



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOQUÍMICAS  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**“ACTIVACIÓN DE PLASMINÓGENO  
HUMANO POR *Mycobacterium  
tuberculosis*”**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA

**WENDY XOLALPA VILLANUEVA**



DIRECTORA DE TESIS: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN

MÉXICO, D.F.

Diciembre 2009



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## DEDICATORIA

*Este trabajo está dedicado a aquel que ha sido, es y será mi fuerza.  
A aquel que es mi protector, mi lugar de refugio,  
mi libertador, la roca que me protege, mi escudo,  
el poder que me salva, mi más alto escondite.  
Mi rey, mi dueño, mi todo.*

*A ti que me has dado la vida, los dones y las virtudes para admirar  
tu grandeza y las maravillas de tu creación a través de la Ciencia.*

*A ti mi Salvador, a ti mi Señor Jesús,  
dedico este trabajo a ti MI AMADO DIOS.*

*A mis padres, los que guiaron mis pasos por este camino,  
Antonio Xolalpa Jiménez y Silvia Villanueva González*

*A mis hermanos Jessica y José Antonio,  
los que me han hecho ameno este camino  
y lo han compartido a mi lado.*

*¡Los amo!*



## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de muchas personas que con su ejemplo, con sus palabras, con su experiencia o recursos participaron para que yo obtuviera este éxito. Así que este logro no es solamente mío sino también de todas ellas.

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por los recursos brindados y por la beca que me otorgaron para obtener este grado.

En especial agradezco a mi tutora y directora de Tesis, la Dra. Clara Espitia, por la libertad, entusiasmo y confianza que me brindó para enamorarme de este proyecto y trabajar en él. Ella me ha brindado todo su apoyo en mi desarrollo académico, profesional y personal desde antes de que yo siquiera pensara en hacer un doctorado y aún ahora que emprendo nuevos caminos. En su laboratorio, desde 1998 me formé, crecí y maduré hasta obtener jugosos frutos.

A la Dra. Blanca Ruiz, por su motivación constante y entusiasmo en el tema del Plasminógeno y a la Dra. Patricia Coello por sus sugerencias oportunas y precisas, por su tiempo y paciencia en cada tutorial, a ambas gracias por ser parte de mi formación.

A los miembros de mi jurado: la Dra. Adela Rodríguez, la Dra. Bertha González, el Dr. Edgar Zenteno y el Dr. Rogelio Hernández, por su tiempo y sus comentarios en la revisión de esta tesis y sobretodo porque me hicieron reflexionar en el análisis de mi propio trabajo.

Al Dr. Guillermo Mendoza por su apoyo y colaboración en la parte experimental de espectrometría de masas para la publicación de este trabajo.

Al MVZ. Antonio J. Vallecillo por su amplia contribución en todo lo que involucró biología molecular e ingeniería genética, pero mi mayor agradecimiento por ser además de un compañero de laboratorio mi amigo.

Al Dr. Luis Rosales por su colaboración en todo lo que involucró interacción de proteínas *in silico*, docking y dinámica molecular.

A los miembros del laboratorio Cristina Parada Colín, Ingrid Cohen, Eden Rodríguez, Margarita González, Martha Lara, Mauricio Trujillo, Ana Laura Salgado, Vanessa Sánchez, Anaid Zendejas, Fernando Flores, Angélica Amador, Pedro Estevez, Jaime Campuzano, Javier Flores,



Mariano Reyes, Elizabeth Mendoza, Rafael Cervantes, Erika Segura, Luis Delgado y Sharlene Moore, por su grata compañía, trabajo en equipo, consejos, enseñanzas y su invaluable amistad. Ellos hicieron en su momento que el trabajo en el laboratorio fuera como un hogar, lo que hizo muy disfrutable mi estancia.

A las secretarías Leticia García y Adelina González del posgrado de bioquímica, por su trabajo y servicio en todas mis actividades académicas que admiro por su trato siempre amable.

A mis amigos Ethel Celaya, Giovanna Salamanca, Mónica Vazquez, Oswaldo Champo Gabriela Echeverría, y muchos otros, a quien pido disculpas por no poner cada uno de sus nombres. Su amistad y apoyo moral y algunas veces hasta económico me respaldó para obtener este mérito.

A mis compañeros del Grupo Volver a Nacer, quienes me han brindado el oro molido de sus experiencias y de quienes aprendí la escuela de la vida. Guadalupe Arvizu, Esperanza, Leticia y Zenaida, gracias por sus sugerencias. Alicia, Roberto, Octavio, Maribel, Elvia, Arturo, Josefina, gracias por su hermandad.

A mis compañeros y hermanos de la Escuela de Pastoral (San Pedro) de la Iglesia Católica y de la Iglesia de Cristo en México (Del Valle) por su guía en el camino para conocer a Dios.

A mi familia Los Xolalpa y Los Villanueva, mis abuelas Amalia González y María Luisa Jiménez que siempre me han motivado y apoyado a lo largo de mi camino.

A mi novio Enrique Urzua De La Cruz por su amor, apoyo, motivación y sobre todo por compartir conmigo el crecimiento espiritual.

Gracias a mis padres por los valores que me inculcaron y a mis hermanos por compartir su amor en familia, a pesar de los obstáculos.

Gracias te doy mi Dios por cada una de las personas que has colocado a mi alrededor, la experiencia y la sabiduría que cada uno de ellos me ha brindado me hacen ser la mujer que hoy soy.



“Si el Señor los ha preferido y elegido a ustedes, no es porque ustedes sean la más grande de las naciones, ya que en realidad son la más pequeña de todas ellas”. (Dt 7,7).



# Resumen

El sistema Plasminógeno/Plasmina, que participa en la degradación de coágulos de fibrina, participa también en procesos fisiológicos y patofisiológicos que involucran la migración celular y metástasis de células tumorales. Se ha descrito que algunas bacterias patógenas pueden interactuar con este sistema adquiriendo así una actividad proteolítica en la superficie, que aunada a la capacidad de las bacterias de adherirse a componentes de matriz extracelular podrían aprovecharlo como un mecanismo de diseminación. En *Mycobacterium tuberculosis* se ha reportado la interacción con el zimógeno Plasminógeno (Plg) y su conversión a la forma proteolíticamente activa Plasmina (Plm), sin embargo la identidad de las proteínas involucradas en la interacción no se había determinado. En el presente estudio se identificaron 15 proteínas de unión a Plg en *M. tuberculosis* mediante electroforesis bidimensional, ensayos de *ligand blotting* y espectrometría de masas. Se confirmó la interacción de Plg con tres de las proteínas identificadas, la proteína de choque térmico de 70 kDa (DnaK), la enzima glutamina sintetasa (GlnA1) y el antígeno 85 B (Ag85B) mediante su producción en forma recombinante. La unión a Plg se inhibió con un análogo de lisina, el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico, con lo que se demostró la participación de los sitios de unión a lisina (LBS) del Plg. El Plg unido a las proteínas recombinantes pudo convertirse a Plm por uno de los activadores fisiológicos del hospedero, el tPA, lo que concuerda con uno de los mecanismos de activación propuestos para la adquisición de Plm en la superficie bacteriana. Además, se observó un efecto potenciador de la activación del Plg a Plm mediada por tPA en presencia de extractos proteicos de la micobacteria, en el cual también intervienen los LBS del Plg. Durante la caracterización de las proteínas micobacterianas, interesantemente se encontró que al igual que Ag85B, una proteína de unión a fibronectina, la proteína GlnA1 también posee la capacidad de unir este componente de matriz extracelular, lo cual correlaciona con lo reportado para otras proteínas de unión a Plg en otros géneros bacterianos. En la proteína Ag85B, se pudo predecir por modelaje molecular la participación de la Lys89 en la interacción con el LBS del Kringle 1 del Plg, esta participación fue comprobada *in vitro* al mutar esta Lys por Arg o Ala observándose una disminución de la unión a Plg en las proteínas mutadas. En conjunto estos resultados confirman que *M. tuberculosis* posee proteínas que le permiten interactuar con el sistema Plg humano, favoreciendo su activación a Plm, lo cual puede ser importante en la patogenia de la tuberculosis.



