmina permanece unida a alguna superficie a través de los LBS la inhibición por  $\alpha 2$ -antiplasmina no puede ocurrir.

Los dominios kringle del Plg se unen tanto a residuos de lisina como a análogos de este, como el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (EACA "epsilon-aminocaproic acid), el cual es empleado como inhibidor en la unión del Plg con fibrina (Adams M. 1986).

### **1.6.1. Importancia de la plasmina unida a una superficie celular.**

Además de las funciones reguladoras de los activadores de Plg, inhibidores de activadores de Plg e inhibidores directos de plasmina, recientemente se ha descrito que la unión del Plg a una superficie juega un papel importante en el control de la activación a plasmina. Tanto la superficie de fibrina como las superficies celulares ejercen un efecto muy peculiar en el Plg, se ha visto que cuando el Plg está unido a proteínas de superficies celulares vía LBS su activación a plasmina es acelerada; además la actividad proteolítica de la plasmina unida a una superficie es mantenida en un ambiente que impide su inhibición como ya se mencionó anteriormente. (PLOW E.F. et.al. 1995, Herren T. et.al 2003).

Las proteínas de las superficies celulares que reconocen los LBS del Plg, funcionan como receptores de Plg (PlgRs), su distribución es muy amplia y heterogénea en diferentes tipos celulares como se muestra en la Tabla 1 (PLOW E.F. et.al. 1995).

Los PlgRs en conjunto con los activadores de Plg, promueven la efectiva generación de plasmina sobre las superficies celulares. La regulación de esos receptores, constituye un factor muy importante en el control del sistema Plg/plasmina. Cualquier cambio en el número de receptores o en la afinidad, podría ejercer un efecto significativo en el control de la respuesta celular influenciada por el Plg (Herren T. et.al. 2003).

**Tabla 1.** Distribución celular y densidad de P1gRs

<i>Tipo celular</i>	<i>P1gRs Sitios (<math>\times 10^3</math>)/célula</i>
Plaquetas	0.37
Granulocitos	1.6
Monocitos	4.4
Líneas celulares monocitoides (U937, THP-1)	160-4200
Linfocitos	4.9
Células leucémicas (WEHI-3B), RPMI-1788)	4-190
Células fibroblásticas	310
Células fibrosarcoma (HT-1080)	6
Células glioma (C6)	36
Carcino colonico (SW1116)	0.15
Células osteosarcoma (MG-63)	75
Células epiteliales (glomerulares)	60
Células endoteliales	1.4-210

La importancia de la actividad proteolítica de plasmina sobre las superficies celulares puede verse tanto en procesos fisiológicos como remodelación tisular y angiogénesis, así como en procesos patológicos como la artritis reumatoide, leucemia, metástasis e invasión de células tumorales. (Andreasen P.A., Egelund R. and H.H. Petersen. 2000, Herren T. et.al. 2003).

### 1.6.2. La plasmina y la matriz extracelular.

La plasmina interviene directa o indirectamente en la degradación de componentes de la matriz extracelular (MEC) y membrana basal (MB), que son los adhesivos celulares que permiten mantener unidas a las células de un tejido y constituyen las principales barreras tisulares en los mamíferos. La unión de plasmina a las células, es usada como un mecanismo para facilitar su migración a través de estas barreras.

La degradación de la MEC y MB por plasmina es debida a la proteólisis de componentes como fibronectina, el factor von Willebrand, laminina, vitronectina y trombospondina; y a la activación de metaloproteinasas de matriz (MMP) como colagenasa intersticial, estromeliasina-I y gelatinasa B, las cuales a su vez degradan otros componentes de la MEC y MB. (Lähteenmäki K., et.al. 2000, Bass R. and V. Ellis. 2002). Asimismo la plasmina puede afectar la actividad de citocinas y factores de crecimiento como el TGF  $\beta$ , el cual influencia la composición de la MEC. (Herren T. et.al. 2003).

### I.6.3. El papel de la interacción del plasminógeno con componentes bacterianos.

En las infecciones bacterianas, uno de los pasos más importantes es la interacción inicial del patógeno con el hospedero. Este paso es considerado como un prerrequisito para la supervivencia de la bacteria y para la diseminación hacia los tejidos blanco y tejidos más profundos. La actividad proteolítica es un factor importante en la patogénesis de las enfermedades infecciosas, ya que además del daño al tejido, permite la invasividad de las bacterias a sitios secundarios de la infección dentro del hospedero.

Se sabe que muchas bacterias patógenas interactúan con los sistemas de cascada dependientes de proteasas de sus hospederos, incluyendo las cascadas de la coagulación, fibrinólisis, activación de complemento, fagocitosis y la cascada de calicreina-cinina. (Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001).

Debido a la alta concentración del Plg en el plasma y a su amplia actividad proteolítica de su forma enzimática plasmina, recientemente se ha propuesto que el sistema Plg/plasmina puede ser un mecanismo usado por muchas bacterias patógenas para facilitar su movimiento a través de las barreras tisulares. (Lottenberg R., D. Minning-Wenz and M. D. P. Boyle. 1994, Lottenberg R., 1997).

Como ya se mencionó anteriormente, en los mamíferos los principales activadores de Plg son tPA y uPA, sin embargo, se ha identificado la presencia de activadores de Plg en varios grupos de bacterias tanto Gram (+) como Gram (-). Los activadores bacterianos descritos hasta el momento son: estreptocinasa (Sk) en los grupos A, C y G de estreptococos (Kuusela P. et.al. 1992), estafilocinasa en *Staphylococcus aureus* (Kuusela P. And O. Saksela. 1990, Mölkänen T. et.al. 2002) y Pla en *Yersinia pestis* (Lähtenmäki K. et.al., 1998). Así mismo, un gran número de receptores de Plg (PlgRs) han sido descritos en numerosos microorganismos como *Streptococcus*, *Salmonella*, *Borrelia* y *Escherichia coli* entre otros, los cuales se resumen en la Tabla 2.

La presencia de PlgRs o la expresión de activadores demuestran la interacción de los patógenos con sus hospederos. Muchos de ellos pueden adaptar, capturar o usar los factores del propio hospedero para facilitar su replicación o dispersión.

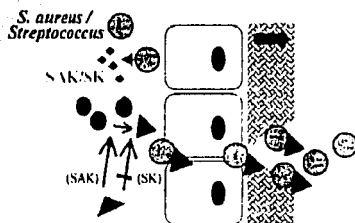
**Tabla 2.** Especies bacterianas que se ha identificado presentan PlgRs.

Espece bacteriana	Receptor	Referencia
<i>Borrelia burgdorferi</i>	70 kDa (OppA) Lipoproteína A (OspA)	Hu L.T. et.al. 1997. Fuchs H. R., et.al. 1994.
<i>Borrelia coriaceae</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. parkerii</i> , <i>B. anserinae</i> , <i>B. turicatae</i> y <i>B. hermsii</i>	No identificado	Coleman J.L. 1995
<i>Branhamella catarrhalis</i>	No identificado	Ullberg M. et.al. 1990.
<i>Escherichia coli</i>	Fimbriae Flagelo	Korhonen T.K. 1997. Lähteenmäki K., et.al. 1993. Li Z, et.al. 1997.
Grupo A de estreptococos	$\alpha$ -cnolasa (SEN)	Winram S. B. and R. Lottenberg, 1998.
Grupos A y C de estreptococos	Gliceraldehido 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH)	Lottenberg R. et.al. 1992.
Grupos A, C y G de estreptococos	Proteína tipo M (PAM)	Berge A and U. Sjöbring 1993 Kuusela P. et.al. 1992.
<i>Haemophilus influenzae</i>	Aspartasa	Ullberg M. et.al. 1990.
<i>Helicobacter pylori</i>	No identificado	Ljungh Asa. 2000.
<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	No identificado	Ullberg M. et. Al 1992.
<i>Proteus mirabilis</i>	No identificado	Ullberg M. et.al. 1990.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No identificado	Ullberg M. et.al. 1990.
<i>Salmonella typhimurium</i>	No identificado	Korhonen T.K. 1997.
<i>Staphylococcus aureus</i>	No identificado	Kuusela P. and O. Saksela. 1990. Mölkänen T. et.al. 2002
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	No identificado	Eberhard T. et.al. 1999.
<i>Treponema denticola</i>	No identificado	Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001.

