



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“CARACTERIZACIÓN DE PROTEASAS DETECTADAS EN EL MEDIO DE CULTIVO DE *Mycobacterium tuberculosis*”.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

ELIZABETH MENDOZA CORONEL



DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

2 0 0 5



FACULTAD DE CIENCIAS SECCIÓN ESCOLAR

m345382



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
 NOMBRE: Elizabeth Mendoza Coronel
 FECHA: 13/ Junio 05
 FIRMA: *[Signature]*

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Caracterización de proteasas detectadas en el medio de cultivo de Mycobacterium tuberculosis".

realizado por Elizabeth Mendoza Coronel

con número de cuenta 09511705-2 , quien cubrió los créditos de la carrera de:
 BIOLOGÍA

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director

Propietario Dra. Clara Inés Espitia Pinzón *[Signature]*

Propietario Dra. Annie Pardo Semo *[Signature]*

Propietario M. en C. Jaime Campuzano Granados *[Signature]*

Suplente Biól. Jorge Antonio García Alvarez *[Signature]*

Suplente M. en C. María de los Remedios Josefina Ramírez Rangel *[Signature]*

Consejo Departamental de Biología

[Signature]
 M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

AGRADECIMIENTOS

A mis profesores y a la Facultad de Ciencias de la Universidad Autónoma de México por ser la responsable de mi formación profesional.

A mi tutora la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón por su apoyo y dedicación en el desarrollo de este trabajo.

A mis sinodales la Dra. Annie Pardo Semo, M. en C. Jaime Campuzano Granados, Biól. Jorge Antonio García Álvarez y M. en C. Ma. de los Remedios Josefina Ramírez Rangel por sus apreciables contribuciones que ayudaron a mejorar este trabajo.

A mi familia por aguantarme todos los días.

A mis compañeros y amigos del laboratorio B-120 del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM que ayudaron a darle dirección este trabajo.

A Ilse, Vania, Argel y Karla por su amistad, paciencia y por hacer la vida más divertida.

A Tasmania porque ni con todo el dinero del mundo puedo pagar todo lo que has hecho por mí.

RESUMEN

Las proteasas secretadas por las bacterias desempeñan múltiples funciones en su sobrevivencia y crecimiento. Estas proteínas proporcionan fuentes extracelulares de nutrientes además de ser factores de virulencia como efectoras en la patología de enfermedades infecciosas. El análisis de la secuencia completa del genoma de la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis* estableció la existencia de genes que codifican para proteasas secretadas. A pesar de la importancia de las proteasas en la patogenicidad, se conoce muy poco acerca del papel que éstas juegan en la infección por *M. tuberculosis*. El objetivo del presente trabajo fue caracterizar las proteasas detectadas en el medio de cultivo de *M. tuberculosis*. La actividad proteolítica del filtrado del medio de cultivo se detectó por electroforesis en geles desnaturalizantes copolimerizados con gelatina. Se observaron 3 bandas con actividad proteolítica de aproximadamente 47.3, 50.3 y más de 100 kD. El efecto del pH se determinó por incubación de los geles en un rango de 4 a 11, presentándose la mayor actividad a pH 8 y 9. La actividad proteolítica de las tres bandas fue dependiente de la presencia de algún ión divalente, debido a que la inhibición fue completa con EDTA. Los inhibidores Pefabloc, TLCK y Aprotinina inhibieron la actividad parcialmente y con el inhibidor PMSF se obtuvo la mayor inhibición. No se observó inhibición cuando se probaron los inhibidores de proteasas de cisteína y de ácido aspártico (E-64 y Pepstatina respectivamente). Todos los inhibidores de serina utilizados mostraron una reducción en la actividad proteolítica de las tres bandas, lo que indica que las proteasas secretadas de *M. tuberculosis* detectadas se corresponden con proteasas de esta clase, las cuales son dependientes de algún metal (usualmente zinc) o ión como el calcio, mostrada por su inhibición con EDTA. La secuenciación del amino terminal de la banda de 47.3 kD se corresponde con la proteína de choque térmico ClpB, perteneciente a la familia de las Clp ATPasas. Posiblemente como proteína de estrés, represente un factor imprescindible para la sobrevivencia de la bacteria durante condiciones desfavorables dentro del hospedero. La actividad proteolítica detectada no corresponde con la información obtenida hasta el momento, por lo que las proteasas encontradas se suman a lista de proteínas secretadas por *M. tuberculosis*. La localización de ClpB en el medio extracelular abre una puerta para investigar a fondo el posible papel en el que esta proteína pudiera estar involucrada.

INDICE

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Aspectos generales de la tuberculosis	1
I.1.1.- Situación de la tuberculosis en México	3
I.2.- Vacuna contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4
I.3.- Agente causal <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	4

II. ANTECEDENTES

II.1.- Patogénesis de la tuberculosis	5
II.2.- Proteínas secretadas por <i>M. tuberculosis</i>	7
II.3.- Secreción de proteínas	7
II.3.1.- Vía dependiente de la secuencia	9
II.3.2.- Vía dependiente de la secuencia en <i>M. tuberculosis</i>	9
II.3.3.- Vía independiente de la secuencia en <i>M. tuberculosis</i>	9
II.4.- Función de las proteínas secretadas por <i>M. tuberculosis</i>	10
II.5.- Las proteasas y sus funciones	11
II.5.1.- Clasificación	12
II.5.2.- Proteasas dependientes de ATP	13
II.6.- Importancia de las proteínas secretadas con actividad proteolítica	15
II.6.1.- Proteasas producidas por Micobacterias	16
II.6.2.- Proteasas producidas por <i>M. tuberculosis</i>	17

III. JUSTIFICACIÓN	19
--------------------	----

IV. HIPÓTESIS	20
---------------	----

V. OBJETIVOS	21
--------------	----

VI. MATERIALES Y MÉTODOS	22
--------------------------	----

VII. RESULTADOS	25
-----------------	----

VII.1.- Detección de regiones con actividad proteolítica	25
VII.2.- Determinación del pH óptimo	25
VII.3.- Efecto de los inhibidores en la actividad proteolítica	27
VII.4.- Detección de puntos con actividad proteolítica por 2-D PAGE	28
VII.5.- Electroforesis bidimensional y 2-D PAGE con gelatina como sustrato	31
VII.6.- Secuenciación de proteínas	32

VIII. DISCUSIÓN	34
-----------------	----

IX. CONCLUSIONES	41
------------------	----

X. PERSPECTIVAS	42
-----------------	----

XI. ANEXO	43
-----------	----

XII. BIBLIOGRAFÍA	45
-------------------	----

I. INTRODUCCIÓN

I.1.- Aspectos generales de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad que ha afectado al hombre desde hace mucho tiempo, fue un padecimiento prevaeciente entre los egipcios en los años 3700 a 1000 a.c. y para el año 460 a.c. se describió por primera vez la sintomatología de la enfermedad¹, pero no fue sino hasta 1882 que el bacilo de la tuberculosis fue descubierto por Robert Koch². Actualmente, la amplificación de ADN micobacteriano por PCR de restos humanos ha permitido establecer la presencia de esta enfermedad en momias egipcias de 5400 años de edad³, así como en culturas prehispánicas⁴. A pesar de que la tuberculosis se considera como una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, desde el punto de vista evolutivo, *Mycobacterium tuberculosis* es relativamente joven, se calcula que apareció hace 20,000 años aproximadamente⁵.

La tuberculosis es una infección crónica producida fundamentalmente por *Mycobacterium tuberculosis* y en muy raras ocasiones por *Mycobacterium bovis*. Por su repunte en los últimos años que elevó la cifra a mil 900 millones de casos a nivel internacional, la Organización Mundial de la Salud (OMS) desde 1993 considera a la tuberculosis como una enfermedad emergente que provoca la muerte a casi tres millones de pacientes al año⁶.

En el último reporte realizado por la OMS en 1999 (5° reporte del control global de la tuberculosis) se estimó que cada año se presentan alrededor de 8.4 millones de casos nuevos y se espera que para el año 2005 esta cifra se incremente a 10.2 millones, debido a un aumento en la incidencia principalmente en países africanos que son los más afectados por el Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). La estimación de la OMS de 1998 a 1999 mostró un aumento importante en el número total de casos de tuberculosis (Figura 1). Tomando como base los reportes anteriores se estimó que para finales del año 2000 se acumularán 90 millones de casos nuevos de tuberculosis de los que 8 millones serán atribuibles a la infección por VIH (Virus de la Inmunodeficiencia Humana) y ocurrirán 30 millones de muertes en este mismo periodo incluyendo 2.9 millones atribuibles a la infección por VIH⁶.

En la actualidad, se considera sólo a título orientativo, que al menos un tercio de la población mundial está infectada con el bacilo y se estima que entre 1998 y 2020 morirán cerca de 60 millones de personas por tuberculosis⁶.

La tuberculosis es una de las enfermedades asociadas al SIDA más importantes, las alteraciones inmunológicas que acompañan a este síndrome facilitan las formas de tuberculosis de reactivación y la progresión rápida de infección a enfermedad. La inmunodepresión causada por el VIH facilita el desarrollo de la enfermedad tuberculosa por diferentes mecanismos: reactivaciones endógenas a partir de bacilos persistentes; progresión de infecciones recientes con desarrollo de formas clínicas de tuberculosis más agudas y atípicas, con frecuentes diseminaciones hematógenas que recuerdan las formas más graves de tuberculosis primaria en los niños, y reinfecciones exógenas en individuos previamente infectados que, al ocurrir en condiciones de déficit inmunitario, progresan a enfermedad. Así la diseminación del virus del SIDA en poblaciones que poseen alta incidencia de tuberculosis, sumado a factores socioeconómicos, han ejercido una gran influencia en el resurgimiento de esta enfermedad^{7,8,9}.

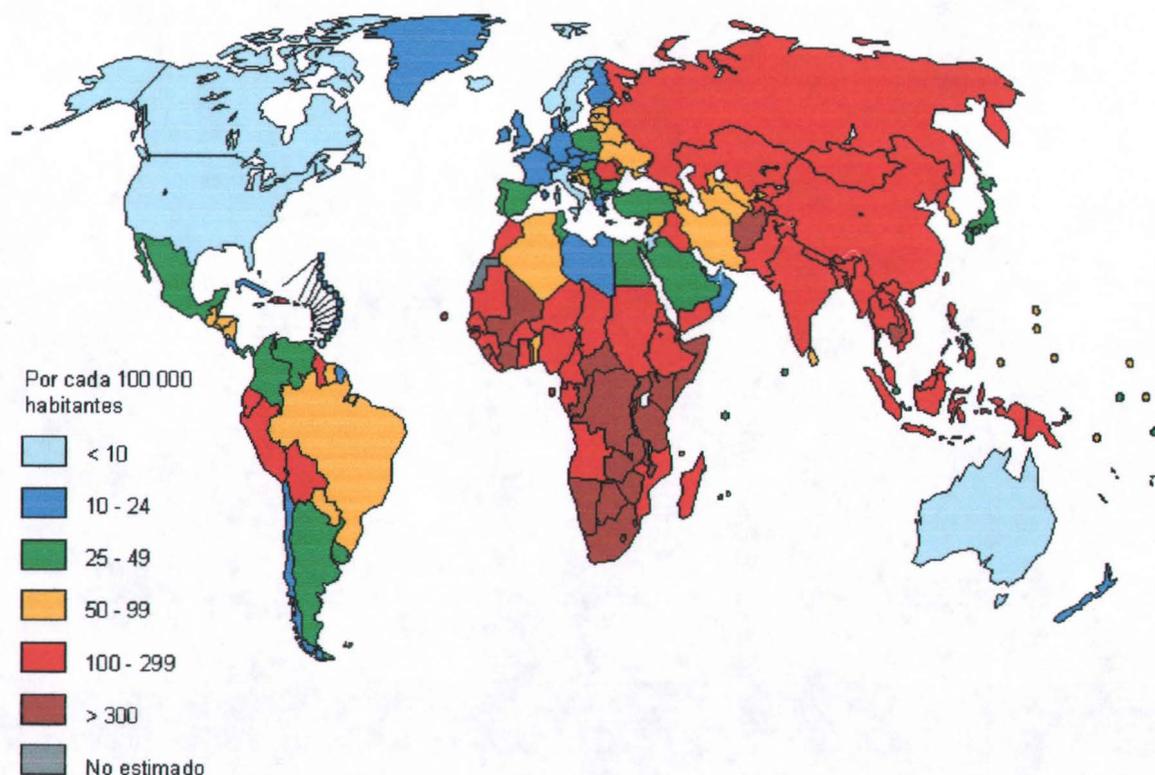


Figura 1. Incidencia Mundial de Tuberculosis, OMS 2001.

I.1.1.- Situación de la tuberculosis en México.

En México, García y Valdespino han estudiado las tendencias de la morbilidad por tuberculosis (TB)^{10,11}, las cuales muestran un descenso desde 1941 hasta 1976, año en que se estabilizan. Para 1993, la tasa de morbilidad notificada por TB era de 17.1 casos por 100 000 habitantes; de haberse conservado la tendencia observada entre 1941 y 1976, la tasa para 1993 hubiera sido de 12.5 casos por 100 000 habitantes. Se calcula que en los últimos 10 años han ocurrido 27 000 casos en exceso. Al analizar la distribución de estos casos adicionales por grupo de edad, se observa un predominio en los sujetos de edad productiva. Al aplicar el modelo de historia natural de la enfermedad, el cual fue desarrollado por Miller y publicado por la OMS en 1982, se puede estimar la tasa real de casos de TB que ocurren en México. Este modelo utiliza tres indicadores: a) el riesgo anual de infección, b) la cobertura de la vacunación con el bacilo de Calmette y Guerin (BCG) en la población total y c) la eficacia de la vacuna. El modelo calcula que existen de 39 a 59 casos bacilíferos por cada 100 000 habitantes, por cada 1% de riesgo anual de infección y 1.22 casos no bacilíferos y extrapulmonares por cada caso bacilífero. Con base en los resultados de reactividad al PPD en sujetos de la Ciudad de México, se calculó en 1% el riesgo anual de infección en sujetos no vacunados¹¹.

La cobertura de la vacuna BCG en la población general es de 65% y su eficacia para prevenir la TB pulmonar es de 75%. Considerando estos parámetros, las estimaciones muestran un total de 45 815 casos con un tasa estimada de 51.7 casos por 100 000 habitantes, en contraste con las cifras notificadas: 15 145 casos (2 775 de TB extrapulmonar y 12 370 de TB pulmonar), con una tasa de 17.1 casos por 100 000 habitantes, lo cual indica una tasa estimada del triple notificada¹².

En el año de 1997, México fue uno de los trece países considerados por la OMS como de alto riesgo para la tuberculosis. La TB representa la décima causa de mortalidad general en el grupo de edad de 25 a 64 años. La tasa de mortalidad reportada a nivel nacional en 1992 fue de 6 por 100 000 habitantes, según esta notificación, 13.6% de estas muertes se debieron a TB extrapulmonar. Se estima que ocurren 6 000 defunciones por año a causa de la TB. En este mismo año la letalidad a nivel nacional fue de 35%. Aproximadamente el 2-3% de los enfermos con tuberculosis son positivos al VIH y aproximadamente el 8% de los pacientes VIH positivos se presentan con enfermedad tuberculosa¹³.

I.2.- Vacunas contra *M. tuberculosis*.