# Abstract

The plasminogen/plasmin system has a main role in degradation of fibrin clots and in physiological and pathophysiological process involving cellular migration and metastasis of tumor cells. Binding and activation of human plasminogen (Plg) to generate the proteolytic enzyme plasmin (Plm) have been associated with the invasive potential of certain bacteria. Plg interaction with *Mycobacterium tuberculosis* has been described previously but the identity of proteins involved in the interaction was not been determined. In this work, proteomic analysis together with ligand blotting assays identified several Plg-binding spots in *Mycobacterium tuberculosis* soluble extracts (SEs) and culture filtrate proteins. The identity of 15 different proteins was deduced by N-terminal and/or mass spectrometry. Binding of Plg to recombinant *M. tuberculosis* heat shock protein 70 (DnaK), glutamine synthetase A1 (GlnA1) and antigen 85 B protein (Ag85B) was further confirmed by ELISA and ligand blotting assays. The binding was inhibited by the lysine analogue  $\epsilon$ -aminocaproic acid, indicating that the interaction involve lysine residues. Plg bound to recombinant mycobacterial proteins was activated to Plm by tissue-type Plg activator. In contrast with recombinant proteins, *M. tuberculosis* SE enhanced several times the Plg activation mediated by the activator. Interestingly, GlnA1 was able to bind the extracellular matrix (ECM) protein fibronectin. In the Plg interaction with Ag85B protein, the specific role of Lys89 was assessed by molecular modeling tools and mutagenesis; a decrease in Plg binding to the mutated protein was evident when the Lys was replaced by Arg or Ala. Together these results show that *M. tuberculosis* posses several Plg receptors suggesting that bound Plg to bacteria surface can be activated to Plm, endowing bacteria with the ability to break down ECM and basal membranes proteins contributing to tissue injury in tuberculosis.



# Contenido

Dedicatoria.....	I
Agradecimientos .....	II
Resumen.....	V
Abstract .....	VI
Abreviaturas.....	XII
Capítulo 1 Introducción .....	1
1.1. El Sistema Plasminógeno / Plasmina.....	3
1.1.1. Estructura del Plasminógeno.....	4
1.1.2. Activadores e inhibidores fisiológicos de Plg/Plm .....	6
1.1.3. Participación del Plg/Plm en la fibrinólisis.....	7
1.1.4. Participación del Plg/Plm en la activación de metaloproteasas de matriz extracelular.....	9
1.1.5. Importancia de la actividad de Plm asociada a una superficie celular y participación en otros procesos celulares .....	9
1.1.6. Receptores celulares de Plg.....	13
1.2. El sistema Plg/Plm en infecciones bacterianas .....	14
1.2.1. Importancia del Plg/Plm en la inflamación como respuesta a la infección bacteriana .....	14
1.2.2. Metástasis bacteriana.....	14
1.2.3. Activadores de Plg bacterianos .....	16
1.2.4. Proteínas de unión a Plg o PlgRs.....	16
1.3. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y La Tuberculosis humana.....	20
1.3.1. <i>M. tuberculosis</i> .....	20
1.3.2. Importancia de la tuberculosis humana.....	20
1.3.3. Patogénesis de la Tuberculosis .....	21
1.4. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y El Sistema Plg/Plm .....	28
Capítulo 2 Antecedentes .....	29
Capítulo 3 Hipótesis.....	31
Objetivos .....	32
3.1. Objetivo general .....	32
3.2. Objetivos específicos.....	32



Capítulo 4 Materiales y Métodos .....	33
4.1. Diseño Experimental.....	34
4.2. Identificación de las proteínas de unión a Plg .....	35
4.2.1. Obtención de diferentes extractos proteicos de <i>M. tuberculosis</i> .....	35
4.2.2. Electroforesis bidimensional o 2D-SDS-PAGE. ....	35
4.2.3. Ligand Blotting con Plg.....	36
4.2.4. Identificación por espectrometría de masas (MS) o secuenciación de extremo amino-terminal.....	37
4.2.5. Producción de proteínas recombinantes. ....	37
4.2.6. Producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes.....	38
4.2.7. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano, fibronectina y laminina por Ligand Blotting .....	39
4.2.8. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano por ELISA. ....	39
4.3. Caracterización de la interacción de Plg con la proteína Ag85B.....	40
4.3.1. Modelo de la interacción Plg-Lys. ....	40
4.3.2. Producción de las proteínas Ag85B, Ag85B <sup>arg89</sup> y Ag85B <sup>ala89</sup> recombinantes en forma soluble. ....	41
4.3.3. Determinación de las constantes de afinidad Plg-Ag85B por ELISA.....	42
4.3.4. Purificación de Plg a partir de plasma humano.....	43
4.4. Ensayos de Activación de Plg humano.....	44
4.4.1. Ensayos de Activación de Plg humano unido a las proteínas recombinantes inmovilizadas.....	44
4.4.2. Ensayo de Activación de Plg por tPA en presencia de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> .....	44
Capítulo 5 Resultados .....	45
5.1. Identificación de proteínas de unión a Plg en <i>M. tuberculosis</i> .....	45
5.1.1. Electroforesis Bidimensional y Ligand Blotting .....	45
5.1.2. Obtención de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> recombinantes en <i>E. coli</i> .....	51
5.1.3. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano, fibronectina y laminina por Ligand Blotting .....	53
5.1.4. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano por ELISA. ....	54
5.1.5. Activación por tPA del Plg unido a las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> inmovilizadas.....	55
5.1.6. Activación de Plg por tPA en presencia de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> , ensayo en solución. ....	56
5.2. Caracterización de la interacción de Plg con la proteína Ag85B.....	58



5.2.1. Identificación del sitio de unión a Plg, papel de las Lys internas.....	58
5.2.2. Modelaje de la Interacción Ag85B y Plg.....	62
5.2.3. Mutagénesis, clonación, expresión y purificación de Ag85B, Ag85B <sup>arg89</sup> y Ag85B <sup>ala89</sup> .....	64
5.2.4. Ensayos de unión a Plg con las proteínas Ag85B, Ag85B <sup>arg89</sup> y Ag85B <sup>ala89</sup> .....	66
5.2.4.1. Ligand Blotting.....	66
5.2.4.2. Ensayos de unión en placa de ELISA.....	67
5.3. Ensayos de activación de Plg con las proteínas Ag85B, Ag85B <sup>arg89</sup> y Ag85B <sup>ala89</sup> .....	68
5.3.1. Activación del Plg unido a las proteínas.....	68
5.3.2. Activación del Plg en solución.....	69
5.3.3. Determinación de constantes de afinidad.....	70
Capítulo 6 Discusión.....	72
Capítulo 7 Conclusiones.....	80
Capítulo 8 Perspectivas.....	81
Capítulo 9 Bibliografía.....	83
Anexo.....	93
Artículo Publicado.....	107

## FIGURAS

Figura 1.1 Balance entre el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico.....	2
Figura 1.2 El sistema Plasminógeno/Plasmina.....	4
Figura 1.3 Estructura del Plg humano.....	5
Figura 1.4 Estructura del Plg y sus posibles conformaciones.....	6
Figura 1.5 Estructura de los activadores de Plg.....	7
Figura 1.6 Fibrinólisis. Representación del co-ensamble de los elementos del sistema Plg/Plm sobre un trombo en el endotelio vascular.....	8
Figura 1.7 Co-ensamble de los elementos del sistema Plg/Plm sobre una superficie celular.....	10
Figura 1.8 El sistema Plg/Plm mediado por el complejo uPA-uPAR.....	11
Figura 1.9 Papel del sistema Plg/Plm mediado por el complejo uPA-uPAR.....	12
Figura 1.10 Metástasis bacteriana. Representación esquemática de las dos formas en que las bacterias patógenas pueden activar el Plg a Plm y aprovecharlo para invadir los tejidos....	15
Figura 1.11 Formación y desarrollo del granuloma.....	22