En el caso de la interacción bacteriana con el sistema Plg/plasmina, se ha propuesto que ocurren básicamente dos vías o mecanismos por los cuales los patógenos pueden usar el sistema Plg/plasmina para invadir los tejidos adyacentes (Lottenberg R., D. Minning-Wenz and M. D. P. Boyle. 1994), figura 1.5.

El primero de ellos es la activación de Plg mediada por activadores de Plg producidos por la bacteria, es decir, el activador bacteriano convierte directamente el Plg a la forma plasmina, un ejemplo muy claro de ello es la estreptocinasa o la estafilocinasa.

Activación directa por activadores producidos por la bacteria



Activación por los activadores propios del hospedero potenciada por los PlgRs

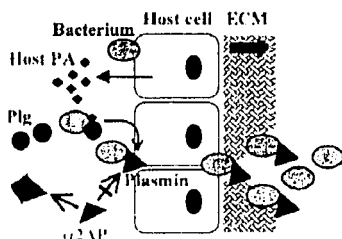


Figura 1.5. Representación de las dos formas en que las bacterias patógenas pueden usar el sistema Plg/plasmina para invadir los tejidos. (Tomado de Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001).

El otro mecanismo está determinado por los propios activadores del hospedero, la bacteria a través de los PlgRs es capaz de usar los activadores naturales del hospedero y potenciar la conversión a plasmina. En ambos mecanismos, la unión de la bacteria a la molécula de Plg es primordial, y esta unión generalmente está determinada por los LBS, lo que provoca que los inhibidores fisiológicos como  $\alpha 2$ -antiplasmina no puedan actuar sobre la plasmina unida a la bacteria impidiendo así su regulación. (Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001).

En general, la interacción entre las bacterias y el sistema Plg/plasmina constituye una vía por la cual las células bacterianas generan una actividad proteolítica no regulada sobre su superficie, lo que facilita la destrucción de los componentes de la MEC y ayuda a la bacteria a penetrar a través de las MB. La facultad que pueden adquirir los patógenos con esta actividad es sin duda la de cruzar barreras tisulares permitiéndole colonizar diferentes tejidos (Lottenberg, et al., 1994).

TESIS CON  
FALSA LE ORIGIN



## II. Hipótesis

*Mycobacterium tuberculosis* posee proteínas con capacidad de interactuar con el plasminógeno humano, esta unión puede llevar a la activación directa del plasminógeno a plasmina o bien favorecer la activación por tPA.

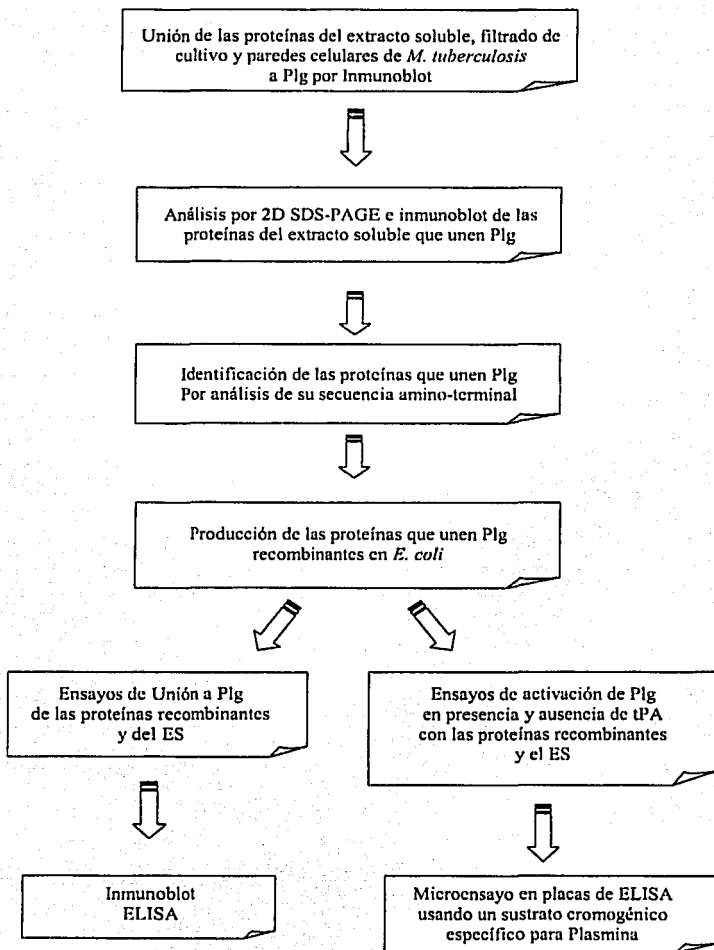
## III. Objetivo General

- Identificar las proteínas de *M. tuberculosis* que unen plasminógeno humano.

### III.1. Objetivos Específicos.

1. Identificar en el extracto soluble de *M. tuberculosis* los receptores que unen plasminógeno humano.
2. Evaluar si la interacción de los receptores de *M. tuberculosis* con plasminógeno directamente conlleva a su conversión a plasmina.
3. Evaluar si la unión de los receptores de *M. tuberculosis* a plasminógeno favorecen la activación a plasmina por tPA.

#### IV. Diseño Experimental



## V. Materiales y Métodos

V.0. La lista de reactivos y especificaciones de algunos métodos pueden revisarse en el anexo.

### V.1. Obtención de diferentes fracciones de *M. tuberculosis*.

*M. tuberculosis* H37Rv fue crecida en medio PBY durante 6 semanas. La masa bacteriana se separó del medio de cultivo por filtración; las proteínas del filtrado de cultivo (FC) se precipitaron con sulfato de amonio como lo describió Espitia y colaboradores en 1991. Las bacterias fueron resuspendidas en solución amortiguadora PBS y lisadas por sonicación (rompimiento de las células por ondas sonoras). El lisado celular fue centrifugado para separar las paredes rotas (precipitado) de la porción soluble (sobrenadante) obteniendo así el Extracto Soluble (ES). Las proteínas de las paredes celulares (PC) fueron extraídas con SDS al 2 % a 60 °C durante 1 hora.

### V.2. Unión de las proteínas de la micobacteria a P1g por Westernblot.

Las proteínas del filtrado de cultivo (FC), extracto soluble (ES) y paredes celulares (PC) de la micobacteria fueron analizadas en un gel al 12 % SDS-PAGE (Electroforesis en Gel de Poliacrilamida - Duodecil Sulfato de Sodio). La concentración de proteína en cada fracción fue determinada por el método de Bradford. En cada pozo se cargaron aproximadamente 10 µg de cada una de las muestras. El gel fue transferido (Westernblot) a una membrana de nylon PVDF a 60v durante 1 hora para después hacer la inmunodetección o bien teñirse con azul de Coomassie.

### V.3. Inmunoblot.

Para detectar las proteínas que se unen a P1g, primero la membrana se incubó con P1g (20 u/ml) diluido 1:500 en solución BSA al 3 % PBS-tween20 al 0.05 % durante 1 hr a temperatura ambiente (T.A.) y en agitación lenta. La membrana fue lavada dos veces con PBS-tween20 al 0.05 %. Después se incubó con un anticuerpo policlonal de conejo antiplasminógeno (AntiP1g) diluido 1:1000 en la solución de BSA PBS-tween20 durante 30 min a T.A. en agitación lenta. Se lavó dos veces y se incubó posteriormente con un segundo anticuerpo Proteína A 1:2000 conjugado con peroxidasa. Nuevamente se lavó con PBS-tween20. Las bandas de las proteínas que se unieron a

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

P1g se revelaron incubando finalmente la membrana con 1  $\mu$ l/ml de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) al 30 % en PBS-tween y diaminobencidina (DAB) como colorante.