La única vacuna que existe en el mundo contra la tuberculosis es la vacuna BCG, la cepa atenuada de *M. bovis* desarrollada en 1921 por Calmette y Guérin. Hasta el momento es la única vacuna antituberculosa empleada en humanos. La inmunización con BCG está incluida en el programa de vacunación de muchos países, sin embargo su uso ha dado lugar a debates a causa de los resultados contradictorios de los ensayos en que se ha evaluado su eficacia. La vacuna previene las formas graves de la enfermedad, fundamentalmente en niños menores de 4 años, pero no protege de la primoinfección tuberculosa a un número apreciable de casos de tuberculosis pulmonar. Su efectividad varía desde un 77% en el Reino Unido hasta 0% en la India, así su impacto en el control general de la afección es relativamente escaso¹⁴.

I.3.- Agente causal *M. tuberculosis*.

Más de 53 especies micobacterianas han sido descritas y cuando menos 27 aisladas en entidades clínicas humanas, el 95% de los casos de tuberculosis son causadas por especies pertenecientes al complejo tuberculoso como son: *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium bovis*, *Mycobacterium africanum* y *Mycobacterium microti*. Microscópicamente *M. tuberculosis* es un bacilo recto, alargado de aproximadamente 0.4 x 3 µm, inmóvil, no encapsulado y no esporulado. Pertenece a la clase Actinobacteria, al orden Actinomycetales, familia Mycobacteriaceae y al género *Mycobacterium*, que incluyen a bacterias que se caracterizan por presentar en la pared celular un elevado contenido de lípidos (40% de su peso en seco total) que las hace resistentes al alcohol y a los ácidos. Es un microorganismo aerobio estricto, de crecimiento muy lento y altamente infeccioso. Su velocidad de crecimiento es mucho más lenta que la de otras bacterias (su tiempo de división es de unas 18 h) tardando varias semanas en dar colonias visibles en medios convencionales¹⁵.

II. ANTECEDENTES

II.1.- Patogénesis de la tuberculosis.

El bacilo se transmite fundamentalmente por vía aérea, los individuos se pueden infectar por los aerosoles contaminantes emitidos por las personas con tuberculosis pulmonar activa al toser o expectorar. Las gotas de secreción en el exterior pierden una parte de su contenido acuoso por evaporación y dejan un núcleo con uno o pocos bacilos que son los verdaderos vehículos de la transmisión, tienen 1-2 mm de diámetro y se dispersan sin dificultad al quedar en suspensión en el aire. La infección por *M. tuberculosis* desencadena una amplia respuesta inmune, pero se conoce muy poco acerca de la eliminación específica del patógeno o bien sobre los mecanismos de desarrollo de la enfermedad asociados a la patogénesis. Es muy probable que el grueso de su pared celular y los productos génicos asociados con la resistencia del microorganismo a la respuesta inmune sean los que les permiten sobrevivir en el interior de los macrófagos del hospedero. En la mayoría de las personas infectadas el riesgo de avanzar hacia la tuberculosis activa se estima aproximadamente en 10% si la infección ocurre durante la niñez^{16,17}.

La infección primaria (primoinfección tuberculosa) suele ser asintomática, representa posiblemente la única forma de control micobacteriano por el hospedero, ante su imposibilidad de erradicarla. Si bien la primoinfección casi siempre se cura, quedan focos distantes con bacilos vivos, capaces de producir meses o años más tarde, enfermedad tuberculosa (tuberculosis de reactivación en el adulto). Aunque en la mayoría de los individuos la infección primaria no progresa, produce reacciones inmunológicas en el hospedero que modifican la respuesta a infecciones posteriores o a la reactivación de la infección primaria, permitiendo identificar al individuo infectado, debido a que muestran reacciones de hipersensibilidad retardada frente a la administración cutánea de una preparación del antígeno micobacteriano, el derivado proteico purificado, conocido como PPD, también llamada prueba de la tuberculina¹⁸.

El bacilo es fagocitado por los macrófagos alveolares y consigue evitar su destrucción impidiendo la unión del fagosoma que lo contiene con los lisosomas. De esta manera el bacilo consigue multiplicarse en el interior del macrófago hasta el punto de destruirlo. Al igual que ocurre con otros patógenos intracelulares, el macrófago infectado secreta citocinas (entre ellas el TNF α) y quimiocinas, que desencadenan un proceso inflamatorio local y con ello una respuesta inespecífica de defensa que se caracteriza por el acumulo

inicial de neutrófilos y posteriormente de monocitos en el foco de infección. Los monocitos fagocitan a los bacilos que han destruido a los macrófagos alveolares y potencian su crecimiento puesto que, al no estar activados constituyen a su vez un excelente medio para el crecimiento intracelular de los mismos. La respuesta defensiva inespecífica fracasa en la contención del bacilo, de manera que este consigue diseminarse sistémicamente. Esta situación cambia cuando la concentración de antígenos bacilares consigue traspasar el umbral a partir del cual las células presentadoras de antígenos profesionales situadas en los ganglios linfáticos, son capaces de estimular a los linfocitos T no estimulados, predominantemente de tipo CD4+ (o cooperadores) del subtipo 1 (Th1), y a los linfocitos CD4 capaces de desencadenar una hipersensibilidad retardada. Estos linfocitos específicos estimulados entran a nivel sistémico y se localizan tanto en el foco inicial de infección como en todos los focos secundarios originados a partir de la diseminación sistémica inicial del bacilo, que pueden incluir prácticamente a todos los tejidos del hospedero, aunque los que llegan a los vértices del pulmón, parénquima renal, metáfisis óseas y corteza cerebral, encuentran las mejores condiciones para su establecimiento. De esta manera se empieza a generar el granuloma, que consta de un núcleo con macrófagos infectados y linfocitos a su alrededor. Los linfocitos del subtipo Th1 sintetizan la citosina interferón gama (IFN γ) que permite la activación de los macrófagos infectados y con ello la destrucción de entre el 90-95% de la concentración bacilar, consiguiendo el control del foco de infección. Así la inmunidad protectora contra las micobacterias está determinada por la relación entre las células T sensibilizadas y los macrófagos activados¹⁸.

Posteriormente el granuloma entra en una fase crónica (o de equilibrio), debida probablemente a una disminución de la población de linfocitos Th1 como consecuencia de un aumento de la población linfocitaria de subtipo Th2. El granuloma tuberculoso se caracteriza por poseer tejido necrótico en su interior, formado por una trama de fibrina rica en ácido hialurónico y colágena, que contiene bacilos extracelulares de metabolismo lento, que son difíciles de ser reconocidos y destruidos por los macrófagos que conforman el granuloma. La formación de esta lesión es muy inicial y parece deberse a la destrucción ocasionada por la presencia de altas concentraciones locales de TNF α , de enzimas proteolíticas liberadas tanto por neutrófilos como macrófagos, además de la presencia de linfocitos CD8+ específicos con propiedades citolíticas capaces de destruir a los macrófagos infectados¹⁸.

La infección por *M. tuberculosis* produce además una respuesta inmune humoral acentuada, sin embargo el papel que esta respuesta desempeña en la protección aún no ha podido explicarse¹⁹. Actualmente se conoce gran parte de la patogénesis en tuberculosis, lo que ha permitido agrupar de manera general a los componentes de *M. tuberculosis* en tres grandes grupos: 1.- componentes esenciales para su crecimiento y sobrevivencia, 2.- antígenos importantes (potentes en la generación de una respuesta inmune) y 3.- factores de virulencia. Interesantemente los componentes que han sido más estudiados en los últimos años son las proteínas secretadas, las cuales pueden ser asociadas a cualquier grupo antes mencionados, convirtiéndose de esta manera en una opción prometedora en la búsqueda del entendimiento de los mecanismos que utiliza *M. tuberculosis* en el desarrollo de la enfermedad durante la infección.

II.2.- Proteínas secretadas por *M. tuberculosis*

Recientemente numerosos estudios se han enfocado a la identificación y caracterización de proteínas liberadas por *M. tuberculosis* durante cultivos *in vitro*, ya que algunas de esas proteínas han sido asociadas con la virulencia del bacilo. *M. tuberculosis* produce y secreta muchas proteínas al medio extracelular²⁰, se cree que pudieran tener una función importante en patogénesis (véase tabla 1 y 2), además unas pocas muestran ser generadores potentes de una respuesta inmune celular²¹. La inducción de una respuesta inmune primaria puede ser una importante contribución para la inmunidad protectora, de esta forma el reconocimiento inicial de proteínas secretadas podría ser asociado con protección²².

II.3.- Secreción de proteínas

Es importante mencionar que uno de los requisitos para la exportación y secreción (proteínas asociadas a la pared celular y proteínas liberadas extracelularmente) de proteínas, es su traslocación (transporte a través de la membrana plasmática). Las vías de secreción en bacterias Gram negativas han sido clasificadas en dos grandes clases dependiendo del mecanismo que se utilice para el transporte en: vías dependiente de la secuencia, las cuales utilizan el sistema de secreción denominado Sec, en el que las proteínas que van a ser exportadas o secretadas presentan una secuencia señal en el extremo amino terminal; y las vías independientes de la secuencia, en las cuales los sustratos se pueden traslocar directamente desde el citosol hasta el exterior, sin que exista una secuencia señal en el amino terminal²³.

Tabla 1. Proteínas exportadas y secretadas por *M. tuberculosis* que contienen secuencia señal²⁴.

Proteína	Gen	Descripción o función
Antígeno 85A /MTP44	fbpA (Rv3804c)	Micolitransferasa, unión a fibronectina
Antígeno 85B /MTP59	fbpB (Rv1886c)	Micolitransferasa, unión a fibronectina
Antígeno 85C /MTP45	fbpC2 (Rv0129c)	Micolitransferasa, unión a fibronectina
CFP17	Rv1827	Antígeno
CFP21	Rv1984c	Antígeno
CFP25	Rv 2301	Antígeno
Erp	pirG (Rv3810)	Factor de virulencia
MpcA	plcA (Rv2351c)	Fosfolipasa C
MpcB	plcB (Rv2350c)	Fosfolipasa C
Mpt32/Apa/45/47 kD	modD (Rv1860)	Unión a fibronectina
MPT51	fbpC1 (Rv3803c)	Antígeno
MPT53	Rv2878c	Antígeno
MPT63	Rv1926c	Antígeno
MPT64	Rv1980	Antígeno
MPT70	Rv 2875c	Antígeno
MTB12	Rv2376c	Antígeno
MTB32A	pepA (Rv0125)	Proteasa de serina
MTB32B	Rv0983	Proteasa de serina
MTC28	Rv0040	Antígeno
Spot F	Rv1815	Desconocida
Spot B	Rv3036	Similar a MPT64
O2mtb1	proX (Rv3759c)	Similar a proteína de osmoprotección
Bmtb1	Rv0590	Parte del operón mce2
Pmtb1	Rv2864c	Lipoproteína
19 kD	lpqH (Rv3763)	Lipoproteína
24 kD	lppx (Rv2945c)	Lipoproteína
Antígeno 5/antígeno 38 kD	phoS1 (Rv0934)	Lipoproteína, unión a fosfatos
PstS2	pstS (Rv0932c)	Lipoproteína, unión a fosfatos
PstS3	phoS2 (Rv0928)	Lipoproteína, unión a fosfatos
MPT83	Rv2873	Lipoproteína
P27/27 kD	lprG (Rv1411c)	Lipoproteína

Tabla 2. Proteínas exportadas y secretadas por *M. tuberculosis* que carecen de secuencia señal²⁵.

Proteína	Gene	Descripción o función
L-Alanina deshidrogenasa	ald (Rv2780)	Síntesis L-Alanina
Alfa-cristalina	hspX (Rv2031c)	Chaperona, asociada con baja de oxígeno y condiciones de fase estacionaria
CFP29	Rv0798c	Antígeno
CFP10	Rv3874	Antígeno
CFP17	Rv1827	Antígeno
CFP20	tpx (Rv1932)	Antígeno
CFP22	ppiA (Rv0009)	Isomerasa cis-trans peptidil-prolil
DnaK	dnaK (Rv0350)	Chaperona
ESAT-6	esat6 (Rv3875)	Antígeno
Glutamina sintetasa	glnA1 (Rv2220)	Síntesis de glutamina
Hemaglutinina (HBHA)	Rv0475	Adhesina
Superóxido dismutasa	sodA (Rv3846)	Intermediarios reactivos de oxígeno
Tioredoxina	trxC (Rv3914)	Intermediarios reactivos de oxígeno
Catalasa/peroxidasa	katG (Rv1908c)	Intermediarios reactivos de oxígeno
GroEs	groES (Rv3418c)	Chaperona

II.3.1.- Vía dependiente de la secuencia

La vía dependiente de la secuencia reconoce dos tipos de secuencia señal: la secuencia señal estándar (tipo 1) y la secuencia señal lipoproteica (tipo 2). En la bacteria Gram negativa *Escherichia coli*, durante el curso de la exportación proteica, esa secuencia señal es "cortada" por peptidasas LepB y LspA respectivamente. Ambos tipos de secuencia señal presentan un amino terminal cargado positivamente, seguido de una secuencia de 10 a 20 aminoácidos hidrofóbicos y finalmente un péptido señal con sitio de corte. El sitio de corte de la secuencia señal estándar es seguido por aminoácidos pequeños en las posiciones -3 y -1, a menudo referido como sitio de corte Ala-X-Ala. El sitio de corte para lipoproteínas contiene aminoácidos hidrofóbicos (comúnmente leucina) en la posición -3 y un residuo de cisteína es requerida en la posición +1²³.

Con la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, se ha encontrado que muchos de los genes que participan en el proceso de secreción proteica y que originalmente fueron identificados en *E. coli*, también están presentes en *M. tuberculosis*. Los componentes centrales de la maquinaria de traslocación (sistema Sec) en bacterias Gram negativas y Gram positivas, muestran un alto grado de similitud, lo que sugiere que el mecanismo funcional puede ser el mismo²⁶.

II.3.2.- Vía dependiente de la secuencia en *M. tuberculosis*

La información sobre las vías de secreción en *M. tuberculosis*, es derivada del análisis de la secuencia completa de su genoma²⁷ por la identificación de factores de secreción que exhiben estrecha similitud con los factores que fueron identificados originalmente en *E. coli* (véase tabla 3). La evidencia de una vía dependiente de la secuencia fue dada por el reconocimiento de un péptido señal en el amino terminal de un número significativo de proteínas exportadas o secretadas en *M. tuberculosis* (tabla 1).

II.3.3.- Vía independiente de la secuencia en *M. tuberculosis*

En el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* también se han encontrado proteínas que carecen de una secuencia señal amino terminal que dirija a las proteínas al ambiente extracelular, algunas de esas proteínas han sido asociadas con la virulencia del bacilo (véase tabla 2).

Tabla 3 . Homólogos de factores de secreción conocidos en *M. tuberculosis*.