Figura 1.12 Representación esquemática de un pulmón con TB miliar.....	23
Figura 1.13 Representación esquemática de un pulmón con neumonía caseosa. ....	24
Figura 1.14 Representación esquemática de TB fibro-ulcerativa. ....	25
Figura 1.15 Elementos involucrados en la formación de granulomas y remodelación de la arquitectura del pulmón. ....	27
Figura 2.1 Fracciones proteicas de <i>M. tuberculosis</i> resueltas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas PVDF. ....	30
Figura 5.2 Identificación de los puntos que unen Plg. ....	48
Figura 5.3 Proteínas de la fracción PC de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> separadas por 2D SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF. ....	49
Figura 5.4 Proteínas de unión a Plg.....	51
Figura 5.5 Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína Ag85B de <i>M. tuberculosis</i> recombinante en <i>E. coli</i> . A. ....	52
Figura 5.6 Ligand Blot con las proteínas recombinantes. ....	53
Figura 5.7 Unión de las proteínas recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> a Plg.....	54
Figura 5.8 Activación del Plg unido a las proteínas recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> .....	55
Figura 5.9 Activación del Plg mediada por tPA en presencia de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> ..	56
Figura 5.10 Inhibición de la activación del Plg mediada por tPA en presencia de las proteínas de <i>M. tuberculosis</i> . ....	57
Figura 5.11 Representación esquemática de las estructuras de las proteínas miembros del complejo Ag85.....	61
Figura 5.12 Modelo de la interacción del Kringle 1 del Plg con Ag85B y sus variantes mutadas..	62
Figura 5.13 Dinámica molecular de la interacción entre el K1 del Plg y Ag85B o las proteínas mutadas. ....	63
Figura 5.14 Purificación de la proteína recombinante Ag85B por cromatografía de afinidad a níquel. ....	64
Figura 5.15 Cromatografía de intercambio iónico.....	65
Figura 5.16 <i>Ligand Blot</i> de las proteínas recombinantes Ag85B y proteínas mutadas.....	66
Figura 5.17 Gráficas de la interacción Ag85B o de las proteínas mutantes con Plg evaluada por ELISA.....	67
Figura 5.18 Activación de Plg unido a Ag85B silvestre y proteínas mutadas. ....	68



Figura 5.19 Activación de Plg en solución en presencia de las proteínas recombinantes Ag85B o de las proteínas mutantes.....	69
Figura 5.20 Ensayo de unión a Plg por ELISA con diferentes concentraciones de Plg y con distintas concentraciones de Ag85B o Ag85B <sup>arg89</sup> ..	70
Figura 5.21 Gráficas de unión a Plg por Ag85B o Ag85B <sup>arg89</sup> en comparación con fibrinógeno..	71

## TABLAS

Tabla 1. Proteínas de unión a Plg o PlgRs en diferentes patógenos. ....	18
Tabla 2. Identificación de las proteínas de unión a Plg en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	50
Tabla 3. Valores teóricos del análisis de cada Lys en la estructura de las proteínas del complejo Ag85. ....	59
Tabla 4. Constantes de afinidad a Plg comercial determinadas mediante ensayos de ELISA. ....	71



## ABREVIATURAS

• 2D	Bidimensional o de doble dimensión
• 2D-SDS-PAGE	Electroforesis bidimensional en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
• Ag	Antígeno
• Ala	Alanina
• antiPlg	Anticuerpo policlonal anti Plasminógeno humano
• Arg	Arginina
• bFGF	Factor básico de crecimiento de fibroblastos
• BSA	Albúmina sérica bovina
• CHAPS	3-[(3-Cholamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato
• D.O.	Densidad óptica
• DMSO	Dimetil sulfóxido
• DOC	Deoxicolato de sodio
• DTT	Ditiotreitol
• EACA	Ácido $\epsilon$ -amino caproico, ácido $\epsilon$ -amino hexanoico
• EDTA	Ácido etilenediaminotetraacético
• ELISA	Ensayo inmunoabsorbente ligado a la enzima
• ES	Proteínas micobacterianas del extracto soluble
• FC	Proteínas micobacterianas del filtrado de cultivo
• Fn	Fibronectina
• GA3PDH	Gliceraldeído 3 fosfato deshidrogenasa
• GlnA1	Glutamina sintetasa A1
• IPG	Gradiente de pH inmovilizado
• IPTG	Isopropil $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
• K1	Dominio kringle 1
• K2	Dominio kringle 2
• LBS	Sitios de unión a lisina
• LRP	Proteína relacionada a la lipoproteína de baja densidad
• Lys	Lisina
• MMPs	Metaloproteasas de matriz extracelular
• MS	Espectrometría de masas
• PAI	Inhibidor del activador de Plasminógeno
• PBS	Solución amortiguadora o amortiguador de fosfato de sodio
• PC	Proteínas micobacterianas de la pared celular
• PDB	Banco de datos de proteínas, <i>Protein Data Bank</i>
• Plg	Plasminógeno
• PlgRs	Receptores de Plasminógeno
• Plm	Plasmina



- PVDF Difluoruro de polivinilideno
- SAK Estafilocinasa
- SDS Dodecilsulfato de sodio
- SK Estreptocinasa
- suPAR Receptor del activador de Plasminógeno tipo urocinasa soluble
- TA Temperatura ambiente
- TB Tuberculosis
- TCA Ácido tricloroacético
- TGFβ1 Factor de crecimiento transformante tipo beta 1
- tPA Activador tisular de Plasminógeno
- uPA Activador de Plasminógeno tipo urocinasa
- uPAR Receptor del activador de Plasminógeno tipo urocinasa
- VEGF Factor de crecimiento vascular endotelial
- α2-antiPlm Alfa 2 anti-Plasmina



# Capítulo 1

## Introducción

Uno de los pasos más importantes en las infecciones bacterianas es la interacción inicial del patógeno con el hospedero. Una vez en el hospedero, la mayoría de los patógenos se adhieren a los tejidos, penetran y/o evaden las defensas dañando los mismos tejidos y causando enfermedad. Durante una infección bacteriana, el hospedero responde empleando diferentes mecanismos de defensa, sin embargo, algunas bacterias pueden eludir estos mecanismos. La invasión bacteriana es en general mediada por productos bacterianos secretados o de superficie que pueden contrarrestar las defensas del sistema inmune innato y adquirido (Boyle & Lottenberg, 1997). En este sentido, la actividad proteolítica juega un papel importante en la virulencia de muchos patógenos. Algunos de ellos pueden producir y secretar enzimas proteolíticas, o bien, aprovechar los propios sistemas del hospedero como los sistemas en cascada dependientes de proteasas de los mamíferos: calicreína-cinina, activación de complemento, coagulación y fibrinólisis.

Es por esto que el sistema hemostático juega un papel importante en infecciones sistémicas, un ejemplo de ello se observa en la sepsis (Jagneaux et.al., 2004) y el choque séptico, en donde los sistemas de coagulación y fibrinolítico se encuentran afectados (Schouten et.al., 2008). Este sistema está cuidadosamente regulado por proteínas pro-coagulantes, anti-coagulantes y fibrinolíticas que mantienen un balance fisiológico entre sí (Figura 1.1). Sin embargo, una infección dominante puede conducir a la desregulación del sistema, resultando en una patología (Sun, 2005).