#### V.4. Inhibición de la unión de las proteínas micobacterinas a P1g.

Como se sabe que la unión de muchos receptores a P1g es mediada por los sitios de unión a lisina (LBS), se realizó un ensayo de inhibición por competición, esto se hizo siguiendo el mismo procedimiento del inmunoblot pero incubando la membrana simultáneamente con P1g y un análogo de lisina, el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (EACA).

Los ensayos posteriores se realizaron empleando solo las proteínas del ES. Las otras fracciones están fuera del alcance de este trabajo.

#### V.5. Análisis por 2D SDS-PAGE.

Para resolver mejor las proteínas del ES que unen P1g se realizó una electroforesis de doble dimensión (O'Farrel, 1975). En esta electroforesis las proteínas son separadas inicialmente por isoelectroenfoque (primera dimensión) en tubos capilares a través de los cuales se hace pasar un gradiente de pH utilizando anfolinas, el rango de pH fue de 3.5 a 10. Las proteínas se mueven hasta el sitio de pH en donde su carga es igual a cero (punto isoeléctrico). En la segunda dimensión, las proteínas fueron separadas de acuerdo a su peso molecular mediante electroforesis en gel de poliacrilamida SDS al 12%. La doble dimensión se realizó en geles paralelos, los cuales posteriormente fueron transferidos a membranas PVDF (realizado por Angélica Amador). En una membrana se hizo la detección por inmunoblot de las proteínas de *M. tuberculosis* que unen P1g y la otra se tiñó con azul de Coomassie.

#### V.6. Identificación de las proteínas por secuencia.

Las membranas de la 2D fueron comparadas para identificar en la membrana teñida con Coomassie aquellos puntos detectados en el blot, una vez identificados, se cortaron de la membrana y se secuenciaron en su región amino-terminal. Los resultados de la secuenciación fueron analizados y comparados con las secuencias de las bases de datos disponibles en línea (Blast search protein-protein. Database: All non-redundant GenBank CDS translations, PDB, SwissProt, PIR, PRF. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>).

TESIS CON  
FALSA DE ORIGEN

## V.7. Producción de proteínas recombinantes.

Los genes de *M. tuberculosis* H37Rv correspondientes a las proteínas identificadas, Rv0350 (Hsp70) y Rv2220 (GlnA1, Glutamina sintetasa) fueron clonados y expresados en *Escherichia coli* (*E. coli*). La proteína recombinante Hsp70 se obtuvo por donación del Dr. Mahavir Singh (del Centro Biotecnológico Alemán GBF de Braunschweig Alemania). El gen de la proteína GlnA1 fue clonado en un plásmido con resistencia para ampicilina (pMCL176.2/1) y se le agregó además un tallo de histidinas para su posterior purificación (realizado por Marcelo Comini del grupo del Dr. Singh). La inducción de la expresión de la proteína se realizó en la cepa *E. coli* BL-21 (DE3), en la cual se formaron cuerpos de inclusión como consecuencia de la sobreexpresión de la proteína insoluble recombinante. Los cuerpos de inclusión fueron solubilizados en un buffer de lisis con urea, una pequeña parte de la proteína solubilizada fue dializada y el resto se purificó por cromatografía de afinidad a través de una columna de Niquel. La proteína purificada se liofilizó para su uso en los ensayos posteriores.

## V.8. Ensayos de unión a Plg con las proteínas recombinantes.

Las proteínas Hsp70 y GlnA1 recombinantes fueron sometidas a SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF, una membrana fue incubada con Plg/Antiplg y otra con Plg-EACA/Antiplg de la misma forma en que ya se había descrito anteriormente.

**ELISA.**- 1 µg, 2.5 µg y 5 µg de cada una de las proteínas (Hsp70, GlnA1 y ES) fueron fijados a placas de ELISA en 100 µl de solución amortiguadora de carbonatos pH 9.6 incubando la placa toda la noche a 37 °C. Los pozos con las proteínas fueron bloqueados con BSA/PBS-tween para evitar uniones inespecíficas a las paredes del pozo. Posteriormente se incubaron con Plg 1:500 durante 1 hora, Antiplg 1:1000 durante 30 min. y Proteína A 1:2000 durante 30 min. siguiendo el mismo procedimiento que en el inmunoblot, los lavados en cada paso se hicieron con PBS-tween20. Para revelar se usaron 100 µl por pozo de una solución preparada con tabletas de DAB-peroxidasa en buffer citrato-fosfato con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La reacción se llevó a cabo en aproximadamente 10 min después de los cuales se detuvo añadiendo 50 µl a cada pozo de HCl 3 N. La medición del color emitido por la reacción se leyó en un lector de placas de ELISA a D.O.<sub>492nm</sub>.

**Gel de Agarosa.**- Con la finalidad de observar la formación de un complejo entre el Plg y la proteína recombinante, se llevó a cabo una electroforesis en gel de agarosa bajo condiciones no

desnaturalizantes (Kim R., Yokota H. and S. Kim, 2000), es decir, no se les agregó  $\beta$ -mercaptoetanol a las muestras. En un gel de agarosa al 0.8 % se cargaron la proteína recombinante y el Plg en una proporción 1:1 volumen con buffer de carga (20 % glicerol, 0.2 % azul de bromofenol y 0.12 M Tris-base). La mezcla de proteína y Plg fue previamente incubada a 37 °C durante 30 min antes de ser cargada al gel. El gel se corrió en el amortiguador 25 mM Tris pH 8.5 19.2 mM glicina a 50 v durante 1 hr y posteriormente se tiñó con azul de Coomassie. Este ensayo sólo se hizo con la proteína recombinante Hsp70 y Plg, la proteína GlnA1 no migró en el gel bajo estas condiciones.

#### V.9. Ensayos de activación de Plg.

*En solución.*- Para este ensayo se emplearon placas de ELISA para microtitulación. Se evaluó la capacidad de las proteínas recombinantes y del ES de activar el Plg a la forma plasmina en presencia y ausencia de 1 ng de tPA. En cada pozo se colocaron 5  $\mu$ l de proteína o ES (aprox. 1  $\mu$ g de proteína), 5  $\mu$ l de tPA (1 ng), 20  $\mu$ l de un sustrato cromogénico para plasmina (1.5 mM) y 150  $\mu$ l Plg (20 u/ml diluido 1:500 en solución amortiguadora Tris 50 mM pH 7.4), se llevó todo a 200  $\mu$ l con buffer Tris 50 mM pH 7.4. Después de agregar al final el sustrato y el Plg, la placa se leyó inmediatamente a O.D.<sub>405nm</sub> y se mantuvo incubada a 37 °C durante 1 hr. Cada 10 min se tomó lectura del progreso de la reacción. En el ensayo se tuvieron como controles: estreptocinasa (1000 u/ml) como control positivo (independiente de tPA) y la proteína de 38 kDa recombinante en *E. coli* con tallo de histidina (1  $\mu$ g) como control negativo, ambas proteínas se añadieron siempre en un volumen de 5  $\mu$ l.

*Con las proteínas fijas.*- En este ensayo, las proteínas se fijaron a los pozos de una placa de ELISA con amortiguador de carbonatos (5  $\mu$ g de cada proteína en 100  $\mu$ l de solución de carbonatos pH 9.6), similar a un ELISA convencional. La placa se incubó toda la noche a 37 °C y la solución no evaporada se descartó. Sin bloquear la placa, se agregaron 5  $\mu$ l de tPA (10 ng), 20  $\mu$ l del sustrato cromogénico (1.5 mM) y 150  $\mu$ l de Plg (misma concentración que en el ensayo en solución) y se llevó también todo a 200  $\mu$ l con buffer Tris 50 mM pH 7.4. Se incubó a 37 °C durante 1 hr y se leyó a O.D.<sub>405nm</sub> cada 10 min. Antes de cada ensayo se realizó primero una curva de tPA, para determinar la concentración apropiada.