Proteína	Homólogo en <i>M.tuberculosis</i> ^a	Porcentaje de identidad (aa) ^b	Descripción
SecA	Rv3240c/SecA1 Rv1821/SecA2	48 35	Subunidad de la traslocasa, ATPasa, proteína citoplásmica y de membrana.
SecY	Rv0732/SecY	40	Subunidad de la traslocasa, proteína de membrana
Sec E	Rv0638/SecE	37 C-terminal	Subunidad de la traslocasa, proteína de membrana
SecG	Rv1440/SecG	27 N-terminal	Subunidad de la traslocasa, proteína de membrana
SecD	Rv2587c/SecD	33 N-terminal 27 C-terminal	Proteína de membrana
SecF	Rv2586c/SecF	25	Proteína de membrana
YajC	Rv2588c	20 ^c	Proteína de membrana
SecB	Ninguna		Chaperona de exportación
Ffh	Rv2916c/Ffh	50	Proteína SRP
FtsY	Rv2921c/FtsY	40	Receptor de SRP
LepB	Rv2903c/LepB	26	Peptidasa señal estándar
LspA	Rv1539c/LspA	29	Peptidasa señal para lipoproteína
PgsA	Rv2612c/PgsA Rv1822/PgsA2 Rv2746c/PgsA3	30 N-terminal 30 32	Síntesis de fosfolípidos
GroEL	Rv3417c/GroEL1 Rv0440/GroEL2	46 52	Chaperona
DnaK	Rv0350/DnaK	54	Chaperona
GrpE	Rv0351/GrpE	23	Chaperona
DnaJ	Rv0352/DnaJ Rv2373c/DnaJ2	37 N-terminal 42 C-terminal 33	Chaperona

^a ORF o nombre de la proteína obtenida de la secuencia genómica de *M. tuberculosis* (Cole et al., 1998).

^b Porcentaje de identidad de aminoácidos entre proteínas de *E. coli* y ORF de *M. tuberculosis*. ^c Porcentaje de identidad de aminoácidos es determinado por PSI-Blast de NCBI.

II.4.- Función de proteínas secretadas por *M. tuberculosis*

La función de la mayoría de las proteínas exportadas y secretadas por *M. tuberculosis* es completamente desconocida. La micobacteria gasta una energía considerable en la

producción de estas proteínas, por lo que puede asumirse que cumplen una función importante sobre algunos aspectos de su crecimiento y patogénesis.

Una fracción de las proteínas exportadas o liberadas al medio extracelular (las lipoproteínas) muy posiblemente estén involucradas en sistemas de transporte de nutrientes como por ejemplo, la lipoproteína de 38 kD de *M. tuberculosis* que muestra estrecha similitud con la proteína periplásmica PhoS de *E.coli*, esencial en el transporte de fosfatos^{28,29}.

Otro grupo de proteínas referidas como el complejo antígeno 85, que consiste de tres proteínas (85A, 85B y 85C) secretadas en grandes cantidades, se cree que son de gran importancia en la adhesión de la bacteria y su subsiguiente infección a células eucariontes por su capacidad de unirse a la fibronectina, el mayor componente de la matriz extracelular humana, mediando de esta manera la interacción del bacilo a la superficie mucosa y subsiguiente invasión intracelular a través de receptores de fibronectina presentes en macrófagos³⁰. Es bien sabido que tanto la proteína de 38 kD como los miembros del complejo antígeno 85, han sido reconocidos como importantes blancos de la respuesta inmune^{28,31}, y asociados con protección²².

La superóxido dismutasa, es otra proteína secretada por *M. tuberculosis*, esta proteína es capaz de inactivar los radicales superóxidos tóxicos generados por el macrófago activado, protegiendo al bacilo del estallido respiratorio llevado a cabo por el hospedero³².

II.5.- Las proteasas y sus funciones

Las Hidrolasas, las cuales rompen enlaces peptídicos son generalmente conocidas como proteasas, peptidasas, proteinasas o enzimas proteolíticas. En general las proteasas extracelulares catalizan la hidrólisis de proteínas grandes a pequeñas moléculas de subsiguiente absorción por la célula, mientras que las proteasas intracelulares tiene un papel en la regulación del metabolismo. Algunas de las actividades mejor descritas en las cuales participan las proteasas es la renovación proteica mediante la constante degradación y síntesis. Las proteasas extracelulares tienen el papel más importante en nutrición debido a su actividad despolimerizadora.

La activación de formas zimógenas por proteólisis limitada es una función llevada a cabo por proteasas. Así como la activación, la inactivación proteolítica de enzimas es también un evento fisiológicamente significativo³³.

II.5.1.- Clasificación

Todas las hidrolasas son designadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular como E.C.3.4.(*Enzyme Comision*). Las clases de peptidasas son definidas por un tercer número (11 al 24). Las proteasas son clasificadas con base a tres amplios criterios: 1) tipo de reacción catalizada, 2) naturaleza química del sitio catalítico, 3) relación evolutiva con referencia a su estructura.

Las proteasas en general son subdivididas en dos grandes grupos: exopeptidasas y endopeptidasas, dependiendo de su sitio de acción como se muestra en la tabla 4.

Exopeptidasas

Las exopeptidasas actúan únicamente cerca del final de la cadena polipeptídica liberando un solo residuo de aminoácido, un dipéptido o un tripéptido. Las exopeptidasas se dividen en dos grupos:

3.4.11,13-14.- Aminopeptidasas.

Las aminopeptidasas actúan en el amino terminal de la cadena polipeptídica. Están presentes en una amplia variedad de especies microbianas, incluyendo bacterias y hongos. En general las aminopeptidasas son enzimas intracelulares.

3.4.16-18.- Carboxipeptidasas.

Las carboxipeptidasas actúan en el carboxilo terminal de la cadena polipeptídica y liberan un solo aminoácido o un dipéptido. Pueden ser divididas en tres grandes grupos: carboxipeptidasas de serina, metalocarboxipeptidasas y carboxipeptidasas de cisteína, basándose en la naturaleza de los residuos de aminoácidos del sitio activo de la enzima.

Endopeptidasas

Las endopeptidasas son caracterizadas por su acción preferencial en enlaces peptídicos de regiones internas de la cadena polipeptídica, lejos del amino o carboxilo terminal. Las endopeptidasas a su vez son subdivididas en cuatro subgrupos de acuerdo al grupo funcional presente en el sitio activo en: proteasas de serina, proteasas aspárticas, proteasas de cisteína y metaloproteasas.

Tabla 4. Tipos de peptidasas designadas por la Unión Internacional de Bioquímica y Biología Molecular (1992).

Número E.C.	Tipo de peptidasa	Acción
EXOPEPTIDASAS 3.4.11.-	Aminopeptidasa	Liberación del residuo N-terminal
3.4.13.-	Dipeptidasa	Actúa sólo en dipéptidos
3.4.14.-	Dipeptidil peptidasa Tripeptidil peptidasa	Liberación del dipéptido N-terminal Liberación del tripéptido N-terminal
3.4.15.-	Peptidil dipeptidasa	Liberación del dipéptido C-terminal
3.4.16.-	Carboxipeptidasa (serina)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.17.-	Carboxipeptidasa (metaló)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.18.-	Carboxipeptidasa (cisteína)	Liberación del residuo C-terminal
3.4.19.-	Omega peptidasa	Liberación de residuos modificados del N- o C-terminal
ENDOPEPTIDASAS 3.4.21.-	Endopeptidasas de serina	
3.4.22.-	Endopeptidasas de cisteína	
3.4.23.-	Endopeptidasas de aspártico	
3.4.24.-	Metaló-endopeptidasas	
3.4.99.-	Endopeptidasas de mecanismo catalítico desconocido.	

Algunas proteasas quedan fuera de esa clasificación estándar, por ejemplo las proteasas dependientes de ATP, las cuales requieren ATP para su actividad.

II.5.2.- Proteasas dependientes de ATP

Las proteasas dependientes de ATP no están incluidas en la clasificación estándar de proteasas. Las chaperonas moleculares y las proteasas dependientes de ATP juegan un papel central en redes regulatorias en todos los organismos vivos. Las chaperonas promueven actividades tales como maduración proteica, traslocación y síntesis de proteínas, plegamiento y ensamblaje de estructuras multiméricas. Las chaperonas estabilizan parcialmente a polipéptidos desplegados hasta que las condiciones sean favorables para su correcto plegamiento o asociación, de este modo se reduce la probabilidad de un plegamiento prematuro y la formación de estructuras inertes funcionales. Esta función es particularmente vital durante estrés, cuando el potencial de proteínas mal plegadas, la desnaturalización y agregación incrementan grandemente³⁴.

De igual importancia para la homeostasis celular se encuentran las proteasas dependientes de ATP. Por su eficiencia en degradar proteínas selectas, las proteasas ayudan a modular enzimas metabólicas claves y proteínas regulatorias, también remueven polipéptidos aberrantes procedentes de errores traduccionales y/o daños post-síntesis. La actividad de esas proteasas es vital durante estrés debido el incremento dramático de polipéptidos anormales los cuales son potencialmente tóxicos³⁴.

Familia proteica Clp/Hsp 100

Las proteínas Clp/Hsp 100 comprenden una nueva familia de chaperonas moleculares, presentes en todas las eubacterias y eucariontes. Las Clp-ATPasas son chaperonas moleculares clásicas, catalizan el desplegamiento de proteínas en una reacción dependiente de ATP, estas reacciones envuelven el desensamblaje de complejos proteicos y agregados. Esta familia puede ser dividida en dos grupos: las proteínas en el primer grupo contienen dos dominios de unión a ATP, como ClpA, ClpB, ClpC y ClpE, aunque difieren en tamaño y organización de secuencia, son altamente conservadas³⁵. El segundo grupo tiene sólo a dos miembros, ClpX y ClpY, los cuales difieren del primer grupo porque sólo tienen un dominio de unión a ATP. Siendo la familia proteica más novedosa, pequeño es el conocimiento acerca del papel de las proteínas Clp/Hsp 100 en diferentes organismos, o de sus modos específicos de acción de la chaperona.

Muchos estudios genéticos han mostrado que diferentes proteínas Clp/Hsp 100 son importantes y en muchos casos, con papeles esenciales pues participan en funciones celulares como la replicación del DNA, control de la expresión génica, tolerancia a estrés por calor y degradación de proteínas. Una característica adicional de la importancia de las proteínas Clp/Hsp 100 es su asociación con componente proteolítico (subunidades proteolíticas Clp P). En este complejo proteasa-Clp dependiente de ATP en el cual la subunidad chaperona es esencial para que se presente actividad proteolítica de ClpP, debido a que la subunidad ClpP por sí sola degrada pequeños péptidos muy lentamente, la unión selectiva a la proteína blanco es llevada a cabo por la chaperona y presentada a ClpP en un estado desplegado, preparada para la degradación³⁶.

La degradación de proteínas intracelulares es un proceso altamente controlado y regulado. Dentro del citoplasma de células bacterianas, gran parte de la degradación de proteínas es llevada a cabo por proteasas multiméricas de alto peso molecular dependientes de ATP (proteínas Clp). Esas proteasas tienen un núcleo proteolítico capaz de romper un amplio rango de enlaces peptídicos, esta actividad está dirigida sólo contra

proteínas anormales y un número limitado de proteínas nativas con una vida media corta³⁴. *E. coli* posee dos proteínas Clp: ClpA y ClpB³⁷. ClpA es expresada constitutivamente a temperaturas normales, parece estar envuelta en la regulación de proteólisis, ya que ClpA activa fuertemente a peptidasas ClpP (no homóloga con las otras proteínas Clp) en el corte ATP-dependiente de proteínas desnaturalizadas³⁸. El gen *clpB* de *E. coli* es un gen de choque térmico (heat shock)³⁹ que codifica para dos formas de ClpB: ClpB y ClpB'. ClpB' es una molécula troncada que es producida junto con ClpB por el uso de un sitio de iniciación traduccional alterno.

II.6.- Importancia de las proteínas secretadas con actividad proteolítica

Un campo prácticamente inexplorado con respecto a las proteínas que son secretadas por *M. tuberculosis*, es la producción de proteasas. Estas proteínas secretadas en el caso de otras bacterias, han sido ampliamente reconocidas como efectoras en la patología de enfermedades infecciosas como factores de virulencia⁴⁰.

El genoma de *M. tuberculosis* revela la presencia de un gran número y variedad de genes que potencialmente pueden codificar para proteasas, algunos de esos genes contienen información para proteasas que pueden ser secretadas al medio²⁷ sin embargo, el conocimiento acerca de la biología de esas enzimas con respecto a su contribución en patogénesis no ha sido determinada.

La sobrevivencia de las bacterias depende en gran medida de la disponibilidad de fuentes extracelulares de nutrientes, las bacterias se proveen de fuentes proteicas degradando proteínas extracelulares por la acción de proteasas que secretan. Durante una infección, la secreción de proteínas se ha tomado interesante, debido a que dichas proteasas lejos de cumplir una demanda nutricional, han sido asociadas con invasión y destrucción de tejidos, así como evasión y modulación del sistema inmune del hospedero al cual infectan⁴¹. Una característica importante es que la actividad de esas proteasas no es afectada por los inhibidores del hospedero, debido a que son capaces de inactivarlos permitiéndolo una proteólisis no regulada⁴¹.

Muchas especies de bacterias patógenas como *Pseudomonas sp*, *Serratia sp*, *Clostridium sp*, *Bacteroides sp*, *Porphyromonas sp*, *Staphylococcus sp* y *Streptococcus sp* producen y secretan proteasas las cuales de manera directa, participan en la patogénesis degradando proteínas importantes del hospedero o mimetizando la actividad de proteasas

reguladoras que controlan importantes sistemas zimógenos (coagulación, fibrinólisis, activación del complemento, entre otras) así como la inducción de la producción local de citocinas quimiotácticas, degradación de proteínas de defensa como IgG e IgA, destrucción de componentes de matriz extracelular como colágena, elastina y fibronectina que contribuye a una destrucción masiva del tejido⁴⁰.

La producción de proteasas que degradan colágena puede ser un factor importante en la etiología de algunas enfermedades. Algunos patógenos producen colagenasas que destruyen el tejido como por ejemplo *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis*, *Actinomadura (Streptomyces) madurae*, *Vibrio vulnificus*, *Bacillus anthracis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Porphyromonas gingivalis* y *Aspergillus fumigatus*^{42,43,44,45,46,47,48,49}.

Además de las enzimas colagenolíticas, otros tipos de proteasas también han sido asociados con potenciales patógenicos. *Staphylococci*, en particular *Staphylococcus aureus* produce varias proteasas extracelulares que incluyen proteasas de serina, cisteína y metaloproteasas. Su insensibilidad a inhibidores de proteasas humanos y su habilidad de inactivar algunos de ellos las marcan como potencialmente perjudiciales para el hospedero. Recientes estudios muestran que estas proteasas también son capaces de interactuar con algunos mecanismos de defensa, así como modificar factores de virulencia derivados de otros patógenos⁵⁰.

II.6.1.- Proteasas producidas por Micobacterias

Aunque el conocimiento sobre el papel de la proteólisis en la biología de algunos microorganismos patógenos ha sido ampliamente estudiado, sorprendentemente para el caso particular de micobacterias es escaso, sólo algunas proteasas han sido estudiadas en micobacterias, las cuales son: el proteosoma 20S y la proteasa Lon de *Mycobacterium smegmatis*^{51,52}, la subunidad ATPasa de la proteasa ClpC en *M. leprae*⁵³, y HtrA en *Mycobacterium avium* subespecie paratuberculosis⁵⁴. Homólogos del gen *lon* y del proteosoma 20S han sido identificados en genomas de *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare*. Homólogos del proteosoma 20S se han identificado también en genomas de *M. intracellulare*, *M. leprae* y *M. tuberculosis*⁵⁵. La función de esas proteasas con respecto a su contribución en la patogénesis no ha sido determinada.