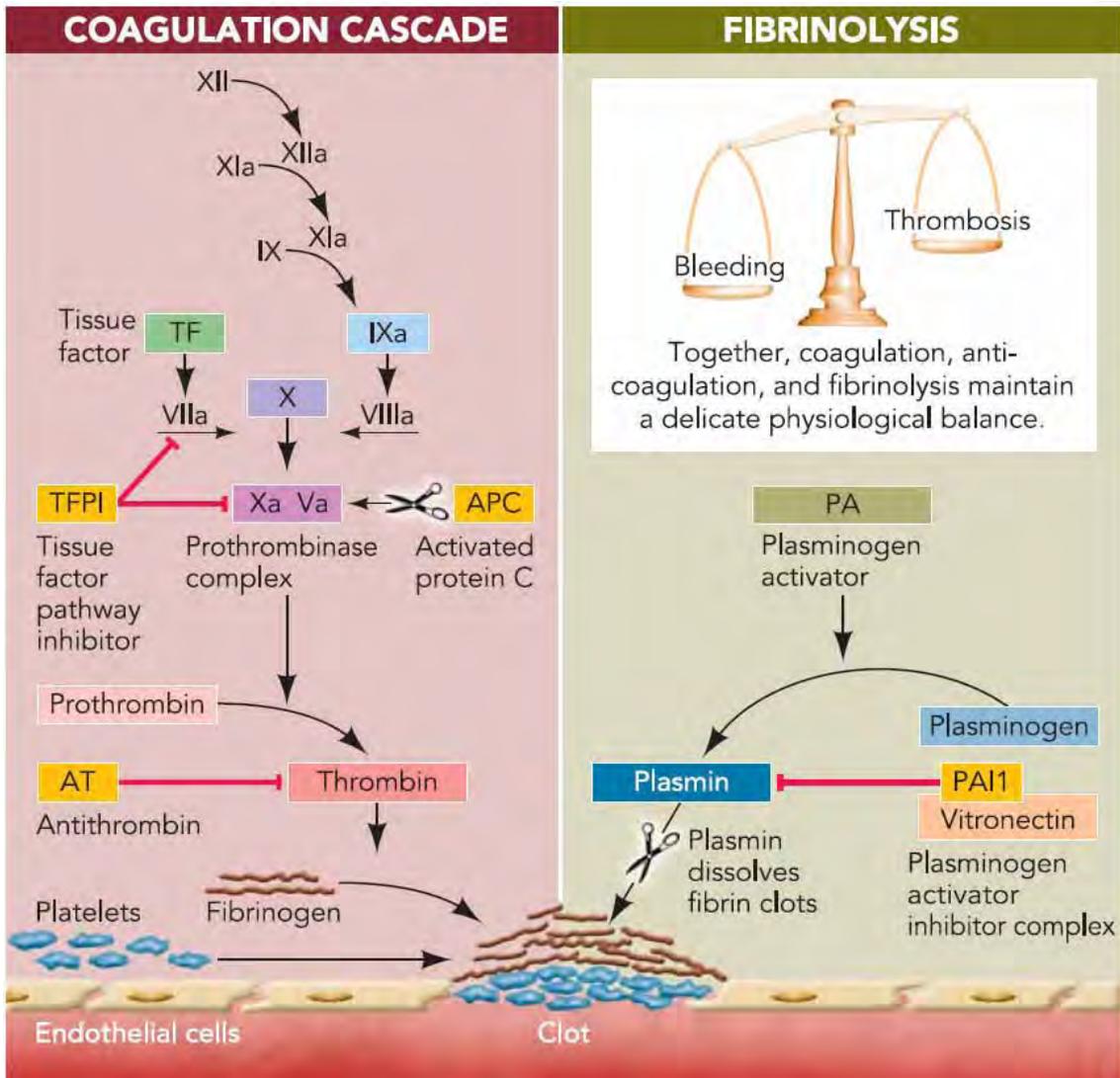


Figura 1.1 Balance entre el sistema de coagulación y el sistema fibrinolítico. (Tomado de Sun, 2005).

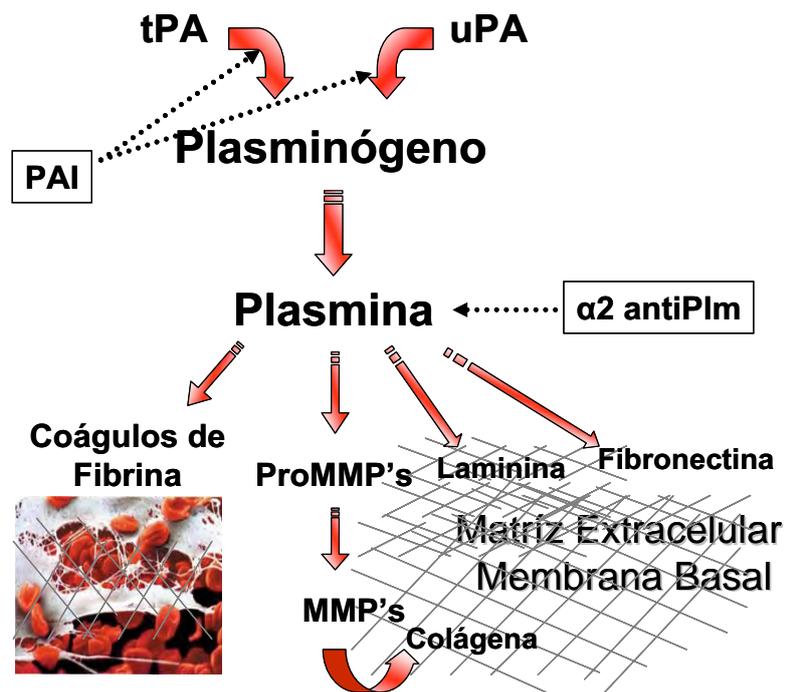
### ***1.1. El Sistema Plasminógeno / Plasmina***

El sistema fibrinolítico reconocido actualmente como sistema plasminógeno/plasmina, comprende a una proenzima, el plasminógeno (**Plg**), cuya forma enzimáticamente activa es la proteasa denominada plasmina (**Plm**). La función primaria de la Plm es mantener la permeabilidad vascular mediante la degradación de los coágulos de fibrina producto del sistema de coagulación (Collen, 1999).

El Plg es un zimógeno que al sufrir un corte proteolítico por otra proteasa da lugar a la Plm. A este paso de conversión del Plg a Plm se le conoce como activación de Plg, y a las proteasas responsables de esa conversión se les denomina activadores de Plg.

La Plm es generada a partir del corte proteolítico en el Plg en la unión peptídica arg<sup>561</sup> – val<sup>562</sup> por uno de los dos activadores fisiológicos: el activador tisular de Plg (**tPA**, *tissue plasminogen activator*) o por el activador de Plg tipo urocinasa (**uPA**, *urokinase plasminogen activator*). Además de la fibrina, la Plm tiene un amplio rango de sustratos entre los que se incluyen proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina, vitronectina, precursores de proteasas de matriz extracelular conocidas como metaloproteasas, activación de algunas prohormonas y factores de crecimiento. La actividad de Plm es regulada por la presencia de su inhibidor,  $\alpha$ 2-antiplasmina ( **$\alpha$ 2-antiPlm**) y de los inhibidores de los activadores de Plg (PAI-1, PAI-2 y PAI-3, *Plasminogen activator inhibitors*) (Lijnen, 2001; Collen, 1999) (Figura 1.2). Cuando hidroliza un sustrato, la especificidad del corte proteolítico de Plm sobre él es en el extremo C-terminal de residuos de argininas o lisinas, similar a la de la enzima tripsina.





**Figura 1.2** El sistema Plasminógeno/Plasmina. Activadores de Plg (tPA y uPA), inhibidores de los activadores de Plg (PAI) inhibidor de Plm ( $\alpha 2$ -antiPlm), metaloproteasas de matriz extracelular (MMP's) y principales sustratos de Plm.