TESIS CON  
FALSA LE ORIGEN

## VI. Resultados

### VI.1. Unión de las proteínas de *M. tuberculosis* a Plg.

Las proteínas de *M. tuberculosis* que unen Plg humano fueron identificadas por Westernblot en las tres fracciones PC, ES y FC. La reactividad con el Plg se observó principalmente en bandas de aproximadamente 66 y 60 kDa. En las PC se observó además reactividad con una banda de aproximadamente 30 kDa. La especificidad de la unión se determinó por la inhibición de la interacción en presencia del análogo de lisina EACA (Figura 1).

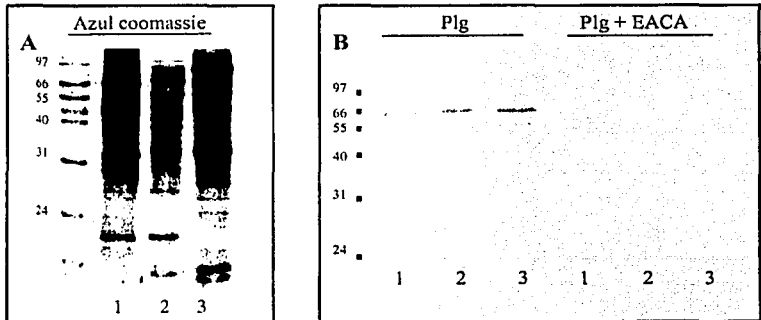


Figura VI.1. SDS-PAGE al 12% transferido a una membrana PVDF. A) Membrana teñida con azul de Coomassie. B) Inmunoblot, membrana incubada con Plg / AntiPlg y con Plg + EACA / AntiPlg. Carril 1. PC, carril 2. ES y carril 3. FC de *M. tuberculosis*.

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

## VI.2. Análisis de las proteínas del ES que unen Plg por 2D SDS-PAGE e inmunoblot.

Con el fin de caracterizar los receptores de *M. tuberculosis* que unen Plg, las proteínas del ES se resolvieron por electroforesis 2D en un rango de pH de 3.5 a 10. En la segunda dimensión las bandas se separaron en un gel SDS al 12% y posteriormente se transfirieron a membranas PVDF para poder detectar mediante inmunoblot cuáles puntos se unen a Plg. Así mismo se incubó la membrana con Plg-EACA para comprobar que la unión está mediada por los LBS.

Más de 8 puntos fueron reconocidos por el anticuerpo AntiPlg. Se observó que tanto para la banda de aproximadamente 66 kDa como para la de 60 kDa identificadas previamente habían varias isoformas (Figura 2).

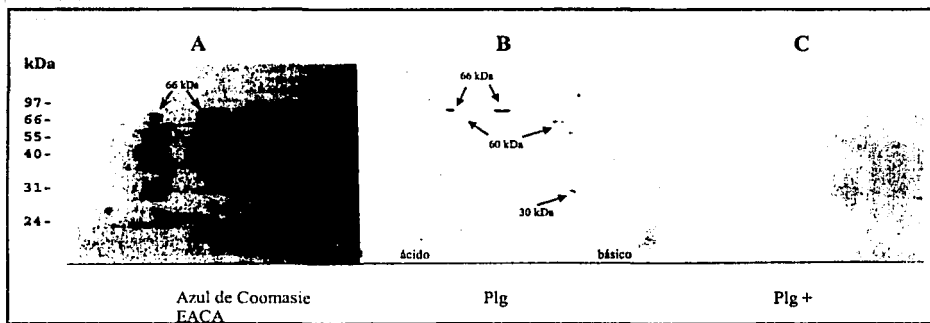


Figura VI.2. Electroforesis de doble dimensión de las proteínas del ES de *M. tuberculosis*, pH 3.5 - 10 SDS-PAGE al 12 % transferido a una membrana PVDF. A) Membrana teñida con azul de coomassie. B) Inmunoblot, membrana incubada con Plg / AntiPlg. C) Inmunoblot con Plg + EACA / AntiPlg. Los puntos correspondientes a las bandas de 66 y 60 kDa detectadas en el blot se colocalizaron en el gel paralelo teñido con Coomassie.

TEXTO CON  
FALTA DE ORIGEN



### VI.3. Identificación de las proteínas que unen Plg por análisis de secuencia.

De todos los puntos identificados en la electroforesis 2D, únicamente de 3 se obtuvo la secuencia amino-terminal. Esta se comparó con las bases de datos y se identificó que los puntos correspondían a la proteína de estrés calórico de 70 kDa (Hsp70, "Heat shock protein 70") y a la Glutamina sintetasa (GlnA1) de 55-58 kDa, que a su vez corresponden a los genes Rv0350 y Rv2220 respectivamente, de acuerdo a lo reportado en la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* (Cole S.T. y colaboradores, 1998).

Al hacer el análisis de la secuencia completa de estas proteínas, se encontró que la Hsp70 tiene 6.24 % de lisinas y la GlnA1 4.8 %. La Hsp70 además posee una lisina en el extremo carboxi-terminal.

**Hsp70**

MARAVGIDLTTNSVSVLEGGDPVWANSEGRSTTPSIVAFARNGEVLVGQPAKNQAVT  
NVDRTVRSVKRHMGSOWSIEIDGKKYTAPEISARILMKLRDAEAYLGEDITDAVITTPAYF  
NDAQRQATKADAGQIAGLNVLRIVNEPTAAALAYGLDKGEKEQRILVFDLGGGTFDVSLLLEI  
GEGVVEVRATSGDNHLGGDDWDQRVVDWLVDKFKGTSGIDLTDKMKAMQRLREAAEK  
AKIELSSSQSTINLPYITVDADKNPLFLDEQLTRAEFQRITQDLLDRTRKPFQSVIADTGIS  
VSEIDHVVLVGGSTRMPAVTDLVKELTGGKEPNKGVNPEDEVAVGAALQAGVLKGEVKD  
VLLLDVTPLSLGIETKGGVMTRLIERNTTIPTKRSEFTTADDNQPSVQIQVYQGEREIAAH  
NKLLGSFELTGIPPAPRGPIQIEVTFDIDANGIVHVTAKDKGTGKENTIRIQEGSGLSKEDID  
RMIKDAEAHAEEDRKRREEADVNRNQAETLVYQTEKFVKEQREAEAGSCKVPEDTLNKVDA  
AVAEAKAALGGSDISAISAMEKLGQESQALGQAIYEAQAASQATGAAPGGGEGGGAH  
PGSADDVDAEVVDDGREAK

**GlnA1**

MTEKTPDDVFKLAKDEKVEYVDVRFCDLPGIMQHFTIPASAFDKSVFDDGLAFDGSIRG  
FQSIHESDMLLLPDPETARIDPFRAAKTLNINFFVHDPFTLEPYSRDPNRNARKAENYLISTG  
IADTAYFGAAEFYIFDSVSFDSFRANGSFYEVDAISGWWNTGAATEADGSPNRGKYKVRHK  
GGYFPVAPNDQYVDLRDKMLTNLINSGFLEKGHHEVSGSGQAEINYQFNSSLHAADDMQ  
LYKYIKNTAWQNGKTVTFMFKPLFDGNGSGMHCHQSLWKDGAAPLMEYDETGYAGLSDT  
ARHYIGLLHAPSLLAFTNPTVNSYKRLVPGYEAPINLVYSQRNRSACVRIPITGSPNPKAK  
RLEFRSPDSSGNPPLAFSAMLMAGLDGIKNKIEPQAPVDKDYELPPEEAAISPQTPTQLS  
DVIDRLEADHEYLTEGGVFTNLIETWISFKRENEIEPVNIRPHYEFALYYDV

También se buscaron las proteínas identificadas en el proteoma 2D de la base de datos European Bacteria Proteome Project (EBP), en la cual ya se encontraban reportadas ambas proteínas (Figura. 3).