II.6.2.- Proteasas producidas por *M. tuberculosis*

Varias proteínas exportadas y secretadas por *M. tuberculosis* han sido propuestas como factores de virulencia, algunas de las cuales promueven la incorporación de la bacteria al macrófago así como la sobrevivencia intracelular. Recientes estudios con actividades enzimáticas asociadas al filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* demuestran actividad catalítica (incluyen fosfatasa, fosfoamidasa, lipasa, esterasa y aminopeptidasa) que potencialmente pueden contribuir al progreso de la enfermedad⁵⁶ sin embargo, muchas de las actividades detectadas aún no han sido sujetas a una caracterización molecular o evaluación de su participación en la patogénesis.

El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv codifica para más de 30 proteasas, incluidos 6 genes que codifican para miembros de la familia de proteasas Clp dependientes de ATP²⁷. El conocimiento acerca de la biología de esas enzimas es muy escaso, en *M. tuberculosis* sólo pocas proteasas secretadas han sido estudiadas: metaloproteasa elastolítica, FtsH, MTB32A y MTB32B^{57,58,59}. Con respecto a las proteasas Clp, mediante el análisis del proteoma ha identificado a la proteasa ClpC en el extracto celular, y a ClpB tanto en extractos como en filtrados de cultivo⁶⁰.

El mecanismo de penetración a los tejidos y torrente sanguíneo por *M. tuberculosis* es pobremente entendido sin embargo, al igual que en otras enfermedades pulmonares, infecciones gastrointestinales y condiciones necróticas, es razonable asumir que la contribución de las proteasas es importante por ser capaces de distorsionar la matriz extracelular del epitelio pulmonar y vasos sanguíneos. Se ha confirmado la presencia de actividad colagenolítica en filtrados de cultivo de varias especies de micobacterias como *M. microti*, *M. avium*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium terrae*, *Mycobacterium goodii* y *Mycobacterium fortuitum*, aunque ninguna ha mostrado mayor actividad que *M. tuberculosis* H37Rv y algunos aislados de pacientes tuberculosos. La enzima responsable de esta actividad se identificó como una metaloproteasa de 75 KD dependiente de iones divalentes⁶¹.

Recientemente en *M. tuberculosis* H37Rv se identificaron las micosinas (proteasas de serina transmembranales) codificadas por 5 genes (*mycP1-mycP5*), han sido detectadas durante su crecimiento, son expresadas constitutivamente, lo cual sugiere que están involucradas en procesos celulares normales. Lo que resulta interesante es que los genes *mycP* están presentes en otras micobacterias virulentas (sólo un gen ha sido detectado en

la micobacteria no patógena *M. smegmatis*), por lo que es posible que tengan un papel importante como factores de virulencia⁶². Aunque la función de las micosinas durante el crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* no se conoce, Dave y colaboradores⁶³ encontraron que la micosina1 es expresada y procesada durante la infección en macrófagos, siendo localizada en la membrana, pared y envoltura celular. También han encontrado actividad proteolítica típica de subtilisinas en el filtrado de cultivo. La localización de estas micosinas puede sugerir que son importantes mediando la interacción con el hospedero, existiendo la posibilidad de que estén involucradas en la patogénesis.

En el presente trabajo, se analizó un filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* en el cual se detectó actividad proteolítica que de primera instancia (por su peso molecular) aparentemente es distinta a la detectada por otros grupos de trabajo, razón por la cual se propuso su caracterización y posible identificación.

III.- JUSTIFICACIÓN

El conocimiento sobre el papel de la proteólisis en la biología de algunos microorganismos patógenos ha sido ampliamente estudiado, no siendo así para el caso particular de micobacterias. En las bacterias patógenas, las proteasas extracelulares generalmente son factores de virulencia, las cuales contribuyen al desarrollo de las enfermedades.

El genoma de *M. tuberculosis* revela la presencia de un gran número y variedad de genes probables que codifican para proteasas, algunas de las cuales pueden ser secretadas sin embargo, sólo unas pocas han sido identificadas.

El desconocimiento sobre el papel que estas proteínas están desempeñando en la biología de esta bacteria y la posibilidad de que estén involucradas en patogénesis, las coloca como candidatas para una investigación exhaustiva.

IV. HIPÓTESIS

¿La actividad proteolítica detectada en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* representa la actividad de proteasas distintas a las ya descritas o sólo confirman la información que se tiene hasta el momento?

V. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Caracterizar las proteasas detectadas en el filtrado de cultivo de *Mycobacterium tuberculosis*

OBJETIVOS PARTICULARES

- Determinación del pH óptimo
- Determinación del punto isoelectrico
- Evaluar el efecto de los inhibidores específicos de proteasas
- Determinación del peso molecular
- Identificación de las proteasas por secuenciación

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa Micobacteriana. *Mycobacterium tuberculosis* cepa H37Rv (ATCC 27294) fue obtenida de American Type Culture Collection.

Cultivo de *M. tuberculosis* y preparación de proteínas del filtrado de cultivo (FC). *M. tuberculosis* fue cultivada en medio Middlebrook 7H11 (Difco), suplementado con OADC al 10% (ver anexo 1) durante 4 semanas a 37°C. Posteriormente, cultivada en medio Sauton (7 semanas a 37°C sin agitación). El medio de cultivo que contiene las proteínas del FC fue separado de la masa bacteriana por filtración a través de membranas con poros de 0.45 µm y 0.22 µm. Las proteínas fueron precipitadas con sulfato de amonio (80% saturación final) y centrifugado por 30 minutos a 10000 x g. El precipitado fue resuspendido en 5 ml de PBS 1X y dializado contra PBS 1X, concentrado con azúcar glass y finalmente dializado una vez más contra agua. Las alícuotas fueron almacenadas a -70°C hasta su uso.

Electroforesis en gel de poliacrilamida con gelatina como sustrato (SDS-PAGE-Gelatina). Las muestras proteicas obtenidas del FC fueron primeramente mezcladas con la solución amortiguadora de carga 2X sin β-mercaptoetanol (anexo 2) por 15 minutos a 37°C y separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 11% (anexo 3) copolimerizados con gelatina al 1% (la cual funciona como sustrato). La técnica fue realizada en condiciones desnaturalizantes a un voltaje constante de 130V.

Detección de regiones con actividad proteolítica. Una vez terminada la electroforesis, el gel fue lavado dos veces, el primer lavado se llevo a cabo con Tritón X-100 al 2.5% por 30 minutos en agitación a 4°C y el segundo con agua destilada por 10 minutos en agitación a temperatura ambiente. El gel fue colocado en la solución amortiguadora de incubación (Tris-HCl 100 mM, pH 8.0 y CaCl₂ 2.5 mM) durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Posteriormente teñido con amido negro 0.1% (anexo 4) y desteñido en una solución con metanol, ácido acético y agua destilada (50:10:40). La actividad proteolítica fue visualizada como bandas blancas que contrastan con el fondo negro.

Efecto de inhibidores de proteasas. El efecto inhibitorio en las proteasas fue determinado por la incubación de los geles en la solución amortiguadora Tris-HCl 100

mM, pH 8.0 y CaCl_2 2.5 mM agregándole el inhibidor de interés, durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. La inhibición de la actividad proteolítica fue estimada por comparación después de la tinción con muestras control (ausencia de inhibidores). Los inhibidores usados en este trabajo fueron: PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido), 1mM; TLCK (N-tosil-lisina clorometil cetona), 135 μM ; Aprotinina, 0.3 μM ; E-64 (N-(N-(L-3-Trans-car-boxirano-2-carbonil)-L-leucil)-agmatina), 28.0 μM ; EDTA, 2 mM; Pefabloc SC (4-(Aminoetil)-ben-zenesulfonil-flourido, hidrocloreto (AEBSF), 4 mM y Pepstatina, 1 μM (para mayor detalle veáse anexo 5). Los porcentajes de inhibición se determinaron de acuerdo a los valores obtenidos del análisis de los geles por densidad óptica en el programa Quantity One (Bio-Rad).

Determinación de pH óptimo. El efecto del pH fue determinado por la incubación de los geles en la solución amortiguadora Tris-HCl, 100 mM y CaCl_2 2.5 mM (ajustándole el pH a 7.0, 8.0 y 9.0); en la solución amortiguadora citrato de sodio 50 mM (pH 4.0, 5.0 y 6.0) y en la solución amortiguadora carbonato de sodio 200 mM (pH 10.0 y 11.0), durante toda la noche a temperatura ambiente en agitación. Los porcentajes de activación se determinaron de acuerdo a los valores obtenidos del análisis de los geles por densidad óptica en el programa Quantity One (Bio-Rad).

Estimación del peso molecular. Las muestras del FC fueron separadas electroforéticamente en geles SDS-PAGE-GELATINA empleándose marcadores de pesos moleculares preteñidos (Bio-Rad), el peso molecular fue determinado en el programa Quantity One (Bio-Rad).

Electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2-D PAGE) y transferencia de proteínas. Para la primera dimensión (enfoque isoeléctrico) se utilizaron las tiras Immobiline DryStrip pH 4-7L 18 cm (Amersham Pharmacia Biotech), las cuales fueron hidratadas en una solución de rehidratación con la solución amortiguadora IPG (anexo 6) durante toda la noche a temperatura ambiente. Las muestras proteicas (aproximadamente 100 μg del FC total) fueron solubilizadas en solución de rehidratación por 20 minutos y focalizadas en tres etapas: la primera durante 1 minuto a 500V, 2 mA, 5W; la segunda durante 1:30 minutos a 3500V, 2 mA, 5W y la tercera durante 5 horas a 3500V, 2 mA, 5W. El enfoque isoeléctrico fue llevado a cabo en la cámara Multiphor II Electrophoresis Unit (Amersham Pharmacia Biotech).

La segunda dimensión se llevó a cabo como se describió en la parte de electroforesis, con la única diferencia de no utilizar gelatina. La tira fue colocada en el gel concentrador y sellada con agarosa al 1%. Los geles obtenidos fueron transferidos a membranas de nylon y teñidos con azul de Coomassie (anexo 7). Aquellos puntos que coincidían con los puntos con actividad proteolítica fueron cortados de la membrana y secuenciados.

2-D PAGE con gelatina como sustrato. La electroforesis en dos dimensiones se llevó a cabo como se describió en la parte de 2-D PAGE, sólo que en la segunda dimensión se utilizó gelatina al 1%. Después de la corrida el gel fue sometido al método descrito en la parte de detección de regiones con actividad proteolítica.

Tinción inversa y extracción de bandas de proteólisis. Las muestras proteicas fueron separadas electroforéticamente como se describió en la parte de electroforesis, sin adicionar gelatina. El gel fue teñido con Imidazol-Zinc (anexo 8). Siguiendo el patrón de migración de las proteasas, se extrajeron del gel 3 regiones en las cuales migran las proteasas, a estas regiones se les retiró la tinción con ácido cítrico 2%, se neutralizaron con solución amortiguadora de transferencia 1X y fueron puestas en la solución amortiguadora de carga 2X. Para corroborar si las regiones contenían actividad proteolítica, fueron separadas electroforéticamente en SDS-PAGE-Gelatina. El gel fue sometido al método descrito en la parte de detección de regiones con actividad proteolítica. Por otra parte, las regiones extraídas del gel que mostraron actividad proteolítica fueron transferidas a una membrana de nylon y teñidas con azul de Coomassie. Las regiones fueron cortadas de la membrana y secuenciadas.

Secuenciación de proteínas Las regiones aisladas del gel teñido con Imidazol-Zinc fueron secuenciadas a partir del extremo amino-terminal. Los puntos extraídos de la membrana que coincidían con los puntos con actividad proteolítica fueron analizados por espectrometría de masas (MALDI-TOF, Amersham Pharmacia Biotech). Ambos análisis se llevaron a cabo en el GBF-SF, German National Research Center for Biotechnology, Braunschweig, 38124 Braunschweig, Germany.

VII. Resultados

VII.1.- Detección de regiones con actividad proteolítica. Las muestras proteicas obtenidas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida al 11% co-polimerizados con gelatina como sustrato. Tres regiones (bandas) con actividad proteolítica fueron detectadas cuando a los geles se les retiró el SDS con Tritón X-100 y fueron incubados en la solución amortiguadora Tris-HCl, pH 8.0 con CaCl₂, durante toda la noche a temperatura ambiente. La estimación del peso molecular de las tres bandas obtenida del programa Quantity One (Bio-Rad) fue la siguiente: la banda 1 con un peso superior a los 100 kD; banda 2 con un peso de 50.3 kD y la banda 3 con un peso de 47.3 kD (figura 1).

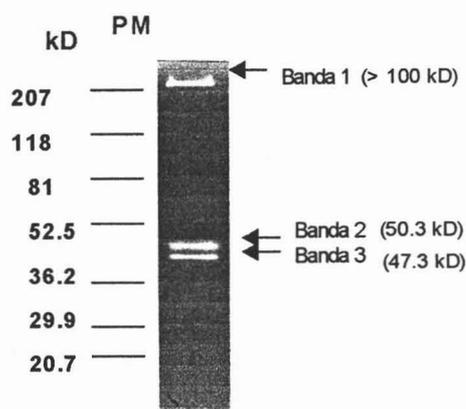


Figura 1. SDS-PAGE con gelatina como sustrato mostrando las regiones (bandas) con actividad proteolítica detectadas en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. A la izquierda los pesos moleculares.

VII.2.- Determinación del pH óptimo. La actividad proteolítica de las tres bandas fue detectada a distintos valores de pH probados (figura 2), sin embargo el porcentaje de activación fue distinto (Tabla 4). El porcentaje de activación relativo a cada pH probado fue determinado a través de la lectura de la densidad óptica de las bandas con actividad proteolítica, por medio del programa Quantity One (Bio-Rad).

La figura 3 muestra el porcentaje de activación para cada banda a cada pH analizado. Las lecturas de densidad óptica obtenidas para las tres bandas a pH 9 se tomaron como el 100 %, siendo los valores más altos obtenidos y por lo tanto designado como pH óptimo (carril 6). A pH 8 (carril 5), el porcentaje de activación obtenido fue, 97.3% para la banda 1, 92% banda 2 y 92.3% banda 3, valores cercanos al 100% de activación. A pH 7 la actividad proteolítica de las tres bandas también se favoreció, 81% banda 1, 61% banda 2

y 59.6% banda 3 (carril 4), aunque fue menor a los dos anteriores. Con pH 10 y 11 los valores obtenidos fueron similares a pH 7 (carril 7 y 8 respectivamente). A pH 4, 5 y 6 (carril 1, 2 y 3 respectivamente), el porcentaje de activación fue inferior a los obtenidos con valores de pH básicos.