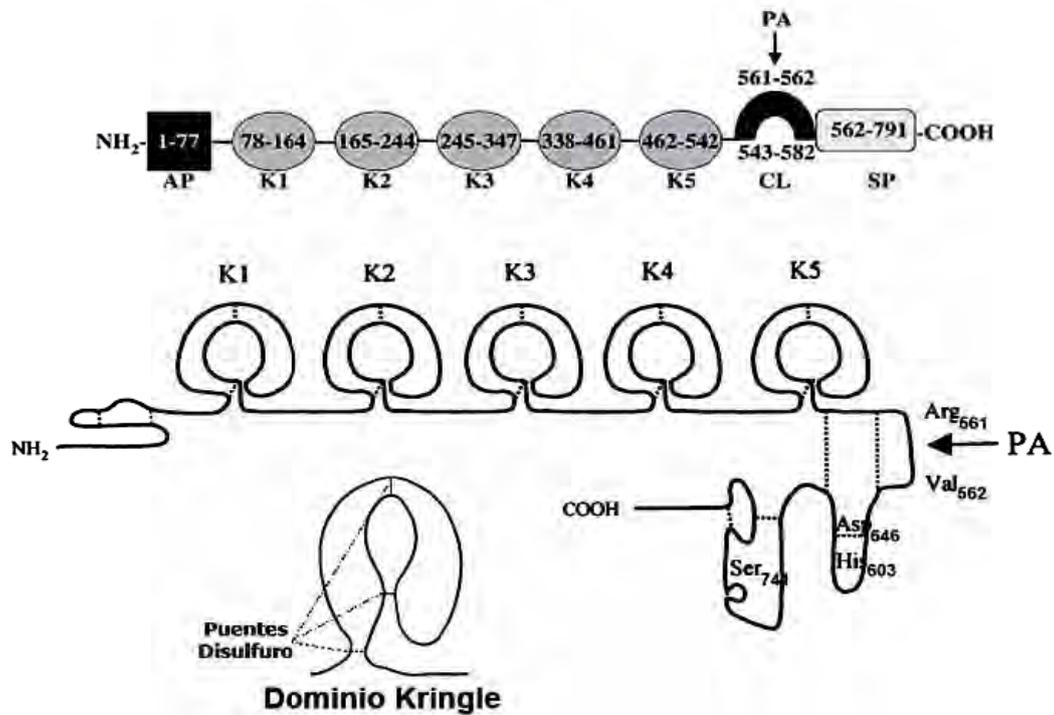
### 1.1.1. Estructura del Plasminógeno

El Plg es una glicoproteína de aproximadamente 92 kDa constituida por 791 aminoácidos, se sintetiza principalmente en el hígado y circula en la sangre normalmente en una concentración de 2  $\mu$ M o 180  $\mu$ g/ml (Raum et.al., 1980). A diferencia del Plg, la proenzima de una sola cadena, la Plm está formada por dos cadenas que se mantienen unidas por puentes disulfuro: cadena pesada y cadena ligera de 65 y 25 kDa respectivamente (Lähtenmäki et.al., 2001). La cadena pesada N-terminal contiene un péptido de pre-activación y cinco dominios denominados “kringle”, en tanto que la cadena ligera C-terminal contiene el dominio catalítico típico de proteasa de serina: ácido aspártico<sup>646</sup>, histidina<sup>603</sup> y serina<sup>741</sup>. (Ponting et.al., 1992) (Figura 1.3).

Los dominios kringle son estructuras peptídicas de aproximadamente 80 aminoácidos que tienen forma de asas unidas por tres puentes disulfuro (Figura 1.3). Estos dominios contienen sitios de unión a lisina (**LBS**, *lysine binding sites*), los cuales se ha descrito reconocen



preferentemente lisinas carboxilo-terminal (Plow et.al., 1995; Winram & Lottenberg, 1998) y median la unión del Plg a fibrina y a superficies celulares (Parry et.al., 2000).



**Figura 1.3 Estructura del Plg humano.** Representación esquemática de sus diferentes dominios: Péptido de pre-activación (AP), dominio kringle (K), dominio de corte (CL), sitio de corte para el activador de Plg (PA) y dominio de proteasa de serina (SP). (Tomado de y modificado de Lähteenmäk et.al., 2001).

A pesar de que no se cuenta con la estructura cristalográfica completa del Plg, los datos de las estructuras de cada dominio por separado han permitido sugerir que cuando el Plg es inmovilizado mediante los LBS sobre una superficie como la fibrina o sobre una célula, la molécula cambia de conformación de una forma cerrada a una conformación extendida o abierta que le permite ser sustrato del activador, favoreciendo el corte proteolítico por cualquiera de los activadores (Figura 1.4). La activación del Plg en este sentido se facilita mediante la exposición del sitio de corte del Plg a los activadores y esta exposición está regulada normalmente por los LBS (Lähteenmäki et.al., 2005).



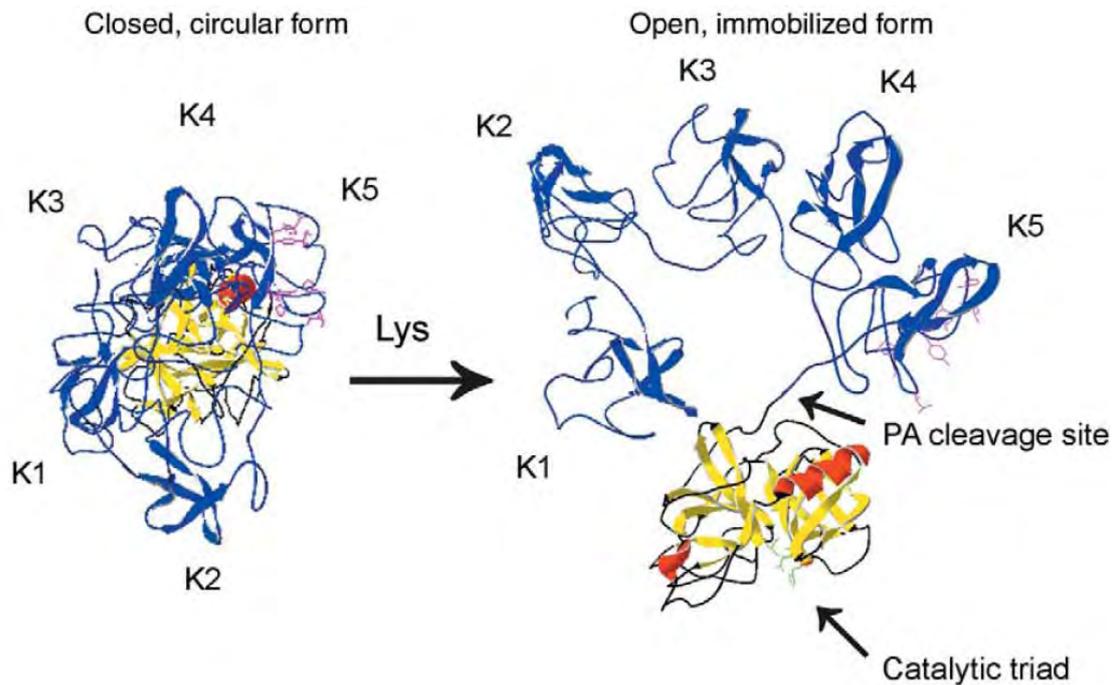


Figura 1.4 Estructura del Plg y sus posibles conformaciones. (Tomado de Lähteenmäki et.al., 2005).

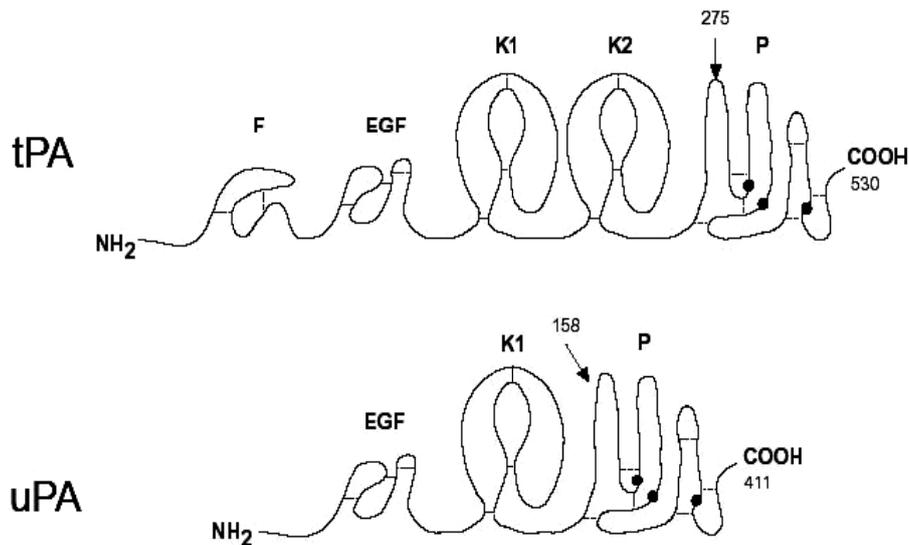
### 1.1.2. Activadores e inhibidores fisiológicos de Plg/Plm

La activación del Plg a Plm es un mecanismo altamente regulado debido a su participación en distintos procesos biológicos. El sistema está regulado a nivel de la actividad de Plm y a nivel de la activación de Plg a Plm, mediante la síntesis y liberación tanto de los activadores de Plg como de los inhibidores de éstos.