TESIS CON  
FALSA DE COPIA

Protein Name [70 kDa heat shock protein, chromosome replication]  
 Short Protein Name [DnaK]  
 Rv ORF [Rv0350]  
 NCBI AccNo [2094829]

Protein Name [Glutamine synthetase class 1]  
 Short Protein Name [GlnA1]  
 Rv ORF [Rv2220]  
 NCBI AccNo [1707954]

Figura VI.3. 2D PAGE del proteoma de *M. tuberculosis* (fracción soluble) reportado por la EBP. (Tomado de la pagina <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>).

#### VI.4. Producción de proteínas recombinantes.

El gen que codifica para la proteína GlnA1, fue clonado y expresado en *E. coli*. La proteína se purificó por cromatografía de afinidad empleando una columna de Niquel, la cual permite purificar proteínas que contengan un tallo de histidina. En la Figura 4 se muestran las fracciones obtenidas de la purificación de la GlnA1. La proteína Hsp70 de *M. tuberculosis* recombinante en *E. coli* fue purificada bajo las mismas condiciones que la GlnA1 y donada por el Dr. Mahavir Singh del Centro Biotecnológico Alemán (GBF de Braunschweig Alemania).

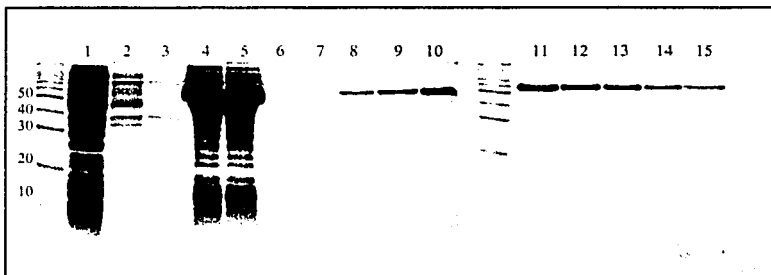


Figura VI.4. SDS-PAGE al 12 % teñido con azul de Coomassie. Carril 1. ES de *E. coli*, carril 2. 1<sup>er</sup> lavado del ES de *E. coli*, carril 3. 2<sup>o</sup> lavado del ES de *E. coli*, carril 4. Cuerpos de inclusión solubilizados antes de pasar por la columna, carril 5. Flujo de la columna (flow through), carriles 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15. Fracciones 2 a 11.

### VI.5. Unión de las proteínas recombinantes a Plg por inmunoblot.

La unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg se analizó por inmunoblot. En la figura 5 se observa que las proteínas Hsp70 y GlnA1 recombinantes tienen la capacidad de unir el Plg y que esta unión está mediada por los sitios de unión a lisina del Plg, ya que la interacción fue específicamente inhibida con EACA.

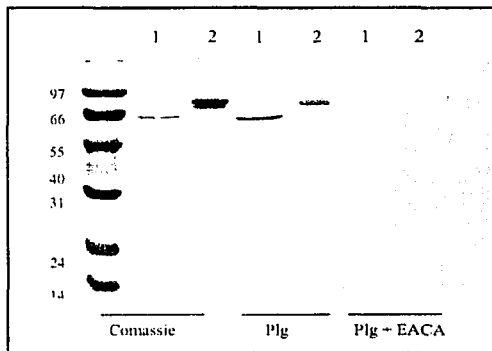
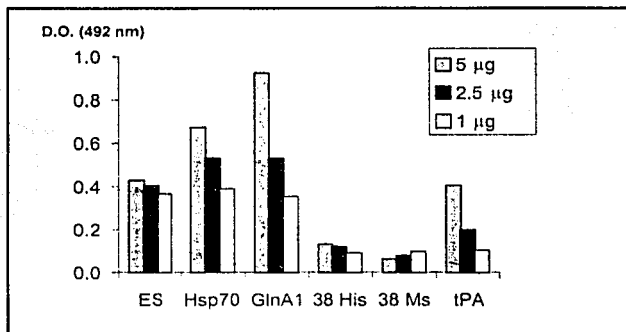


Figura VI.5. Inmunoblot. De izquierda a derecha, membrana teñida con azul de Coomassie, membrana incubada con Plg / AntiPlg y membrana incubada con Plg + EACA / AntiPlg. Carril 1. Proteína GlnA1, carril 2. Proteína Hsp70 de *M. tuberculosis* recombinantes en *E. Coli*.

## VI.6. Unión de las proteínas recombinantes a P1g por ELISA.

Mediante un ensayo de ELISA se evaluó también la capacidad de unión a P1g tanto de las proteínas recombinantes como del ES. Las proteínas recombinantes y el ES de *M. tuberculosis* se adhirieron a placas de ELISA de 96 pozos. Se detectó la unión del P1g a las proteínas recombinantes en diferentes concentraciones empleando el anticuerpo AntiP1g.

La unión de las proteínas a P1g fue dependiente de la concentración de las mismas, este efecto fue muy evidente para las proteínas recombinantes mas no para el ES (Figura 6). En este ensayo se utilizaron como controles negativos las proteínas recombinantes de 38 kDa de *M. tuberculosis* expresadas en *E. coli* y *Mycobacterium smegmatis* (38Ms). La primera tiene un tallo de histidina (38His) y se purificó bajo las mismas condiciones que Hsp70 y GlnA1 .

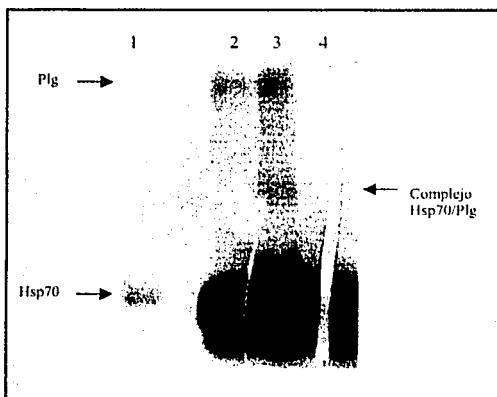


**Figura VI.6.** Unión de las proteínas recombinantes y el ES a P1g por ensayo de ELISA. Los pozos de la placa de ELISA fueron recubiertos con 1 µg, 2.5 µg y 5 µg de cada una de las proteínas, los cuales fueron incubados con P1g, AntiP1g y Proteína A peroxidasa. La lectura se hizo a una D.O.<sub>492 nm</sub>.

### VI.7. Formación del complejo Plg-Hsp70.

La unión de la proteína recombinante Hsp70 y el Plg se observó en forma nativa al formarse un complejo cuando ambas proteínas están en solución. Esto se visualizó mediante electroforesis en geles de agarosa en condiciones no desnaturalizantes. Ambas proteínas se incubaron previamente de manera conjunta para permitir la formación del complejo.

El Plg solo se observó en la parte superior del gel, mientras que el complejo Hsp70/Plg se observó en la parte media del gel. Esta unión fue inhibida cuando se añadió EACA a la mezcla. La proteína Hsp70 sola migró hacia la parte inferior del gel a la misma altura de la BSA (albúmina estabilizadora de Plg) (Figura 7).

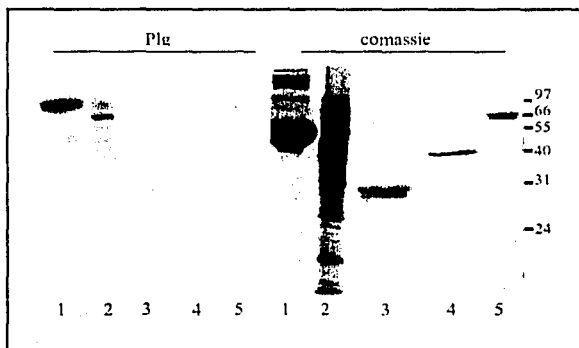


**Figura VI.7.** Electroforesis no desnaturalizante en gel de agarosa teñido con azul de Coomassie. Carril 1. Hsp70, carril 2. Plg, carril 3. Hsp70 y Plg (incubadas previamente durante 30 min a 37°C) carril 4. Hsp70, Plg y EACA.