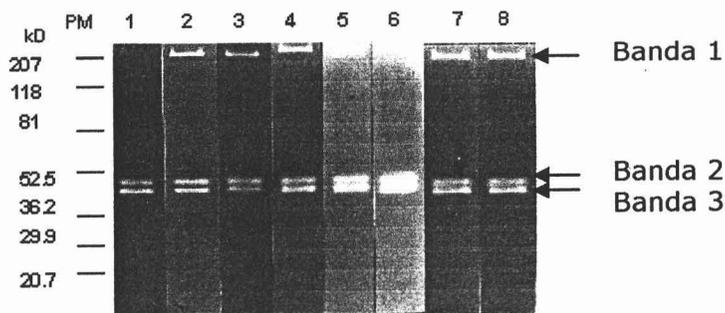


Figura 2. Determinación del pH óptimo de las proteasas detectadas en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. a) SDS-PAGE con gelatina como sustrato mostrando la actividad proteolítica de las tres regiones (bandas) sometidas a diferente pH. Carriles: 1. pH 4.0; 2. pH 5.0; 3. pH 6.0; 4. pH 7.0; 5. pH 8.0; 6. pH 9.0; 7. pH 10.0; 8. pH 11.0. A la izquierda los pesos moleculares.

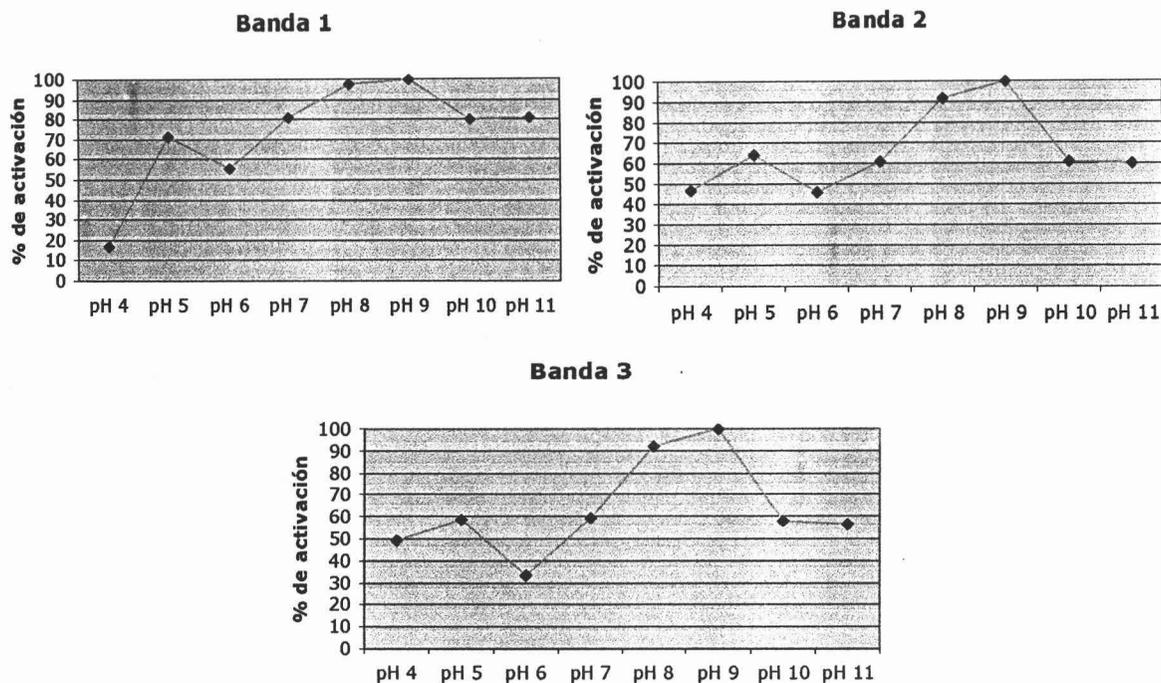


Figura 3. Porcentaje de activación relativo a cada pH probado. Los valores de densidad óptima más altos fueron designados como el 100% de activación (pH 9), a partir de los cuales se designaron los porcentajes de activación restantes para cada banda en particular.

Tabla 4. Determinación del pH óptimo.

pH	Banda	D.O.	% de activación
4	1	45.1198	16.3083654
	2	117.5290	46.3880518
	3	128.7980	49.0736631
5	1	198.2602	71.6603305
	2	162.8363	64.2705947
	3	154.9690	59.0451443
6	1	154.4790	55.8357966
	2	117.0166	46.1858103
	3	87.4304	33.3120855
7	1	224.5751	81.1717425
	2	154.7322	61.0719508
	3	156.3149	59.5579492
8	1	269.3171	97.3435536
	2	233.1633	92.0282759
	3	242.3543	92.3400461
9	1	276.6666	100
	2	253.3605	100
	3	262.4585	100
10	1	222.5124	80.4261881
	2	153.6528	60.6459176
	3	152.2541	58.0107331
11	1	223.2541	80.6942725
	2	152.6524	60.2510652
	3	149.2584	56.8693336

VII.3.- Efecto de los inhibidores en la actividad proteolítica. La figura 4 se muestra el efecto de los diferentes inhibidores sobre la actividad proteolítica de las tres bandas. La tabla 5 muestra el porcentaje de inhibición relativo para cada inhibidor probado. El porcentaje de inhibición relativo se determinó mediante la lectura de la densidad óptica (D.O.) de las bandas con actividad proteolítica, por medio del programa Quantity One (Bio-Rad). Los valores de densidad óptica obtenidos del experimento control (sin inhibidor), fue el valor correspondiente al 0% de inhibición, a partir de los cuales se designó cada porcentaje de inhibición para cada banda en particular.

El efecto de E-64 y Pepstatina en la actividad proteolítica de las tres bandas fue prácticamente nulo, debido a que los porcentajes de inhibición relativa no superan el 2% (carril 2 y 3 respectivamente). Pefabloc mostró un gran efecto sobre la actividad de la banda 1 y 3, 46.1% y 43% respectivamente. Con TLCK también se observó un efecto sobre la actividad de la banda 1 y 3 con un porcentaje alto, 37% y 44.6% respectivamente (carril 5). El efecto inhibitor de Aprotinina sobre la banda 3 fue mayor (49.4%), con respecto a las bandas 1 y 2 (carril 6). Con PMSF la actividad de las tres bandas fue inhibida con 18.5% banda 1, 58.2% banda 2 y 61.3% banda 3 (carril 7). EDTA (carril 8) mostró la mayor inhibición sobre la actividad proteolítica de las tres bandas que cualquier otro inhibidor probado, 46.7% banda 1, 69.2% banda 2 y 73.7% banda 3 (figura 5).

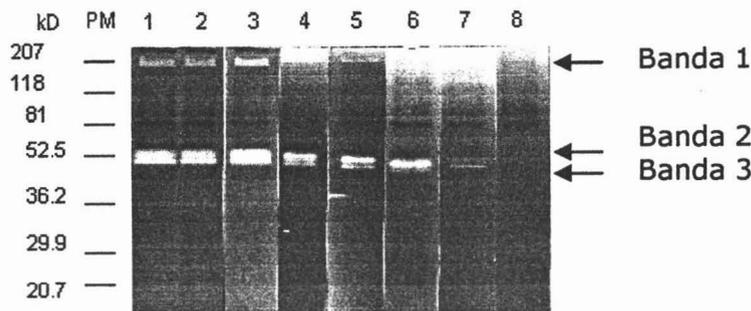


Figura 4. Efecto de los inhibidores sobre la actividad proteolítica detectada en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*. SDS-PAGE con gelatina como sustrato incubado con los diferentes inhibidores de proteasas. Carriles: 1. Sin inhibidor; 2. E-64, 0.28 uM; 3. Pepstatina, 1 uM; Pefabloc, 4mM; 5. TLCK, 135 uM; 6. Aprotinina, 0.3 uM; 7. PMSF, 1 mM; 8. EDTA, 2 mM. A la izquierda los pesos moleculares.

VII.4.- Detección de puntos con actividad proteolítica por electroforesis bidimensional. Las proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* fueron separadas electroforéticamente en 2-D PAGE con gelatina como sustrato. Para la primera dimensión (enfoque isoelectrico) se utilizó el rango de pH 3-10. Posterior a la segunda dimensión, al gel obtenido se le retiró el SDS con Tritón X-100 y fue incubado en la solución amortiguadora Tris-HCl 100 mM pH 8.0, durante toda la noche a temperatura ambiente. Seis puntos con actividad proteolítica fueron detectados, con un punto isoelectrico entre pH 4 y 5. Tres puntos presentaron un peso molecular 50.3 kD, con punto Isoelectrico distinto, los otros tres puntos presentaron un peso molecular de 47.3 kD, con punto isoelectrico distinto también, sin embargo similar a los tres puntos de 50.3 kD, es decir,

cada punto de 50.3 kD parece corresponder con un punto de 47.3 kD (figura 4). Los puntos detectados corresponden a las bandas 2 y 3 (50.3 y 47.3 kD respectivamente) detectadas en SDS-PAGE-Gelatina (véase figura 1). La banda 1 no pudo ser detectada por esta técnica.

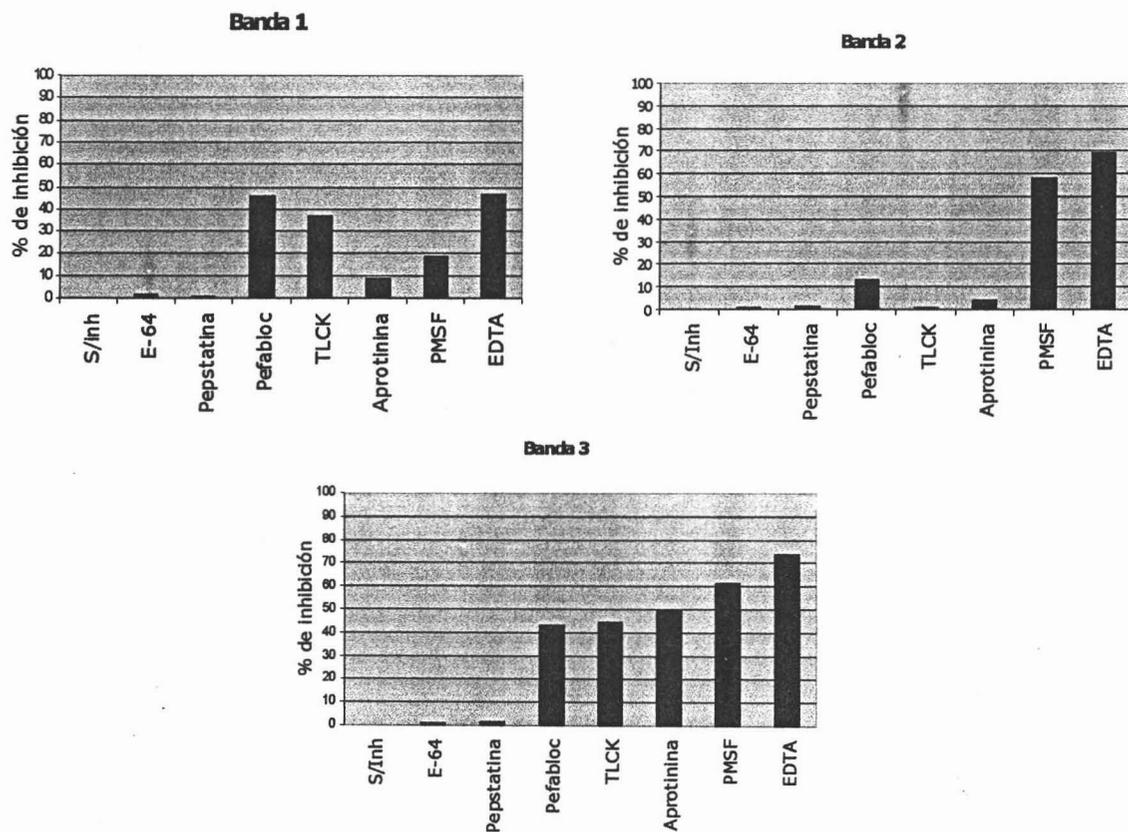


Figura 5. Porcentaje de inhibición sobre la actividad proteolítica de las tres bandas para cada uno de los inhibidores probados. Los valores de densidad óptica obtenidos del experimento control (sin inhibidor), fue el valor correspondiente al 0% de inhibición, a partir del cual se designó el porcentaje de inhibición para cada banda en particular.

Tabla 5. Efecto de los inhibidores en la actividad proteolítica de las tres bandas detectadas en el filtrado de *M. tuberculosis*.

Inhibidores	Concentración de uso	Banda	D.O.	% de inhibición
Sin inhibidor	-	1	264.2935	0
		2	208.3794	0
		3	241.6474	0
E-64	0.28 uM	1	260.2542	1.52833876
		2	206.3913	0.95407703
		3	239.6252	0.83683913
Pepstatina	1 uM	1	262.5241	0.66948298
		2	205.1563	1.54674598
		3	238.6235	1.25136873
Pefabloc	4 mM	1	142.4618	46.09712308
		2	180.4047	13.4248875
		3	137.9180	42.9259326
TLCK	135 uM	1	166.2848	37.08328052
		2	206.3913	0.95407703
		3	133.7709	44.6421108
Aprotinina	0.3 uM	1	241.0252	8.803962262
		2	199.1259	4.44069807
		3	122.2217	49.4214711
PMSF	1 mM	1	215.2595	18.55285885
		2	87.1883	58.1588679
		3	93.5488	61.2870654
EDTA	2 mM	1	140.4361	46.86358159
		2	64.0849	69.2460483
		3	63.4354	73.7487761

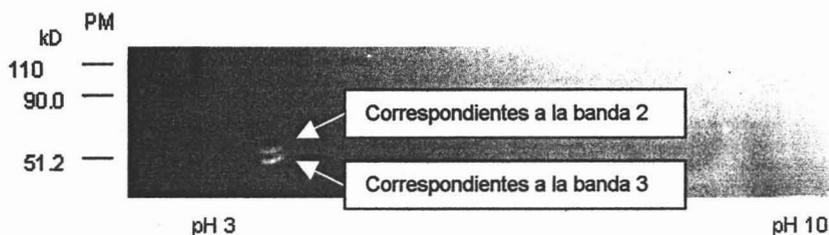


Figura 6. Puntos con actividad proteolítica detectados en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* por electroforesis bidimensional. 2-D PAGE con gelatina como sustrato mostrando los puntos detectados con actividad proteolítica, focalizados entre pH 4 y 5, los cuales por su patrón de migración en gel corresponden a la bandas 2 y 3 detectadas por electroforesis de una dimensión.

VII.5.- Electroforesis bidimensional, transferencia de proteínas y 2-D PAGE con gelatina como sustrato. El filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* fue separado electroforéticamente en 2-D PAGE, transferido a una membrana de nylon y teñida con azul de Coomassie. A la par, el filtrado de cultivo fue separado en 2-D PAGE con gelatina como sustrato, sometiendo al gel al lavado con Tritón y colocado en la solución amortiguadora de incubación durante toda la noche a temperatura ambiente, para visualizar los puntos con actividad proteolítica. Al comparar las dos electroforesis bidimensionales, se logró detectar en la membrana teñida con Coomassie seis puntos que coincidían con los puntos con actividad proteolítica (figura 5). Los puntos fueron cortados de la membrana y secuenciados.