El tPA es una molécula de 70 kDa compuesta de 530 aminoácidos que comprende 5 dominios homólogos al de otras proteínas: un dominio dedo, un dominio factor de crecimiento epidermal, dos dominios kringle y el dominio catalítico de proteasa de serina (Figura 1.5).

El uPA es una proteína constituida por 411 aminoácidos que pesa 32 kDa, está compuesta de un dominio factor epidermal, un dominio kringle y un dominio de proteasa que contiene a la triada catalítica (Lijnen, 2001; Collen, 1999) (Figura 1.5).





**Figura 1.5 Estructura de los activadores de Plg.** Representación esquemática de sus diferentes dominios: dominio dedo (F), dominio homólogo al factor de crecimiento epidermal (EGF), dominio kringle (K) y dominio de proteasa (P). Las flechas indican el sitio de corte proteolítica para su activación. (Tomado de Cromogenix, 1995).

Los principales inhibidores del sistema Plg/Plm pertenecen al grupo de inhibidores conocidos como serpinas que son inhibidores de proteasas de serina. Estos inhibidores actúan formando un complejo estable 1:1 entre la región del sitio activo de la proteasa blanco y el sitio reactivo semejante al sustrato en la serpina. La proteasa corta el asa del sitio reactivo de la serpina formándose un intermediario covalente enzima-acilo que modifica el sitio activo de la enzima previniendo su desacilación, de esta manera la enzima queda inactiva (Lähteenmäki et.al., 2001). Las serpinas PAI actúan formando el complejo estequiométricamente estable con los activadores tPA y uPA, impidiendo de esta manera la activación de Plg a Plm.

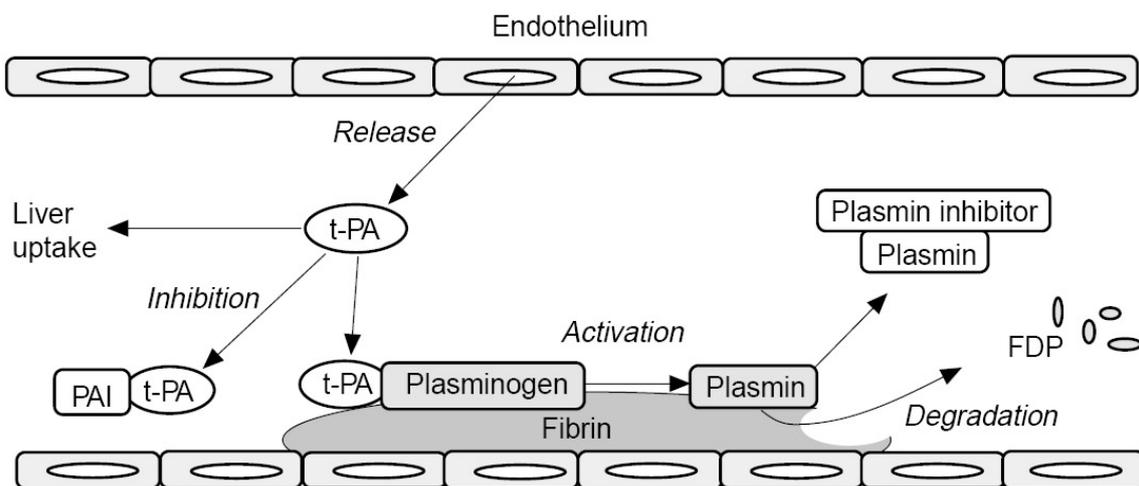
La molécula  $\alpha 2$ -antiPlm contiene 464 aminoácidos y es una glicoproteína de 67 kDa. Entre las serpinas, la  $\alpha 2$ -antiPlm se caracteriza por contener un segundo sitio de unión a Plm que interactúa con los LBS de los dominios kringle 1-3 de la Plm (Collen, 1999).

### 1.1.3. Participación del Plg/Plm en la fibrinólisis

La fibrinólisis es un proceso regulado por las interacciones moleculares entre los componentes del sistema Plg/Plm. Al inicio de la fibrinólisis, el tPA es secretado rápidamente al



torrente sanguíneo por las células del endotelio y se une a fibrina mediante su dominio dedo y su segundo dominio kringle. La fibrina regula su propia degradación co-localizando al tPA y al Plg sobre su superficie, formándose así, un complejo tri-molecular que favorece la generación de Plm (Figura 1.6). El tPA es un activador débil de Plg en ausencia de fibrina, pero su eficiencia catalítica aumenta al menos dos órdenes de magnitud en presencia de ella (Collen, 1999). Durante la fibrinólisis, una cantidad limitada de Plm es suficiente para cortar a la fibrina dejando expuestas lisinas C-terminales las cuales funcionan como nuevos sitios de unión tanto para el Plg como para el tPA el cual ahora puede fácilmente cortar al Plg amplificando su activación (Cesarman-Maus & Hajjar, 2005). La Plm degrada entonces a la fibrina y produce los llamados péptidos de la degradación de la fibrina o FDP.



**Figura 1.6 Fibrinólisis.** Representación del co-ensamble de los elementos del sistema Plg/Plm sobre un trombo en el endotelio vascular. (Tomado Cromogenix, 1995).

La regulación de la fibrinólisis a este nivel ocurre por acción de la  $\alpha 2$ -antiPlm, sin embargo, cuando la Plm tiene los LBS ocupados, la inactivación por  $\alpha 2$ -antiPlm ocurre 50 veces más lento en contraste con la inactivación de la Plm libre la cual es inmediata.

La actividad en exceso del tPA se regula principalmente por el PAI-1. Los complejos tPA-PAI-1 o bien el tPA libre se eliminan de la sangre en el hígado mediante la expresión de la proteína relacionada a la lipoproteína de baja densidad (LRP) por los hepatocitos. De la misma manera, las células endoteliales expresan un receptor dependiente de manosas de 170 kDa que también puede participar en la eliminación del tPA (Collen, 1999).



### ***1.1.4. Participación del Plg/Plm en la activación de metaloproteasas de matriz extracelular***

Como ya se mencionó la Plm es capaz de activar varios sustratos, entre ellos algunas proteasas de matriz extracelular o metaloproteasas (**MMPs**), las cuales también son secretadas en forma de proenzima y se activan al sufrir un corte proteolítico. Estas proteasas degradan a la mayoría de los componentes de matriz extracelular incluida la colágena. Existe evidencia *in vitro* de la activación de proMMP-1, proMMP-3, proMMP-9, proMMP-10 y proMMP-13 por Plm. La metaloproteasa MMP-1 convierte a la proMMP-2 de 72 kDa en un intermediario de menor peso molecular, el cual es activado subsecuentemente por Plm (Lijnen, 2001). No obstante que la Plm activa a estas proenzimas, no es la única responsable de su conversión a la forma activa y como estos sistemas de proteasas en cascada pueden retroalimentarse entre ellos, los estudios para definir su papel individual en algún proceso fisiológico particular son complicados y actualmente no se ha establecido claramente. Una aproximación de ello se ha logrado gracias al desarrollo de animales deficientes (Knock-out) en alguno de los componentes del sistema Plg/Plm, lo cual ha permitido destacar la importancia de la Plm en la activación de la proMMP-9. Por ejemplo, en fibroblastos obtenidos de la piel de ratones silvestres y en los de ratones deficientes en t-PA<sup>-/-</sup>, u-PA<sup>-/-</sup> y PAI-1<sup>-/-</sup> se detectó actividad de la MMP-9, lo que indica que su activación no requiere a los activadores de Plg fisiológicos. Por el contrario, en macrófagos o células de músculo liso derivadas de los ratones Plg<sup>-/-</sup> la MMP-9 activa no se detectó indicando que la activación eficiente de la proMMP-9 en esas células es dependiente de Plm (Lijnen & Collen, 1999).