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**

### VI.8. Caracterización de la unión de Hsp70 a Plg.

Como ya se mencionó, la proteína Hsp70 pertenece a una gran familia de proteínas de estrés calórico conocidas también como chaperonas. Normalmente estas proteínas se unen a ATP para llevar a cabo su función de chaperona. Se sabe que poseen un dominio de unión a ATP (ATPBD) y un dominio de unión al péptido al que van a asistir durante las condiciones de estrés (PBD). Para determinar qué región de la proteína Hsp70 está involucrada en la unión a Plg se utilizaron cada uno de los dominios en ensayos de unión por Western Blot. La secuencia de DNA que codifica para cada dominio fue clonada y expresada independientemente en *E. coli* por el Dr. Mahavir Singh. Los resultados demostraron que únicamente la región PBD se une a Plg (Figura 8).



**Figura VI.8.** Inmunoblot de la región de la proteína Hsp70 recombinante en *E. coli* que une Plg. En el lado derecho se tiene la membrana teñida con azul de Coomassie y en el izquierdo la membrana incubada con Plg y AntiPlg. Carril 1. Plg, carril 2. ES de *M. tuberculosis*, carril 3. Hsp70 PBD, carril 4. Hsp70 ATPBD, carril 5. Hsp70 completa.

## VI.9. Ensayos de Activación de Plg.

Como ya se ha descrito en la introducción, las células bacterianas pueden interactuar con el Plg y convertirlo directamente a la forma plasmina o activarlo a través de los propios activadores del hospedero. Por tal motivo se evaluó si los receptores identificados en *M. tuberculosis* podrían activar el Plg directamente o bien facilitar su activación por el activador tisular de Plg (tPA).

Para ello se realizó un ensayo de activación con las proteínas recombinantes y el ES en solución en placas de ELISA para titulación. La activación del Plg a plasmina se cuantificó mediante la degradación de un sustrato cromogénico específico para plasmina. Este ensayo se llevó a cabo a 37 °C durante 60 min en presencia y ausencia de tPA. Únicamente cuando el tPA estuvo presente se observó activación con el ES. La actividad que se generó con las proteínas recombinantes fue muy baja. Como control negativo se empleó a la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* recombinante en *E. coli* y en *Mycobacterium smegmatis* (Figura 9).

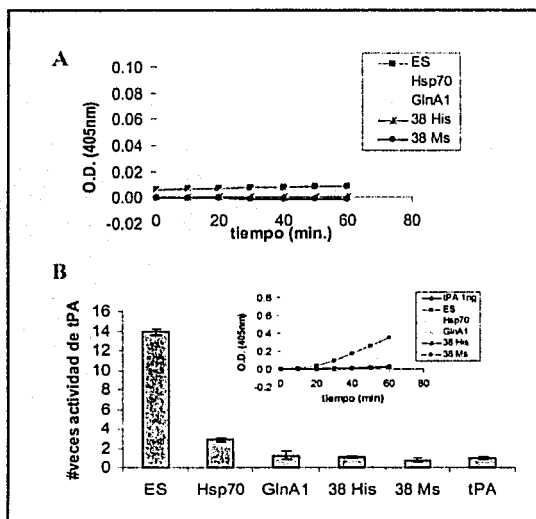
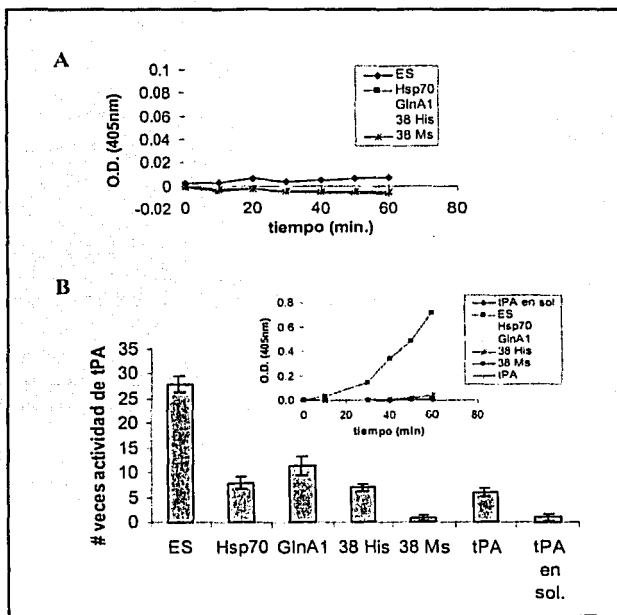


Figura VI.9. Ensayo de activación en solución, se cuantificó cada 10 min la degradación del sustrato cromogénico específico para plasmina. A) Activación de Plg por las proteínas en ausencia de tPA. B) Activación en presencia de 1 ng de tPA. Los valores fueron normalizados en función de la actividad de tPA a los 60 min.

También se evaluó la capacidad del ES y de las proteínas recombinantes para activar Plg cuando estas están fijas a una superficie. Esto se llevó a cabo adhiriendo las proteínas a los pozos de placas de ELISA y el Plg y el tPA se agregaron en solución (Figura 10).

No se detectó la actividad de plasmina en ausencia de tPA bajo estas condiciones, lo que implica que la actividad de plasmina generada por el ES y por las proteínas dependen de la presencia del tPA.



**Figura VI.10.** Ensayo de activación con las proteínas fijas a una superficie. A) Activación en ausencia de tPA. B) Activación en presencia de 5 ng de tPA. Se cubrió la superficie de los pozos de la placa de ELISA con aprox. 5  $\mu$ g de cada proteína, excepto tPA con 50 ng. La activación se normalizó en función de la actividad de tPA en solución.



Como puede observarse, la activación de Plg por el ES de *M. tuberculosis* en presencia de tPA es potenciada 14 veces en solución y hasta 28 veces cuando el ES está unido a una superficie. Sin embargo la activación generada por los receptores aislados y recombinantes fue mucho menor, poco más de 3 veces la actividad de tPA en solución con la Hsp70 y de casi 2 veces con la GlnA1.

En el caso del ensayo de activación con las proteínas fijas, la proteína Hsp70 tuvo un aumento de 8 veces y GlnA1 de más de 11 veces, pero el control negativo con la proteína de 38 kDa con tallo de histidina resulto tener 7 veces la actividad de tPA. La proteína de 38 kDa no une Plg como se mostró en el ensayo de unión por ELISA y no genera plasmina como se vio con la recombinante 38Ms.

## VII. Discusión

Se ha atribuido que las lesiones y el daño tisular observado en la tuberculosis son debidos principalmente a la respuesta exacerbada del sistema inmune para contener la infección y un ejemplo característico de ello es la formación de granulomas, sin embargo, hay muy pocos estudios que expliquen cómo ocurre ese daño y de qué forma la bacteria contribuye a él.

Así mismo, aunque se ha propuesto que los bacilos son transportados por los macrófagos del hospedero a través del sistema linfático, los mecanismos que emplea la bacteria para su diseminación e invasión generando la tuberculosis extrapulmonar son desconocidos.

Se ha reconocido en muchos patógenos, que la interferencia con los mecanismos de defensa del hospedero podría incrementar su virulencia. Esta virulencia a su vez, puede ser influenciada por los propios factores del hospedero. La interacción de *M. tuberculosis* con componentes del sistema Plg/plasmina sugieren que este sistema puede estar al alcance de la micobacteria como uno de tantos mecanismos de daño e invasividad.

En el presente estudio se han encontrado en *M. tuberculosis* proteínas con capacidad para unir Plg humano de manera específica vía sitios de unión a lisina. La mayoría de los receptores para Plg descritos hasta el momento en bacterias han sido caracterizados por la unión específica a Plg mediada por estos sitios. Aunque se identificaron a las proteínas Hsp70 y GlnA1 como receptores para Plg existen otras proteínas en las distintas fracciones de la bacteria que unen Plg y de las cuales no se realizó la caracterización.