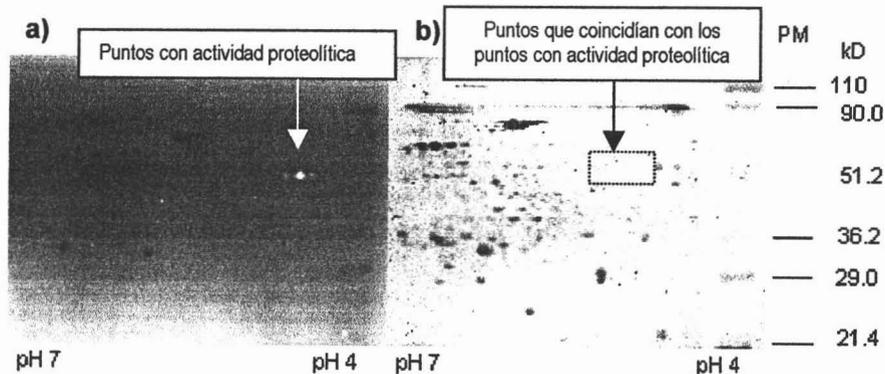


Figura 5. Puntos detectados en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* por electroforesis bidimensional. a) 2-D PAGE con gelatina como sustrato en el que se muestran los puntos con actividad proteolítica. En la parte inferior el rango de pH utilizado. b) 2-D PAGE teñido con Coomassie en donde se muestra la región correspondiente a los puntos que coincidían con los puntos hidrolizados del gel en el inciso a) de acuerdo a su patrón de migración, los cuales fueron cortados y secuenciados. En la parte inferior el rango de pH utilizado. A la derecha los pesos moleculares.

VII.6.- Secuenciación de proteínas. Las regiones cortadas del gel teñido con Imidazol-Zinc (a la altura de 50 y 47 kD) y transferidas a una membrana de nylon fueron secuenciadas. El análisis de la secuencia del extremo amino terminal permitió obtener la secuencia parcial de los siguientes aminoácidos (P E I R P Y H L L), este dato fue incorporado a la base de datos del Tuberculist Web Server (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) del cual se identificó a dicha secuencia como parte del extremo amino terminal de la secuencia completa de la proteína CLPB MYCTU (figura 6), la cual está identificada como probable endopeptidasa de unión a ATP. Es una proteína de choque térmico (heat shock), referida como ClpB, producto del gen *clpB* (Rv 0384c) de *M. tuberculosis*, compuesta de 848 aminoácidos, con una masa molecular teórica de 92536 y un punto isoeléctrico de 4.9752. La proteína ClpB está compuesta de varios dominios, un dominio amino-terminal (1-160); dos dominios de unión a ATP: dominio 1(161-410); dominio 2(531-724), los cuales están separados por una región espaciadora (411-530). Ambos dominios de unión a ATP contienen el motivo Walker A (²⁰⁶GX₄GKT²¹³ y ⁶⁰⁷GX₄GKT⁶¹⁴) y Walker B (²⁷⁷DE²⁸⁰ y ⁶⁷⁸DE⁶⁸¹), motivos propuestos para la unión e hidrólisis de ATP; un dominio SSD carboxilo terminal que contiene el motivo GAR (⁸⁰³GAR⁸⁰⁵), propuesto como sensor del estado del nucleótido que está unido al motivo de unión a ATP, mediando el cambio conformacional del dominio carboxilo-terminal.

```

1 mdsfnpttkt qaaltaalqa astagnpeir pahllmallt qndgiaapll eavgvepatv
61 raetqrllldr lpqatgastq pqlsreslaa ittaqqlate lddeyvsteh vmvglatgds
121 dvaklltghg aspqalreaf vkvrgsarvt spepeatyqa lqkystdlta raregkldpv
181 igrdneirrv vqvlsrrtkn npvligepgv gktaivegla qrivagdvpe slrdktival
241 dlgsmvagsk yrgefeerlk avlddiknsa gqiitfidel htivgagatg egamdagnmi
301 kpmlargelr lvgattldey rkhiedaal errfqqvyvg epsvedtigi lrglkdryev
361 hhgvritdsa lvaaatlsdr yitarflpdk aidlvdeas rlrmeidsrp veideverlv
421 rrleieemal skeedeasae rlaklrsele dqkeklaelt trwqneknae eivrdlkeql
481 ealrgesera erdgdlakaa elrygripev ekkldaalp aqareqvmlk eevgpddiad
541 vvsawtgipa grllegetak llrmedelgk rvigqkaavt avsdavrrsr agvsdprprt
601 gafmflgptg vgktelakal adflfddera mvridmseyg ekhtvarlig appgyvgyea
661 ggqlteavrr rpytvvlfde iekahpdvfd vllqvldegr ltdghgrtvd frntililts
721 nlgsggsaeq vlaavratfk pefinrlddv lifeglnpee lvrivdiqua qlgkrilaqr
781 lqlqvslpak rwlaqrgfdp vygarplrrl vqqaigdqla kmllagqvhd gdtvpvnvsp
841 dadslilg

```

Figura 6. Secuencia de aminoácidos de la proteína ClpB de *M. tuberculosis*. Subrayado en negritas la secuencia de aminoácidos obtenida del análisis de secuenciación del extremo amino-terminal. ClpB está compuesta de varios dominios, un dominio amino-terminal (en color café); dos dominios de unión a ATP (en color negro), los cuales están separados por una región espaciadora (en color azul). Ambos dominios de unión a ATP contienen el motivo Walker A (²⁰⁶GX₄GKT²¹⁴ y ⁶⁰⁷GX₄GKT⁶¹⁵) y Walker B (²⁷⁷DE²⁸⁰ y ⁶⁷⁸DE⁶⁸¹), ambos en color rojo; un dominio SSD carboxilo terminal (en color verde) que contiene el motivo GAR (⁸⁰³GAR⁸⁰⁵) en color rosa.

De los puntos cortados del gel bidimensional (Figura 5b) y analizados por espectrometría de masas no se logró obtener ningún dato que pudiera darnos algún resultado.

La búsqueda de dominios conservados en la secuencia de la proteína ClpB mostró que esta proteína comparte algunos dominios con otras proteínas también dependientes de ATP, presentes tanto en eucariontes como procariontes. Los dominios conservados que la proteína ClpB de *M. tuberculosis* comparte con esas otras proteínas, son los motivos de unión a ATP (figura 7), a excepción de la proteína SbcC (una ATPasa involucrada en la reparación de DNA), la cual comparte sólo la región espaciadora (aminoácidos 411-530).

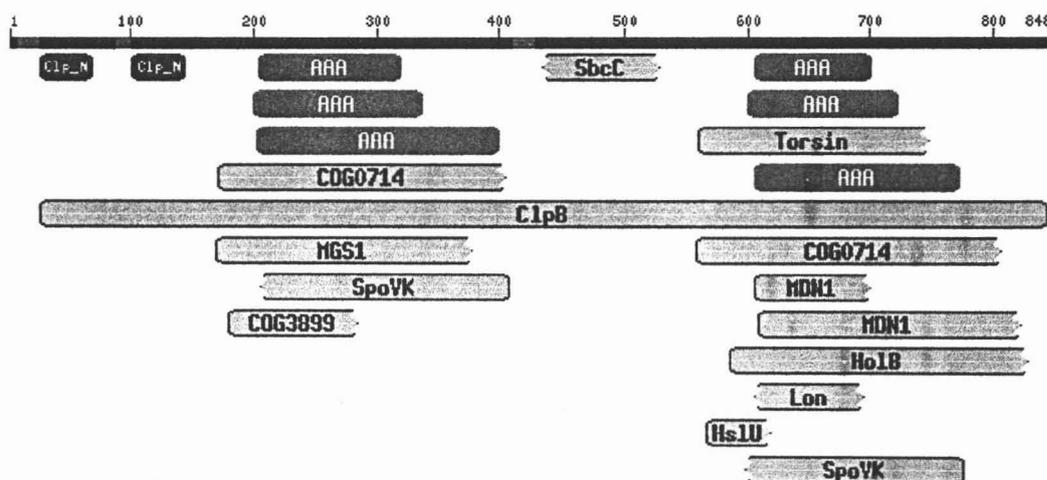


Figura 7. Dominios conservados en la secuencia de la proteína ClpB de *M. tuberculosis*. La figura muestra los dominios que ClpB comparte con otras proteínas dependientes de ATP.

Para determinar si la proteína ClpB contenía en su secuencia aminoacídica un péptido señal potencial, así como un sitio de corte, la secuencia de los primeros 70 aminoácidos ubicados en el extremo amino-terminal fue analizada en el programa SignalP V3.0 Server (<http://tbsp.phri.org/methodframe.html>). Los resultados del análisis mostraron un probable sitio de corte potencial entre la posición 32 y 33. La probabilidad obtenida que pudiera indicar que dichos aminoácidos forman parte de un péptido señal estándar fue muy baja (0.025), debido a ello, con la predicción del programa, éste no reconoce a dicha secuencia como un péptido señal, aunque sí presenta un sitio de corte.

VIII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se identificaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con gelatina como sustrato, 3 bandas con actividad proteolítica en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (la banda 1 con un peso superior a los 100 kD; la banda 2 con un peso de 50.3 kD y la banda 3 con un peso de 47.3 kD). Este método sensible, además de un análisis rápido, permitió la caracterización preliminar de las enzimas proteolíticas estables en SDS, así como el estudio simultáneo del efecto de una variedad de condiciones experimentales, por el simple cambio de composición de la solución amortiguadora de incubación.

Con el fin de determinar a que clase de proteasas correspondía la actividad proteolítica observada en cada una de las bandas, se utilizaron inhibidores específicos. Se observó la inhibición parcial de la actividad proteolítica de las tres bandas cuando se utilizaron los inhibidores de proteasas de serina: Pefabloc, TLCK, Aprotinina y PMSF, indicando estos resultados que la actividad proteolítica pertenecía a proteasas de este tipo. La mayor inhibición en la actividad proteolítica de las tres bandas se observó cuando se utilizó EDTA (inhibidor específico de metaloproteasas).

Algunas proteasas de serina son dependientes de calcio, el EDTA al “secuestrar” este ión puede, al igual que los inhibidores de serina, reducir eficazmente la actividad de las proteasas. La actividad de la banda 1 fue observada sólo en presencia de calcio, el cual fue incluido a la solución amortiguadora de incubación. Con EDTA su actividad fue reducida drásticamente, lo que indicó que la (o las) proteasa (s) correspondiente a esta banda es dependiente de calcio.

La actividad de las bandas 2 y 3 fue visualizada sin la adición de calcio a la solución amortiguadora de incubación, lo que pudiera indicar que su inhibición por EDTA no fue por la ausencia de calcio, sino por algún otro ión o metal (como Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+}), que pueda unirse al inhibidor y no estar disponibles para al enzima.

Es posible también que las bandas proteolíticas estén compuestas de ambas clases de proteasas, es decir, tanto de la clase serina como metaloproteasas, debido a la doble inhibición.

Así, con base a la sensibilidad a los mismos inhibidores y actividad similar a un pH específico (pH 8 y 9), es posible asumir que las tres bandas pertenecen a la misma clase de proteasas (serina), una de ellas dependientes de calcio (banda1), las dos restantes de algún otro ión (bandas 2 y 3).

Para determinar si las bandas observadas están compuestas por una o más proteasas, el FC de *M. tuberculosis* fue analizado en una electroforesis bidimensional, la cual permitió detectar seis puntos con actividad proteolítica, focalizados en el pH ácido, los cuales por su patrón de migración se corresponden a las bandas 2 y 3, la banda 1 no pudo ser detectada por esta técnica. Tres de los puntos presentaron el mismo peso molecular, 50.3 kD (banda 2), con punto isoelectrico distinto, aunque muy cercano entre ellos. Los otros tres puntos restantes también presentaron el mismo peso molecular, 47.3 kD (banda 3), con punto isoelectrico distinto también. Ambos conjuntos de puntos fueron detectados entre pH 4 y 5. Por su disposición en cuanto a peso molecular y punto isoelectrico es posible que se traten de isoformas.

Para identificar a las proteasas, se extrajeron del gel de poliacrilamida las bandas que se correspondían con la actividad proteolítica, con el objetivo de separarlas del conjunto de proteínas presentes en el FC. Estas bandas fueron sometidas al análisis de la secuencia del extremo amino terminal, con este análisis (sólo se logró secuenciar la banda 3) se identificó a la proteína ClpB, una proteína de choque térmico, análoga a la proteína ClpB de *E. coli*, mostrando 54 % de identidad.

Teóricamente ClpB de *M. tuberculosis* presenta un peso molecular de 92 kD²⁷; la banda secuenciada identificada como ClpB migró en el gel de poliacrilamida aproximadamente a 50 kD, lo cual no coincide con el peso teórico esperado, según su secuencia.

El análisis de la secuencia del extremo amino terminal permitió obtener la secuencia parcial de unos cuantos aminoácidos (P E I R P Y H L L). El primer aminoácido prolina (P), en la secuencia completa de la proteína ClpB se encontró ubicado en la posición 27 con respecto al aminoácido metionina, el cual inicia dicha secuencia (véase Figura 6), por lo que se pensó que los aminoácidos faltantes podrían corresponder a un péptido señal, cortado cuando la proteína fue secretada al medio extracelular. Para determinar si contenía un péptido señal potencial, así como un sitio de corte, la secuencia completa de aminoácidos de la proteína ClpB fue analizada en el programa SignalP V3.0 Server (<http://tbsp.phri.org/methodframe.html>); estos datos nos darían una idea de que esta proteína fue secretada al medio extracelular por una vía de secreción secuencia dependiente. El resultado del análisis mostró un sitio con mayor probabilidad de corte entre la posición 32 y 33, lo que indicaba que al menos los primeros 32 aminoácidos podrían ser parte de un péptido señal, contrario al dato obtenido por secuenciación, el cual indicó que la secuencia comenzaba a partir del aminoácido prolina, en la posición 27,

de esta manera, el probable péptido señal (en el caso de que estuviera presente) lo conformarían por lo menos los primeros 26 aminoácidos faltantes y no los 32, como lo predijo el programa.

Es muy importante tomar en cuenta que en los datos obtenidos del programa, se identificaron otros sitios de corte con menor probabilidad y uno de ellos coincide con el inicio de la secuencia obtenida del análisis del extremo amino. La predicción de la presencia de un péptido señal como tal en el extremo amino terminal, se obtuvo del mismo programa, e indicó que los aminoácidos analizados aparentemente no son parte de una secuencia señal.

La vía de secreción de proteínas denominada secuencia dependiente, requiere la presencia de una secuencia señal, la cual es agrupada en tres clases: clase 1, 2 y 3. Las secuencias clase 1 no muestran homología en su secuencia de aminoácidos, sin embargo a nivel estructural comparten tres características altamente conservadas: 1.- Un extremo amino terminal cargado positivamente (dominio N, 1-5 aminoácidos); 2.- Al menos seis aminoácidos hidrofóbicos (dominio H, 7-15 aminoácidos); y 3.- Una región carboxilo terminal polar no cargada (dominio C, 3-7 aminoácidos), en la cual se encuentra localizado sitio de corte⁶⁴. El extremo amino terminal faltante (26 aminoácidos) de la secuencia de la proteína ClpB de *M. tuberculosis* presenta dichas características estructurales; el amino terminal cargado positivamente está representado por los aminoácidos MDSFNPTTKTQ, de los cuales el aminoácido Lisina (K) es el que confiere al dominio-N la carga positiva. El dominio-H, lo conforman los aminoácidos AALTAALQAA, con características hidrofóbicas y la región carboxilo terminal compuesta por STAGN, de los cuales (según el análisis de la secuenciación del extremo amino terminal), el sitio de corte se localiza en el aminoácido asparagina (N), como puede corroborarse en la figura 6.