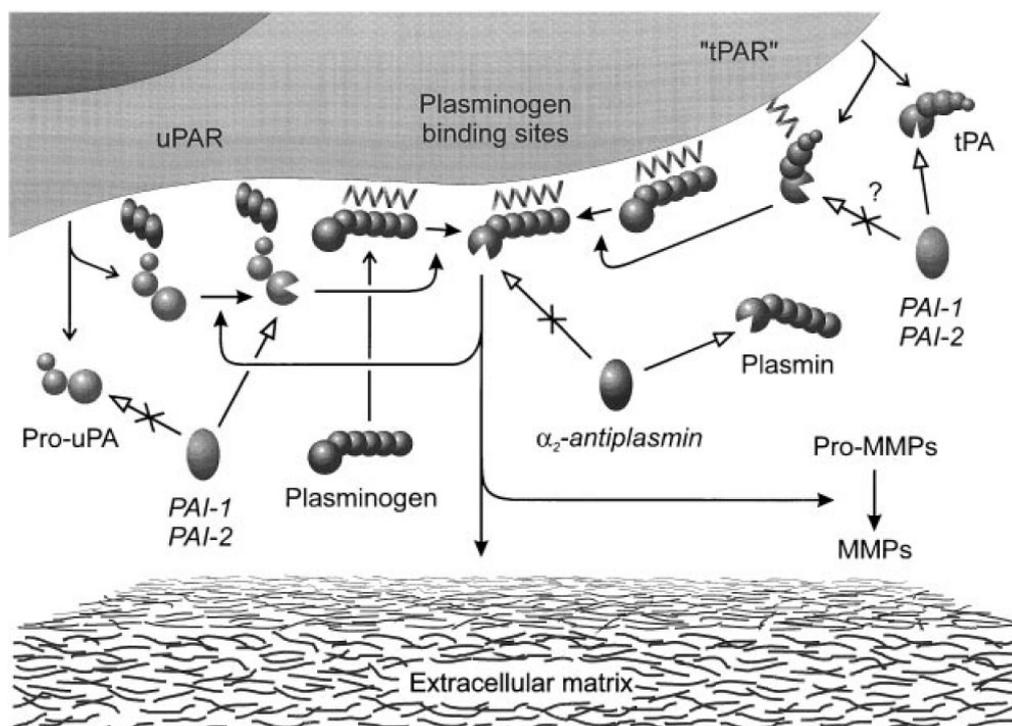
### ***1.1.5. Importancia de la actividad de Plm asociada a una superficie celular y participación en otros procesos celulares***

Además de participar en la fibrinólisis, la Plm es una proteasa que está implicada en varios procesos biológicos y patofisiológicos. La conexión entre la Plm y las MMPs involucra al sistema Plg/Plm en procesos de embriogénesis, inflamación, angiogénesis, remodelación y reparación de tejidos y metástasis de células tumorales. La mayoría de estos procesos involucran la degradación de matriz extracelular, migración e invasión celular en donde la actividad proteolítica adquirida o asociada a la periferia celular juega un papel importante.



Las células pueden presentar en su superficie moléculas o sitios de unión a Plg/Plm y la actividad de Plm pericelular aunada a la activación de MMPs facilita la migración celular asistiendo en la penetración de barreras de proteínas. Pero no sólo la Plm sino también los activadores fisiológicos tPA y uPA son capaces de unirse a las superficies celulares, y mediante un mecanismo análogo al de la fibrinólisis, la co-localización del Plg y sus activadores sobre una superficie celular estimula notablemente la activación del Plg. Una vez formada, la Plm puede permanecer unida a la superficie celular y es protegida de la inactivación por el inhibidor  $\alpha_2$ -antiPlm que neutraliza más eficientemente a la Plm libre que a la Plm inmovilizada mediante los LBS (Plow et.al, 1995; Myöhänen & Vaheri, 2004).

El co-ensamble de los componentes del sistema Plg/Plm en la superficie celular tiene lugar debido a la expresión de receptores para Plg y de receptores para los activadores de Plg (Figura 1.7).

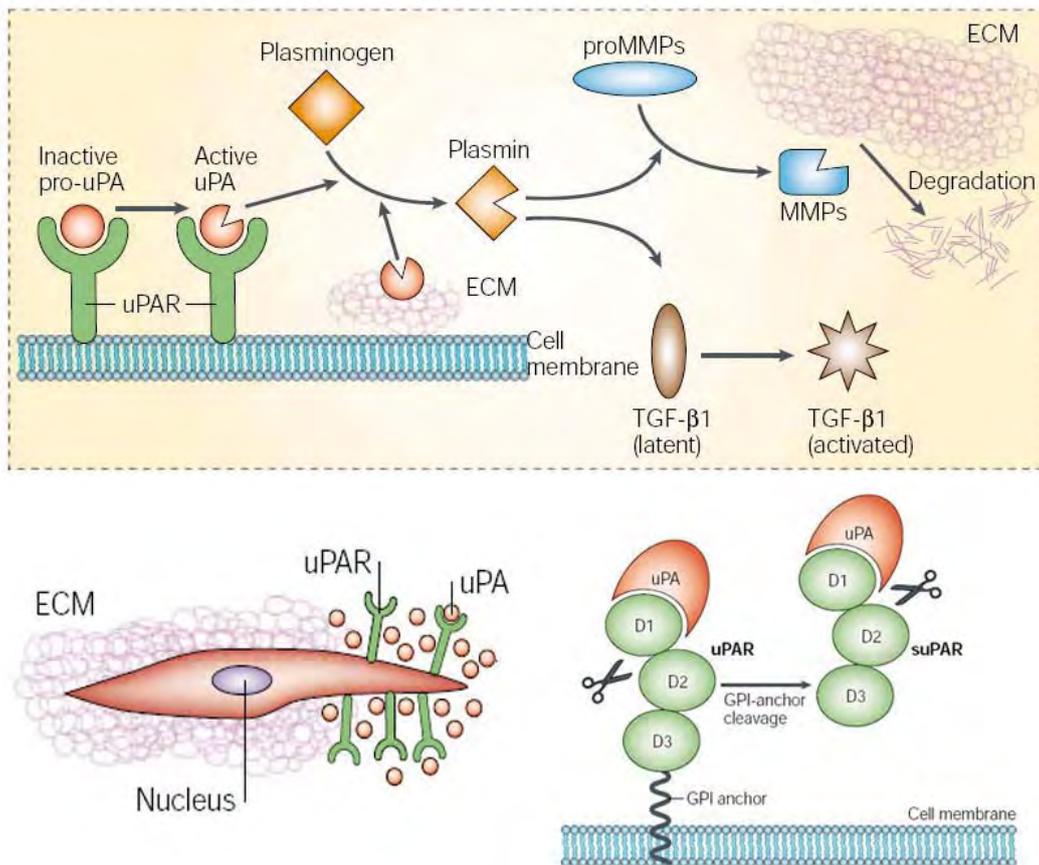


**Figura 1.7** Co-ensamble de los elementos del sistema Plg/Plm sobre una superficie celular. (Tomada de Bass & Ellis, 2002).

Se ha encontrado que la actividad de Plm en la periferia celular es regulada principalmente por el activador uPA y su receptor de superficie celular (uPAR, *uPA receptor*). El dominio factor



epidermal en el uPA es el responsable de su unión al receptor (Collen, 1999). uPAR es una proteína glicosilada anclada a membrana mediante un grupo glicosil fosfatidil inositol y formada por tres dominios ricos en cisteínas, denominados D1, D2 y D3 conectados entre sí por uniones muy cortas (Mazzieri & Blasi, 2005) (Figura 1.8).