La Hsp70 y la GlnA1 son proteínas que se encuentran tanto en el interior de la célula como en el exterior, tal como se pudo observar en el inmunoblot con PC, ES y FC.

En particular la Hsp70 identificada como receptor para Plg humano en este trabajo posee una lisina en el extremo carboxi-terminal lo cual coincide con lo que se ha descrito para otros PlgRs. En su función como chaperona, la Hsp70 posee un dominio de unión a ATP y un dominio por el cual se une a los péptidos a los que asiste. En la caracterización de la Hsp70 como receptor para Plg, se encontró que es el dominio de unión al péptido el que une Plg y no el dominio de unión a ATP. El dominio de unión al péptido se encuentra en la región carboxi-terminal, lo cual demuestra que la o las lisinas en esa región de la proteína son importantes para la unión de Plg.

Al evaluar la capacidad de las proteínas recombinantes y de las proteínas del ES de *M. tuberculosis* para activar Plg humano, se observó que estas proteínas no pueden activarlo de manera directa como se ha observado con estreptocinasa o estafilocinasa, al menos bajo las condiciones aquí empleadas. Sin embargo sí es claro que en el ES de la micobacteria existen elementos que promueven la activación de Plg a plasmina por tPA, lo cual nos indica que la activación del Plg por el activador del hospedero es facilitada debido a la interacción de *M. tuberculosis* con el Plg.

El efecto de activación por tPA que se observó con la proteína 38His, no es debido a la proteína *per se*, ya que no se observó el mismo efecto con la proteína 38Ms, sino a la presencia de otras proteínas de *E. coli* que permanecen en la muestra, ya que a pesar de ser proteínas purificadas siempre presentan bandas contaminantes que no son visibles por la tinción con azul de Coomassie, lo cual se comprobó mediante otro tipo de tinción como la tinción negativa.

Al igual que en otros microorganismos el sistema Plg/plasmina podría jugar un papel importante como mecanismo de daño e invasividad para *M. tuberculosis*. Esto es sugerido porque en el ambiente en el que se localiza la bacteria al interior del hospedero, existen muchos factores que facilitarían el uso de este mecanismo. Existen evidencias de que los macrófagos son células secretoras de tPA y productoras de metaloproteinasas de matriz extracelular como gelatinasa A (MMP2) y B (MMP9) (Quiding-Järbrink M., Smith D.A. and G.J. Bancroft, 2001). Bajo estas condiciones la generación de plasmina en la superficie de la bacteria le daría con una capacidad proteolítica que favorecería su diseminación hacia tejidos adyacentes. Además como ya se había señalado en la introducción, la micobacteria posee adhesinas que pueden mediar su localización a componentes de MB y MEC como laminina, lo cual haría más compleja esta interacción, ya que por un lado se tienen receptores para estos componentes, y por otro lado se tienen receptores para Plg que a su vez degradaría estos componentes al funcionar como plasmina. En ambas interacciones los residuos de lisina parecen tener una participación importante al mediar las uniones entre proteínas.

## VIII. Conclusiones

- *M. tuberculosis* posee proteínas con capacidad para unir Plg humano.
- Se identificaron como receptores para Plg humano de *M. tuberculosis* a las proteínas Hsp70 y GlnA1.
- La unión de las proteínas Hsp70 y GlnA1 a Plg está mediada por los sitios de unión a lisina del Plg.
- En la Hsp70 el dominio que une Plg es el dominio carboxilo terminal de unión al péptido.
- Las proteínas del ES de *M. tuberculosis* tienen la capacidad de favorecer la activación del Plg humano a la forma enzimáticamente activa plasmina por tPA.
- No se observó la activación directa de Plg a plasmina por las proteínas del ES de *M. tuberculosis* bajo las condiciones realizadas.

## IX. Bibliografia

- Adams M., Fretto L. J. and McKee Patrick A. 1983. Th binding of human plasminogen to fibrin and fibrinogen. *J. Biol. Chem.* 258(7):4249-4256.
- Andreasen P.A., Egelund R. and H.H. Petersen. 2000. The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* 57:25-40.
- Bass R. and V. Ellis. 2002. Cellular mechanisms regulating non-haemostatic plasmin generation. *Biochem. Soc. Trans.* 30(2):189-194.
- Berge A and U. Sjobring 1993. PAM, a novel plasminogen-binding protein from *Streptococcus pyogenes*. *J Biol Chem* 268(34):25417-25424.
- Blast search protein-protein. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>.
- Bloom B.R. and C.J.L. Murray. 1992. Tuberculosis: commentary on a reemergent killer. *Science* 257:1055-1064.
- Bloom B.R., 1994. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection, and Control. American Society for Microbiology Press, USA.
- Casadevall A. and L. Pirofski, 2001. Host-pathogen interactions: The attributes of virulence. Perspective. *J. Infec. Diseases.* 184:337-344.
- Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmecier K., Gas S., Barry Iii C.E., Tekaiia F., Badcock K., Basham D., Brown D., Chillingworth T., Connor R., Davies R., Devlin K., Feltwell T., Gentles S., Hamlin N., Holroyd S., Hornsby T., Jagels K., Krogh A., Mclean J., Moule S., Murphy L., Oliver K., Osborne J., Quail M. A., Rajandream M.-A., Rogers J., Rutter S., Secger K., Skelton J., Squares R., Squares S., Sulston J.E., Taylor K., Whitehead S. and B. G. Barrell. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393:537-544.

- Coleman J.L., Sellati T.J., Testa J.E., Kew R.R., Furie M.B. and J.L. Benach. 1995. *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect. Immun.* 63:2478-2484.
- Crubezy E, Ludes B, Povcda JD, Clayton J, Crouau-Roy B, Montagnon D. 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian Pott's disease of 5,400 years old. *C R Acad Sci III* 1998 Nov;321(11):941-51.
- De Melo Marques M.A., Mahapatra S., Nandan D., Dick T., Sarno E.N., Brennan P.J. and M.C. Vidal Pessolani. 2000. Bacterial and host-derived cationic proteins bind  $\alpha$ 2-laminins and enhance *Mycobacterium leprae* attachment to human Schwann cells. *Microbes and Infection* 2:1407-1417.
- Eberhard T, Kronvall G. and M. Ullberg. 1999. Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb. Pathogen.* 26:175:181.
- Espitia C., Cervera I. And R. Mancilla. 1991. The antigenic structure of *Mycobacterium tuberculosis* examined by immunoblot and ELISA. Influence of the age of the culture and of the obtaining method on the composition of the antigenic extracts. *Arch. Invest. Méd.* 22:101-107.
- European Bacteria Proteome Project (EBP). <http://www.mpiib-berlin.mpg.de/2D-PAGE>.
- Flynn JoAnne L. and J. Chan. 2001. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* 19:93-129.
- Fuchs H. R., Wallich R., Simon M.M. and M.D. Kramer. 1994. The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:12594-12598.
- Herren T., Swaisgood C. and Plow E. 2003. Regulation of plasminogen receptors. *Front. Biosc.* 8:1-8.

- Hu L.T., Pratt S.D., Perides G., Katz L., Rogers R.A. and M.S. Klempner. 1997. Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun.* 65(12):4989-4995.
- Kim R., Yokota H. and S. Kim. 2000. Electrophoresis of proteins and protein protein complexes in a native agarose gel. *Analyt. Biochem.* 282:147-149.
- Korhonen T.K., Lahteenmaki K., Kukkonen M., Pouttu R., Ilyonen U., Savolainen K., Westerlund-Wikstrom B. and Virkola R. 1997. Plasminogen receptors turning *Salmonella* and *Escherichia coli* into proteolytic organisms. *Adv Exp Med Biol.* 412:185-92.
- Kuusela P. and O. Saksela. 1990. Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*, increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. *Eur. J. Biochem.* 193:759-765.
- Kuusela P., Ullberg M., Saksela O., and G. Kronvall. 1992. Tissue-type plasminogen activator-mediated activation of plasminogen on the surface of group A, C, and G streptococci. *Infect. Immun.* 60:196-201.
- La salud en las Americas, edición de 1998, Vol. II.
- Lähteenmäki K., Kuusela P. and T.K. Korhonen. 2001. Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Micro. Reviews* 25:531-552.
- Lähteenmäki K., Kuusela P. and TK. Korhonen.et.al. 2000. Plasminogen activation in degradation and penetration of extracellular matrices and basement membranes by invasive bacteria. *Methods* 21:125-132.
- Lähteenmäki K., Virkola R., Saren A., Emody L. and TK. Korhonen.et.al. 1998. Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun.* 66:5755-5762.
- Lähteenmäki K., Westerlund B. Kuusela P. and T. Korhonen. 1993. Immobilization of plasminogen on *Escherichia coli* flagella. *FEMS Microb. Letters* 106:309-314.