No se puede descartar que la vía de secreción por la cual dicha proteína esté siendo secretada, no sea dependiente de secuencia, sino independiente dado que en el filtrado de cultivo (FC) de *M. tuberculosis* también se han encontrado proteínas que no contienen una secuencia señal (tabla 3)²⁵.

La falta de los primeros 26 aminoácidos en la secuencia del extremo amino-terminal pudieron ser eliminados por algún corte inespecífico llevado a cabo por una proteasa presente en el medio de cultivo. La ausencia de los 26 aminoácidos iniciales, pudo afectar el peso molecular de la proteína, reduciéndolo. Sin embargo, la reducción no sería tan

pronunciada, hasta el punto de que la proteína migrara aproximadamente a 50 kD. Como se mencionó anteriormente, la secuencia parcial obtenida fue de sólo unos cuantos aminoácidos ubicados en el extremo amino terminal, es por ello que no es posible determinar si la proteína ClpB presente en el filtrado de cultivo se encuentra completa. En otras palabras, la proteína pudo haber sufrido otro corte proteolítico adicional en la secuencia restante (que al parecer no afecta su actividad), lo que le restaría tamaño reduciendo aún más su peso molecular, esto pudiera explicar por qué el peso molecular de la proteína detectada en el gel es tan bajo.

Las proteínas llamadas chaperonas están implicadas en numerosos procesos en las células bacterianas, asisten el plegamiento y la secreción de proteínas, además de prevenir su agregación en condiciones de estrés por calor. Aunado a esto, reparan proteínas que han sido dañadas o mal plegadas⁶⁵. ClpB es una chaperona dependiente de ATP, perteneciente a la familia Hsp100 de ATPasas asociadas con diversas actividades celulares (AAA+)⁶⁶. A diferencia de otras Hsp100, ClpB es la única que aparentemente no interacciona con la subunidad proteolítica ClpP, subunidad que le confiere actividad de proteasa, por lo que algunos autores han propuesto que ClpB no es capaz de degradar directamente sustratos proteicos, y al parecer sólo tiene actividad de chaperona⁶⁷. La ausencia del motivo [LIV]-G-[FL] en ClpB, un tripéptido involucrado en la interacción de las Clp-ATPasas con ClpP, es una de las evidencias propuestas para explicar porque ClpB no interacciona con ClpP⁶⁸. Es posible que otro componente proteolítico semejante a ClpP aún no identificado, pueda asociarse de manera distinta con ClpB en la formación de un nuevo tipo de complejo de proteasas dependientes de ATP. Por la similitud de la secuencia de ClpB con ClpA (subunidad de la proteasa ClpA-ClpP), particularmente de los motivos de unión a ATP, otros autores sugieren que al igual que ClpA, la proteína ClpB puede tener un papel importante en procesos proteolíticos dependientes de ATP³⁹.

El papel funcional y sustrato proteico potencial de ClpB son desconocidos. La expresión de esta proteína es esencial para la sobrevivencia de algunas bacterias a altas temperaturas⁶⁹; coopera con otro grupo de chaperonas (DnaK/DnaJ/GrpE) para rescatar proteínas mal plegadas de estados de pre-agregación reversibles⁷⁰.

Tanto el gen *clpB* como *clpP*, están bajo el control del producto del gen *hspR* y el factor sigma H (sigH)⁷¹, ambas proteínas están involucradas en la respuesta de estrés por calor. ClpP ha sido identificada también como proteína de choque térmico⁷²; es probable que la

proteína ClpB y ClpP u otro componente proteolítico formen un complejo durante el choque térmico bajo condiciones específicas que aún no han sido determinadas, lo que explicaría el por qué dicho complejo no se ha observado *in vitro*⁷³. Si la actividad proteolítica detectada en los geles de poliacrilamida es el resultado de la formación de dicho complejo⁷⁴, entonces es posible que nos encontremos ante un fenómeno diferente al descrito para ClpB en otros organismos, en el cual este complejo sea participe en procesos proteolíticos dependientes de ATP³⁹, aunque esto no es muy probable si tomamos en cuenta que el análisis de la estructura de ClpB de *E. coli* mostró que esta proteína forma un heptámero⁷⁵, sumado además el componente proteolítico (que en el caso de ClpP también forma un heptámero), resulta un complejo con un peso molecular muy grande. El peso molecular teórico de ClpB de *M. tuberculosis* es de 92 kD; particularmente para esta proteína no se ha determinado aún si forma una estructura similar. Sí se pliega de la misma manera que la descrita para la ClpB de *E. coli* (cada subunidad del heptámero sería de 92kD, más el componente proteolítico), entonces no es posible que un complejo de tal peso molecular se pudiera detectar en los geles utilizados en este estudio. Con todo esto podemos concluir que la actividad proteolítica detectada en los geles no es producto de la participación de dicho complejo proteolítico.

La actividad proteolítica de la proteína ClpB, hasta este momento, no ha sido comprobada. Recientemente se demostró que la degradación eficiente de proteínas mitocondriales (la cual es dependiente de ATP) en *Saccharomyces cerevisiae* es mediada por la presencia de la chaperona Hsp78⁷⁶. La proteína Hsp78 es homóloga a ClpB, y presenta funciones similares en termotolerancia y protección en estrés⁷⁷ pero sin función proteolítica aparente.

Algunos autores han propuesto que la degradación dependiente de Hsp78 está mediada por la proteasa Pim1/LON, de manera que la proteína Hsp78 coopera funcionalmente con esa proteasa “preparando” a las proteínas sustrato para su degradación (cooperación chaperona-proteasa), evidenciando que la degradación no es directamente por Hsp78⁷⁸. Esta cooperación de las chaperonas Clp/Hsp100, específicamente las del subtipo ClpB con sistemas proteolíticos, es un primer acercamiento al hecho de que este tipo de chaperonas tienen un papel importante en procesos proteolíticos dependientes de ATP, ampliando su funcionalidad más allá de su exclusividad como ATPasas, dado que a las proteínas ClpB sólo han sido implicadas en la reactivación de polipéptidos agregados⁷⁰ y no en proteólisis como tal, así, su participación en proteólisis podría representar un nuevo aspecto funcional para esta clase de chaperonas.

El mecanismo de acción de la proteína ClpB de *M. tuberculosis* aún no se conoce, sin embargo, es posible que al igual que la proteína Hsp78 de *S. cerevisiae*, coopere con algún sistema proteolítico o proteasas para la degradación de polipéptidos, de esta manera se pudiera explicar la presencia de ClpB en la región (banda) secuenciada, donde se detectó la actividad proteolítica.

Tomando en cuenta que la proteína ClpB de *M. tuberculosis* es secretada al medio extracelular, característica hasta este momento única en esta bacteria⁶⁰, es posible que la función llevada a cabo por esta proteína sea también única y el hecho de encontrarla por secuenciación en la banda correspondiente a la actividad proteolítica nos lleva a especular dos posibles funciones: la primera, que ClpB esté cooperando con algún sistema proteolítico o proteasa extracelular en la degradación del sustrato o que por sí sola presente actividad proteolítica. Es posible también que las dos especulaciones estén erradas, debido a que no existe evidencia suficiente que respalde dichas afirmaciones, por lo que no se puede descartar el hecho de que la proteína ClpB haya sufrido un corte por una proteasa presente en el medio de cultivo, lo que la llevó a caer en el peso de 50 kD en el gel, migrando conjuntamente con otra proteasa aún no identificada, que posiblemente sea la responsable de la degradación del sustrato.

Las enzimas proteolíticas secretadas por bacterias son muy importantes, debido a que las bacterias se proveen de fuentes proteicas degradando proteínas extracelulares con la ayuda de esas proteasas. Posiblemente las proteasas detectadas en este trabajo cumplan una función nutricional, aunque es válido pensar también que, al igual que muchas bacterias patógenas que secretan proteasas que muestran un alto potencial de aumento en la patogénesis⁴⁰, las proteasas secretadas por *M. tuberculosis* detectadas en este trabajo presenten un papel similar, es por ello que es muy importante definir la función y regulación de dichas enzimas, pues representa una aproximación útil hacia el análisis de la fisiología de patógenos micobacterianos.

La localización de ClpB en el medio extracelular abre una puerta para investigar a fondo el posible papel en el que esta proteína pudiera estar involucrada. Posiblemente como proteína de estrés, represente un factor imprescindible para la sobrevivencia de la bacteria durante condiciones desfavorables dentro del hospedero.

Con los resultados obtenidos en este trabajo es factible mencionar que la actividad proteolítica detectada no corresponde con la información obtenida hasta el momento, por lo que las proteasas encontradas representan a otras proteínas secretadas al medio de cultivo, con ello aumentando la lista de proteínas liberadas por la micobacteria durante su crecimiento *in vitro*.

IX. CONCLUSIONES

Tres regiones (bandas) con actividad proteolítica de más de 207 kD (banda 1), 50.3 kD (banda 2) y 47.3 kD (banda 3) fueron detectadas en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*.

La actividad proteolítica de las tres bandas fue detectada a cualquier valor de pH probado, sin embargo la mayor actividad se presentó a pH 8 y 9.

La inhibición de la actividad proteolítica de las tres bandas fue observada cuando se utilizaron Pefabloc, TLCK, Aprotinina y PMSF, inhibidores de proteasas de serina, indicando que la actividad proteolítica está dada por proteasas de este tipo, una de ellas dependientes de calcio (banda1), las dos restantes de algún otro ión (banda 2 y 3) por su inhibición con EDTA.

Seis puntos con actividad proteolítica fueron detectados por medio de una electroforesis bidimensional, todos presentando un punto isoeléctrico entre pH 4 y 5.

El análisis de la secuencia del extremo amino terminal identificó a una de las bandas proteolíticas (banda 3) como la proteína de choque térmico ClpB.

X. PERSPECTIVAS

Con los resultados obtenidos en el presente trabajo no se logra evidenciar una asociación directa entre la actividad proteolítica (proteasas) y la presencia de la chaperona ClpB, por lo que se generan cuestionamientos sobre la función de ClpB como proteasa.

El estudio de la proteína ClpB de manera individual puede aportar datos importantes que nos permitan demostrar que la actividad proteolítica detectada en el filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* corresponde o no a dicha proteína.

XI . ANEXO

Anexo 1

OADC

Cloruro de Sodio 8.5 g
Ácido oleico 0.6 ml
Dextrosa 20 g
Catalasa 0.03 g
Albúmina bovina 50 g
Volumen final 20 ml

Anexo 2

Solución amortiguadora de carga 2X

SDS 2%
Glicerol 20%
Solución amortiguadora, gel concentrador 4X, 25%
Azul de bromofenol 0.0025%

Anexo 3

Preparación de la solución madre de acrilamida.

Preparado comercial al 30% acrilamida (Bio-Rad), 0.8% Bis. N,N'methylene-bis-acrylamide (Electrophoresis Purity Reagent).

Para 500 ml

150 g de acrilamida

4.0 g de Bis-acrilamida, disolver en 200 ml de agua milliQ y aforar a 500 ml.

Solución gel separador 4X.

1.5 mM Tris pH 8.8, 0.4% SDS.

Para 500 ml

90.85 g de Tris, disolver en 300 ml de agua milliQ y ajustar el pH a 8.8 con HCl diluido
2.0 g de SDS, disolver en 300 ml de la solución Tris y aforar a 500 ml.

Solución gel concentrador 4X.

0.5 mM Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS.

Para 250 ml

19.7 g de Tris-HCl, disolver en 200 ml de agua milliQ, ajustar el pH a 6.8.

1.0 g de SDS, adicionar a los 200 ml de Tris-HCl y aforar a 250 ml.

Solución de Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio (APS).....0.1g

Agua bidestilada.....1.0 ml

Los geles de poli-acrilamida al 11% copolimerizados con gelatina 1% se prepararon como se indica en la tabla.

Reactivos		
Gel separador	Volumen	Gel concentrador
Gel separador 4X (ml)	2.25	Gel concentrador 4X (ml) 1.25
Agua (ml)	2.55	3
Acrilamida (ml)	3.3	0.75
Persulfato de amonio 10% (ul)	60	50
TEMED (ul)	10	10
Gelatina 1% (ml)	0.9	-

Anexo 4

Solución amido negro

Amido black 10B, Lab. Bio-Rad; 0.1%

Para 200 ml

Amido black 10B 0.2g

Metanol 50%..... 100 ml

Ácido acético 7%..... 14 ml

Anexo 5

Inhibidores de proteasas utilizados en este estudio, mostrando las características principales de cada inhibidor.

Inhibidor	Especificidad	Mecanismo de acción	Solubilidad/ Estabilidad	Concentración de uso	Nota
PMSF (fenilmetilsulfonilfluorido)	Inhibe proteasas de serina	Irreversible, modifica el sitio activo	Soluble a >10 mg/ml en isopropanol, etanol, metanol. En isopropanol al 100%, estable por 9 meses a + 25 °C.	17-170 µg/ml (0.1- 1mM)	Peso molecular: 174.2.
TLCK (N-tosil-lisina clorometil cetona)	Inhibe proteasas de serina y cisteína	Irreversible, modificación de Histidina	Soluble a > 20 mg/ml en agua. Estable a + 25 °C pH ≤ 6.0.	37-50 µg/ml (100-135 µM)	Peso molecular: 369.3.
E-64 (N-(N-L-3-Trans-carboxirano-2-carbonil)-L-leucil)-agmatino)	Inhibe proteasas de cisteína	Modificación del sitio activo	Soluble a 20 mg/ml en 1:1 (v/v) de etanol y agua. Estable entre pH 2-10.	0.5- 10 ug/ml (1.4- 28.0 uM)	Peso molecular: 357.4
EDTA (ácido edético)	Inhibe metaloproteasas	Extrae metales de sitio activo	Soluble en agua a 0.5 M a pH 8-9. Estable a +4 °C por 6 meses.	0.2- 0.5 ug/ml (0.5- 1.3 mM)	Peso molecular: 372.24
Pefabloc SC (4-(2-Aminoetil)-benzenosulfonil-fluorido, hidrocloreto (AEBSF)	Inhibe proteasas de serina	Irreversible	Soluble a > 100 mg/ml en agua. Estable en solución por 1-2 meses a -20 °C.	0.1- 1.0 mg/ml (0.4- 4 mM)	Peso molecular: 239.5
Pepstatina	Inhibe proteasas ácidas	Reversible	Soluble en metanol a 1 mg/ml. Estable por una semana a +4 °C, o un mes a -20 °C.	0.7 µg/ml (1 µM)	Peso molecular: 685.9 Insoluble en agua
Aprotinina	Inhibe proteasas de serina		Soluble en agua. A -20 °C estable por 6 meses	0.06- 20 ug/ml (0.01- 0.3 uM)	Peso molecular: 6.512

Anexo 6

Solución de rehidratación

UREA 8M

CHAPS 2%

Solución amortiguadora IPG 0.5%

Azul de bromofenol

b-mercaptoetanol

Agua milli Q

Anexo 7

Solución azul de Coomassie

Brillante Blue R-250 Coomassie, Lab. Bio-Rad; 0.1%

Para 200 ml

Coomassie R-2500.2g

Metanol 50% 100 ml

Ácido acético 7% 14 ml

Anexo 8

Tinción inversa (Imidazol-Zinc)