- Levinson W. and E. Jawetz, 2000. *Medical Microbiology and Immunology: examination and board review*. 6<sup>th</sup> edition, McGraw-Hill, USA.
- Li Z, et.al. 1997. Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in mouse skin infection model. *The Jour. of Inf. Dise.* 179:907-914.
- Ljungh Asa. 2000. *Helicobacter pylori* interactions with plasminogen. *Methods* 21:151-157.
- Lottenberg R., 1997. A novel approach to explore the role of plasminogen in bacterial patogenesis. *Trends Microbiol.* 5 (12): 466-468.
- Lottenberg R., Broder C.C., Boyle M.D., Kain S.J., Schroeder B.L. and Curtiss R 3<sup>rd</sup>. 1992. Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J. Bacteriol.* 174(16):5204.
- Lottenberg R., D. Minning-Wenz and M. D. P. Boyle. 1994. Capturing host plamin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens?. *Trends Microbiol.* 2:20-24.
- Menozi F.D., Pethe K., Bifani P., Soncin F., Brennan M.J. and C. Locht. 2002. Enhanced bacterial virulence through exploitation of host glycosaminoglycans. *Molecular Microbiology* 43(6):1379-1386.
- Mölkänen T., Tyynelä J., Helin J., Kalkkinen N. and Kuusela P. 2002. Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS letters* 512:72-78.
- Parry M.A.A., Zhang X.C. and W. Bode. 2000. Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *TIBS* 25:53-59.
- Pethe K., Alonso S., Biet F., Delogu G., Brennan M.J. Locht C. and F.D. Menozzi. 2001. The heparin-binding haemagglutinin of *M. tuberculosis* is required for extrapulmonary dissemination. *Nature* 412:190-193.



- Pethe K., Puech V., Daffé M., Josenhans C., Drobecq H., Loch C. and F.D. Menozzi. 2001. *Mycobacterium smegmatis* laminin-binding glycoprotein shares epitopes with *Mycobacterium tuberculosis* heparin-binding haemagglutinin. *Molecular Microbiology* 39(1):89-99.
- Plow E.F., Herren T., Redlitz A. Miles L.A. and J.L. Hoover-Plow. 1995. The cell biology of the plasminogen system. *The FASEB journal*. 9:939-945.
- Quiding-Järbrink M., Smith D.A. and G.J. Bancroft, 2001. Production of matrix metalloproteinases in response to micobacterial infection. *Infect. Immun.* 69(9):5661-5670.
- Salud Publica de México. Noviembre-Diciembre de 1995, volumen 37, no. 6. pp. 539-548.
- Salud: México 2001. Primera edición, 2002. D.R.© Secretaría de Salud México.
- Secretaría de Salud, 1993. Dirección General de Información y Estadística. Mortalidad, 1992. México, D.F.
- Ullberg M., Kronvall G., Karlsson I. and B. Wiman. 1990. Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect. Immun.* 58(1):21-5.
- Ullberg M., Kuusela P., Kristiansen B.E. and G.J. Kronvall. 1992. Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *Infect. Dis.* 166(6):1329-34.
- WHO Report 2002. World Health Organization. Global Tuberculosis Control: Surveillance, Planning, Financing. Geneva, Switzerland. WHO/CDS/TB/2002.295.
- Winram S. B. And R. Lottenberg, 1998. Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys334 as essential for plasmin binding, but mutation of the plr gen does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology* 144:2025-2035.

## X. Anexo

### Cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv

*M. tuberculosis* H37Rv obtenidas de la ATCC (American Type Colony Collection) crecieron durante 6 semanas en medio Proskauer and Beck modificado por Youmans (PBY). El cultivo se mantuvo todo el tiempo a temperatura ambiente y sin agitación.

#### Medio PBY

Asparagina	5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5 g
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.5 g
Na-Citrato-2H <sub>2</sub> O	0.61 g
MgCl <sub>2</sub>	0.68 g
Glicerol	1.197 g
Volumen Final	1 Lt

Ajustar el pH a 6.8 con NaOH 10 N.

Las bacterias se cosecharon por centrifugación a 4000 rpm durante 10 min. El cultivo se filtró a través de membranas con poro de 0.8 µm de diámetro.

Las bacterias fueron tratadas con azida de sodio al 2 % durante 24 a 48 h a T.A. y posteriormente centrifugadas a 4000 rpm durante 5 min. Se lavaron exhaustivamente con PBS estéril para eliminar el azida de Na.

#### Solución amortiguadora PBS 10 X

NaCl	87.6 g
1 M Fosfato de Na dibásico.	77.4 ml
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	
1 M Fosfato de Na monobásico monohidratado. NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> + H <sub>2</sub> O	22.6 ml
Volumen Final	1 Lt

El PBS 1X queda al final con pH de 7.4, 150 mM NaCl y 0.01 M de fosfatos.

### SDS-PAGE

#### Gel separador 12 %

Resolvin gel 4X buffer. 1.5 M Tris pH 8.8, 0.4 % SDS	2.5 ml
H <sub>2</sub> O	3.5 ml
Acrlamida 30 %, Bis acrlamida 0.8 % (Bio-Rad)	4 ml
10 % Persulfato de amonio	100 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamina)	10 µl

#### Gel concentrador 4.5 %

Stacking gel 4X buffer. 0.5 M Tris pH 6.8, 0.4 % SDS	1.25 ml
H <sub>2</sub> O	3 ml
Acrlamida 30 %, Bis acrlamida 0.8 % (Bio-Rad)	0.75 ml
10 % Persulfato de amonio	50 µl
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylenediamina)	10 µl

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

## Determinación de concentración de proteínas

Se empleó el método de Bradford que determina concentración de proteína en base a los anillos aromáticos presentes en algunos aminoácidos.

Kit de Bio-Rad. Protein Assay No. Cat. 500-0006

## Western Blot

La transferencia de los geles se hizo a membranas de nylon PVDF. Immobilon-P (Millipore, Co., Bedford, Mass).

Las membranas son activadas previamente a la transferencia incubándolas 5 min. en metanol.

## Inmunoblot

Plasminógeno comercial proveniente de plasma humano.	Roche. No. Cat. 874 477
Anticuerpo policlonal anti plasminógeno humano hecho en conejo	Dako. No. Cat. A0081
Proteína A HRP-rec	Zymed No. Cat. 10-1123
Albúmina de suero bovino	Sigma No. Cat. A9647
Tween 20	Sigma No. Cat. P-1379
3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride	Sigma No. Cat. D5637

## Ensayos de activación

Plasminógeno proveniente de plasma humano.	Roche. No. Cat. 874 477
tPA humano.	Calbiochem No. Cat. 612200
Sustrato cromogénico Chromozym PL	Roche No. Cat. 378 461
$\epsilon$ -aminocaproil acid (EACA), 6-Aminoheptanoic acid.	Merck No. Cat. S25052
Placas para ELISA.	Costar 3590 EIA/RIA
Placas de microtitulación para ensayos de activación.	Cliniplate

## Cromatografía de afinidad

Columna de níquel.	Pharmacia Ni** NTA Superflow column
HPLC.	Bio Rad