Imidazol 0.2 M

Sulfato de Zinc (ZnSO₄) . 0.2 M

Ácido cítrico 2%

XII. BIBLIOGRAFÍA

- ¹ Das R. 2000. Tuberculosis. Historical Landmarks. J. Indian Med. Assoc. 98(3):112-114.
- ² Koch R. 1981. The etiology of tuberculosis. (Traslation by B. Pinner, first published in Am Rev Tuberc 1932). Bull Int Union Tuberc. 56:87-100.
- ³ Crubezy E, Ludes B, Poveda J, Clayton J, Crouau R, Montagnon D. 1998. Identification of *Mycobacterium* DNA in an Egyptian pott's disease of 5,400 years old. C.R. Acad. Sci. III. 321(11):941-951.
- ⁴ Daniel T. 2000. The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out?. Int. J. Tuber lung Dis. 4(5):395-400.
- ⁵ Kapur V, Whittam T, Musser J. 1994. Is *Mycobacterium tuberculosis* 15,000 year old? J. Infect Dis. 170(5):1348-1349.
- ⁶ Dye C, Scheele P, Dolin V, Pathania M. 1999. The WHO Global Surveillance and Monitoring Project, Global burden of tuberculosis: estimated incidence, prevalence, and mortality by country. JAMA 282:677-686.
- ⁷ Raviglione M, Snider D, Kochi A. 1995. Global epidemiology of tuberculosis: morbidity of a worldwide epidemic. JAMA. 273:220-226.
- ⁸ Shafer R, Edlin B. 1996. Tuberculosis in patients infected with human immunodeficiency virus: perspective on the past decade. Clin Infect Dis. 22:683-704.
- ⁹ Da Silva M. 2000. Perfil de resistencia de *Mycobacterium tuberculosis* aislados de pacientes portadores de HIV/AIDS atendidos en hospital de referencia. J. Pneumol. 26(1):25-30.
- ¹⁰ Dirección General de Epidemiología. Anuario de morbilidad. 1993. México, D. F. Secretaría de Salud, 1994.
- ¹¹ García M, Valdespino J. 1994. Tuberculosis. Enfermedades Tropicales en México. México, D. F. Secretaría de Salud. 215-228.
- ¹² García M, Valdespino J. 1999. La Salud en México a la Vuelta del Siglo. Instituto Nacional de Salud Pública, Secretaría de Salud. Epidemiología de la Tuberculosis. Breve resumen de los trabajos presentados en la XII Conferencia mundial sobre SIDA. Salud Pública de México. Cap 7:53-58.
- ¹³ Dirección General de Información y Estadística. Mortalidad, 1992. México, D. F. Secretaría de Salud, 1993.
- ¹⁴ Ten Dam H, Pio A. 1994. Pathogenesis of tuberculosis and effectiveness of BCG vaccination. Adv Tuber Res. 63:225-233.
- ¹⁵ Bloom B (edited). 1994. Tuberculosis. Pathogenesis, Protection, and Control. ASM Press Washington, DC., pag. 73-75.
- ¹⁶ Collins F. 1991. Pulmonary tuberculosis: immunology of a chronic infection, in vaccines and Immunotherapy. Crys SJ (Editores). Permagon Press, New York. pag. 140.
- ¹⁷ Ivanyi J. 1996. Recientes avances en la Inmunología de la tuberculosis. Vaccimonitor. 2:1-3.
- ¹⁸ Andersen P, Heron I. 1993. Specificity of a protective memory response against *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 61:844.
- ¹⁹ Costello A, Kumar V, Narayan M. 1992. Does antibody to mycobacterial antigens, including lipoarabinomannan, limit dissemination in childhood tuberculosis?. Proc R Soc Trop Med Hyg. 86:686-692.
- ²⁰ Andersen P, Askgaard D, Ljungquist L, Bennedsen J, Heron I. 1991. Proteins released from *Mycobacterium tuberculosis* during growth. Infect. Immun. 59:1905-1910.

-
- ²¹ Rook G, Steele J, Barnass S, Mace J, Stanford J. 1986. Responsiveness to live *M. tuberculosis*, and common antigens, of sonicate-stimulated T cell lines from normal donors. *Clin. Exp. Immunol.* 63:105-10.
- ²² Andersen P, Askgaard D, Ljungquist L, Bentzon M, Heron I. 1991. T-cell proliferative response to antigens secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 59:1558-1563.
- ²³ Pugsley A. 1993. The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 57:50-108.
- ²⁴ Hatfull G, William R Jr. 2000. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press. Washington, DC., pag. 205.
- ²⁵ Hatfull G, William R Jr. 2000. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press. Washington, DC., pag. 210.
- ²⁶ van Wely K, Swaving J, Freudl R, Driessen A. 2001. Translocation of proteins across the cell envelope of Gram-positive bacteria. *FEMS. Microbiol. Rev.* 25:437-454.
- ²⁷ Cole S, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon S, Eiglmeier K, Gas S, Barry C, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown D, Chillingworth F, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Barrel B. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 685:537-544.
- ²⁸ Andersen A, Hansen E. 1989. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.* 57:2481-2488.
- ²⁹ Tommassen J, Lugtenberg B. 1982. PHO-regulon of *Escherichia coli* K12: a minireview. *Ann. Microbiol.* 133A:243-249.
- ³⁰ Ratliff T, McGarr J, Abou-Zeid C, Rook G, Stanford J, Aslanzadeh J, Brown E. 1988. Attachment of mycobacteria to fibronectin-coated surfaces. *J. Gen Microbiol.* 134:1307-1313.
- ³¹ Huygen K, van Vooren M, Turneer R, Bosmans P, Dierckx, Bruyn J. 1988. Specific lymphoproliferation, gamma interferon production, and serum immunoglobulin G directed against a purified 32 kDa mycobacterial protein antigen (P32) in patients with active tuberculosis. *Scand. J. Immunol.* 27:187-194.
- ³² Mayer BK and Falkinham JO. 1986. Superoxide dismutase activity of *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, and *M. scrofulaceum*. *Infect. Immun.* 53:631-637.
- ³³ Rawlings N, Barret. 1993. Evolutionary families of peptidases. *Biochem. J.* 290:205-218. Revisado en Sterchi E, Walter Stöcker. *Proteolytic Enzymes. Tools and Targest*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1999. Germany.
- ³⁴ Gottesman S, Maurizi M, Wicker S. 1997. Regulatory Subunits of Energy-Dependent Proteases. *Cell.* 91:435-438.
- ³⁵ Gottesman S, Squires C, Pichersky C, Carrington M, Hobbs M, Mattick S, Dalrymple B, Kuramitsu H, Shiroza T, Foster T. 1990. Conservation of the regulatory subunit for the Clp ATP-dependent protease in prokaryotes and eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87(9):3513-3517.
- ³⁶ Kim Y, Levchenko I, Fraczkowska K, Woodruff R, Sauer R, Baker T. 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase. *Nature Structural Biology.* 8:230-233.
- ³⁷ Gottesman S, Clark W, Maurizi M. 1990. The ATP-dependent Clp protease of *Escherichia coli*. Sequence of ClpA and identification of a Clp-specific substrate. *J. Biol. Chem* 265: 7886.
- ³⁸ Katayama-Fujimura Y, Gottesman S, Maurizi M. 1987. A multiple-component, ATP-dependent protease from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* 262:4477.

-
- ³⁹ Kitagawa M, Wada C, Yoshioka S, Yuka T. 1991. Expression of ClpB, an analog of the ATP-dependent protease regulatory subunit in *Escherichia coli*, is controlled by a heat shock sigma factor (sigma 32). *J. Bacteriol.* 173:4254
- ⁴⁰ Maeda H, Molla A. 1989. Pathogenic potentials of bacterial proteases. *Clin. Chim. Acta.* 185(3):357-67.
- ⁴¹ Travis J, Potempa J, Maeda H. 1995. Are bacterial proteinases pathogenic factors?. *Trends in Microbiology.* 3:406-408.
- ⁴² Smith L. 1979. Virulence factors of *Clostridium perfringens*. *Rev. Infect. Dis.* 1:254-260.
- ⁴³ Robertson P, Cobb C, Taylor R, Fullmer H. 1974. Activation of latent collagenase by microbial plaque. *J. Periodontal Res.* 9:81-83.
- ⁴⁴ Rippon J. 1968. Extracellular collagenase produced by *Streptomyces madurae*. *Biochim. Biophys. Acta* 159:147-152.
- ⁴⁵ Smith G, Merkel J. 1982. Collagenolytic activity of *Vibrio vulnificus*: potential contribution to its invasiveness. *Infect. Immun.* 35:1155-1156.
- ⁴⁶ Evans D, Wardlaw C. 1953. Gelatinase and collagenase production by certain species of *Bacillus*. *J. Gen. Microbiol.* 8:481-487.
- ⁴⁷ Diener B, Carrick L Jr, Berk R. 1973. *In vivo* studies with collagenase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Infect. Immun.* 7:212-217.
- ⁴⁸ Bedi G, Williams T. 1994. Purification and characterization of a collagen-degrading protease from *Porphyromonas gingivalis*. *J. Biol. Chem.* 269:599-606.
- ⁴⁹ Ladarola P, Lungarella G, Martorana P, Viglio S, Guglielminetti M, Korzus E, Gorrini M, Cavarra E, Rossi A, Travis J, Luisetti M. 1998. Lung injury and degradation of extracellular matrix components by *Aspergillus fumigatus* serine proteinase. *Exp Lung Res.* 24(3):233-251.
- ⁵⁰ Dubin G. 2002. Extracellular proteases of *Staphylococcus* spp. *Biol.Chem.* 2002 383(7-8):1075-1086.
- ⁵¹ Knipfer N, Shrader T. 1997. Inactivation of the 20S proteasoma in *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* 25: 375-383.
- ⁵² Roudiak S, Seth A, Knipfer N, Shrader T. 1998. The Lon protease from *Mycobacterium smegmatis*: molecular cloning, sequence analysis, functional expression, and enzymatic characterization. *Biochemistry* 37:377-386.
- ⁵³ Misra N, Habib S, Ranjan A, Hasnain S, Nath I. 1996. Expression and functional characterization of the clpC gene of *Mycobacterium leprae*: ClpC protein elicits human antibody response. *Gene.* 172:99-104.
- ⁵⁴ Cameron R, Stevenson K, Inglis N, Klausen J, Sharp J. 1994. Identification and characterization of a putative serine protease expressed in vivo by *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis. *Microbiolgy.* 140:1977-1982.
- ⁵⁵ Knipfer N, Seth A, Roudiak S, Shrader T. 1999. Species variation in ATP-dependent protein degradation: protease profiles differ between mycobacteria and protease functions differ between *Mycobacterium smegmatis* and *Escherichia coli*. *Gene.* 231:95-104.
- ⁵⁶ Raynaud C, Etienne G, Peyron P, Lanéelle M, Daffe M. 1998. Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology.* 144:577-587.
- ⁵⁷ Rowland S, Ruckert J, Burall Jr. B. 1997. Identification of an elastolytic protease in stationary phase culture filtrates of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol. Lett.* 151:56-64.
- ⁵⁸ Anilkumar G, Chauham M, Ajitkumar P. 1998. Cloning and expression of the gene coding for FstH protease from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Gene.* 214:7-11.

- ⁵⁹ Skeiky Y, Lodes M, Guderian J, Mohamath R, Bement T, Alderson M, Reed S. 1999. Cloning, expression, and immunological evaluation of two putative secreted serine protease antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immunol.* 67:3998-4007.
- ⁶⁰ Rosenkrands I, King A, Weldingh K, Moniatte M, Moertz E, Andersen P. 2000. Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis.* 21:3740-3756.
- ⁶¹ Masso F, Paéz A., Varela E, Díaz de León L, Zenteno E, Montaña L. 1999. Collagen degrading activity associated with *Mycobacterium* species. *Thorax.* 54:439-441.
- ⁶² Brown G, Dave J, Gey van Pittius N, Stevens L, Ehlers M, Beyers A. 2000. The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. *Gene.* 254:147-155.
- ⁶³ Dave J, Gey van Pittius N, Beyers A, Ehlers M, Brown G. 2002. Mycosin-1, a subtilisin-like serine protease of *Mycobacterium tuberculosis*, is cell wall-associated and expressed during infection of macrophages. *BMC Microbiology.* 2:1-8.
- ⁶⁴ Pohlschröder M, Dilks K, Hand N, Rose R. 2004. Translocation of proteins across archaeal cytoplasmic membranes. *FEMS Microbiol Rev.* 28:3-24.
- ⁶⁵ Wang C, Tsou C. 1998. Enzymes as chaperones and chaperones as enzymes. *FEBS Letters* 425:382-384.
- ⁶⁶ Oruga T, Wilkinson A. 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. *Genes Cells* 6:575-597.
- ⁶⁷ Kim K, Cheong G, Park S, Ha J, Woo K, Choi S, Chung C. 2000. Heptameric ring structure of the heat-shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J.Mol.Biol.* 303:655-666.
- ⁶⁸ Kim Y, Levchenko I, Fraczkowska K, Wiidruff R, Sauer R, Baker T. 2001. Molecular determinants of complex formation between Clp/Hsp100 ATPases and the ClpP peptidase.
- ⁶⁹ Thomas J, Baneyx F. 1998. Roles of the *Escherichia coli* small heat shock proteins IbpA and IbpB in thermal stress management: comparison with ClpA, ClpB, and HtpG In vivo. *J. Bacteriol.* 180:5165-5172
- ⁷⁰ Zolkiewski M. 1999. ClpB cooperates with DnaK, DnaJ, and GrpE in suppressing protein aggregation. *The J Biol Chem.* 274:28083-28086.
- ⁷¹ Stewart G, Wernisch L, Stabler R, Mangan J, Hinds J, Laing K, Young D, Butcher P. 2002. Dissection of the heat-shock response in *Mycobacterium tuberculosis* using mutants and microarrays. *Microbiology.* 148:3129-3138.
- ⁷² Kroch H, Simon L. 1990. The ClpP component of Clp protease is the s32-dependent heat shock protein F21.5. *J Bacteriol.* 172:6026-6034.
- ⁷³ Woo K, Kim K, Goldberg A, Ha D, Chung C. 1992. The heat-shock protein ClpB in *Escherichia coli* is a protein-activated ATPase. *The Journal of Biological Chemistry.* 267:20429-2043.
- ⁷⁴ Lee S, Mathew E, Yo-hei W, Paul B, Wah C, Masasuke Y, Francis T. 2003. The structure of ClpB: A molecular chaperone that rescues proteins from an aggregated state. *Cell.* 115:229-240.
- ⁷⁵ Kim K, Cheong G, Park S, Ha J, Woo K, Choi S, Chung C. 2000. Heptameric ring structure of the heat shock protein ClpB, a protein-activated ATPase in *Escherichia coli*. *J Mol Biol.* 303:655-666.
- ⁷⁶ Rottgers K, Zufall N, Guiard B, Voos W. 2002. The ClpB homolog Hsp78 is required for the efficient degradation of proteins in the mitochondrial matrix. *J Biol Chem.* 277(48):45829-45837.
- ⁷⁷ Schmitt M, Neupert W, Langer T. 1996. The molecular chaperone Hsp78 confers compartment-specific thermotolerance to mitochondria. *J Cell Biol.* 134(6):1375-1386.
- ⁷⁸ Kaser M, Langer T. 2000. Protein degradation in mitochondria. *Semin Cell Dev Biol.* 11(3):181-190.