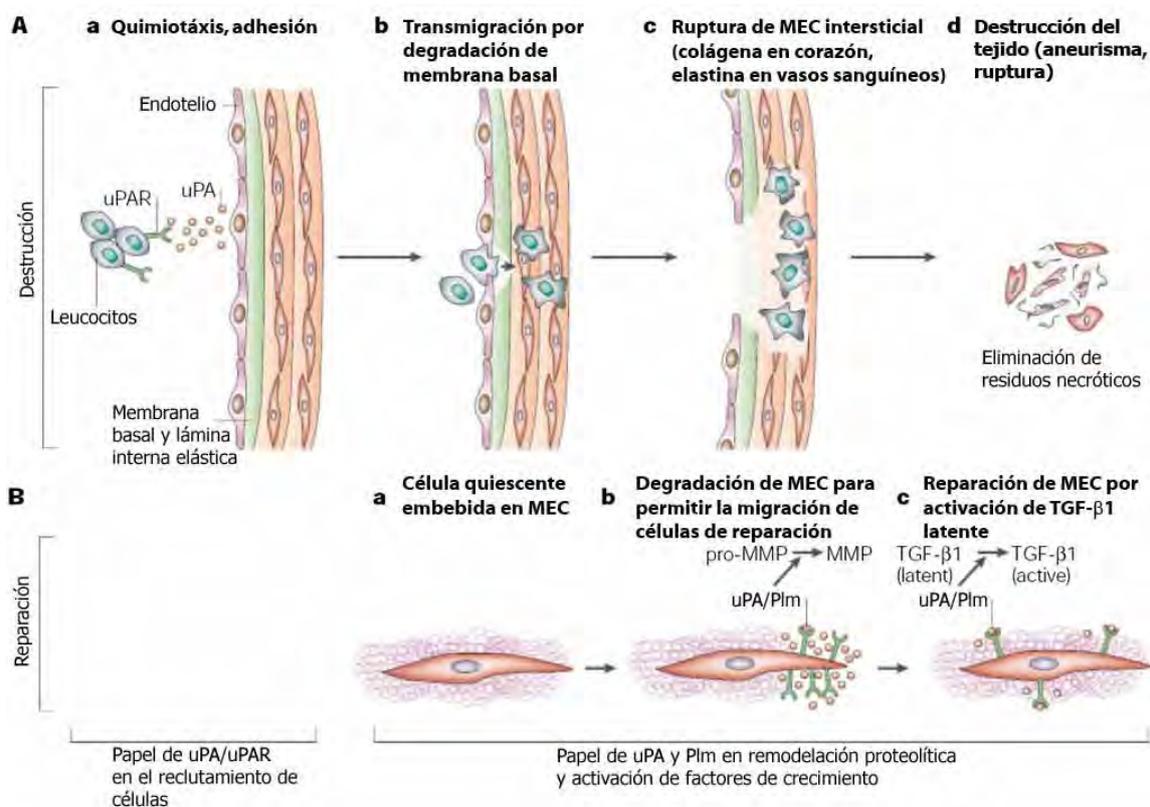


**Figura 1.8** El sistema Plg/Plm mediado por el complejo uPA-uPAR. (Tomado de Blasi & Carmeliet, 2002).

La expresión de uPAR en la superficie celular se encuentra sobre-regulada en diferentes procesos que involucran migración celular. Un ejemplo de ello se observa en la formación de aneurismas, en donde los leucocitos expresan uPAR, el cual juega un papel importante en señalización, quimiotáxis y adhesión de los leucocitos al tejido endotelial activado. La proteólisis en la superficie celular mediada por Plm, producida por uPA-uPAR, es necesaria para degradar la membrana basal y la lámina interna elástica lo que lleva a la degradación de las fibras de colágena y elastina. Si la proteólisis no es regulada pueden producirse el daño y la destrucción del tejido



(Blasi & Carmeliet, 2002). De la misma manera, durante la fase de reparación del tejido dañado, los fibroblastos, las células endoteliales o las células de músculo liso migran al sitio de reparación abriéndose paso en la matriz extracelular empleando el sistema Plg/Plm mediado por uPA-uPAR. La actividad de Plm en la periferia de estas células activa a factores de crecimiento como el factor de crecimiento transformante (TGF $\beta$ 1) o libera factores como el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o el factor de crecimiento básico de fibroblastos (bFGF) de la matriz (Figura 1.9) (Blasi & Carmeliet, 2002).



**Figura 1.9** Papel del sistema Plg/Plm mediado por el complejo uPA-uPAR. Representación esquemática de la infiltración de leucocitos provocando una lesión en el tejido endotelial conocida como aneurisma. La reparación y remodelación del tejido son promovidas por la acción de Plm y uPA. (Modificado de Blasi & Carmeliet, 2002).

La participación de la Plm en procesos inflamatorios ha sido demostrada en ratones deficientes de Plg, en donde en un modelo de inflamación peritoneal inducida con tioglicolato, se observó que el reclutamiento de linfocitos y particularmente de monocitos y macrófagos estuvo seriamente disminuido mientras que la infiltración de neutrófilos fue similar a la de los ratones



silvestres, lo cual indicó que la migración de los macrófagos al sitio de inflamación es dependiente del sistema Plg/Plm (Syrovets & Simmet, 2004).

En cáncer, el sistema Plg/Plm también juega un papel importante, ya que facilita la migración de las células tumorales (Andreasen et.al., 2000). Este sistema parece estar activo en prácticamente todos los tipos de cáncer (Danø et.al., 2005). Las células tumorales aumentan la expresión en su superficie de receptores tanto para Plg como para los activadores de Plg. La expresión de uPAR parece incrementarse conforme la gravedad del tumor aumenta y puede estar enriquecida en las lesiones metastáticas (Mazar, 2008). Incluso, el detectar niveles elevados de uPA y uPAR en tejidos tumorales y muestras sanguíneas está asociado con un pronóstico desventurado en muchos tipos de cáncer (Danø et.al., 2005).

### ***1.1.6. Receptores celulares de Plg***

Desde los años 80 se demostró la presencia de sitios de unión a Plg en las superficies de diferentes tipos celulares, incluidas todas las células sanguíneas con excepción de los eritrocitos (Miles & Plow, 1987). En las células existe una amplia distribución y una alta densidad de estos sitios, lo que implica que esos receptores pueden ser heterogéneos en su naturaleza. De acuerdo con Plow y colaboradores, los receptores de unión a Plg o **PlgRs** pueden comportarse como sitios de unión de una misma clase siempre y cuando un mecanismo consistente de unión estuviera involucrado (Plow et.al., 1995), esto a pesar de su heterogeneidad, es decir, a pesar de que las proteínas que unen el Plg sean diferentes y no contengan un dominio o motivo conservado entre ellas que medie su unión. En la interacción de los PlgRs con el Plg reportados hasta el momento éste mecanismo de unión parece cumplirse, ya que los LBS del Plg median la interacción del zimógeno con la mayoría de las células. Dado que se había observado que los LBS preferencialmente reconocían lisinas carboxilo-terminal, se planteó que las proteínas con lisinas C-terminal presentes en las superficies celulares podrían funcionar como PlgRs.

En las células de mamíferos, las proteínas de membrana  $\alpha$ -enolasa y anexina II han sido identificadas como PlgRs. La  $\alpha$ -enolasa presenta una lisina (**Lys**) C-terminal, la cual pierde su capacidad de unir Plg cuando es previamente tratada con carboxipeptidasa B (Miles et.al., 1991). Anexina II, es una proteína endotelial que requiere de proteólisis para generar el residuo de Lys



en el extremo C-terminal y además, tiene la capacidad de unir a ambos al Plg y al tPA semejando lo que ocurre en la fibrinólisis (Hajjar et.al., 1994).

## ***1.2. El sistema Plg/Plm en infecciones bacterianas***

### ***1.2.1. Importancia del Plg/Plm en la inflamación como respuesta a la infección bacteriana***

Ya ha sido demostrado que el sistema Plg/Plm participa de manera importante en la infiltración de leucocitos a un sitio de inflamación, lo cual también ocurre en la respuesta a una infección bacteriana. Posterior a la infección, los niveles de activadores de Plg como uPA y de su inhibidor PAI-1 pueden ser detectados en circulación, debido a la producción de uPA por células tales como las epiteliales, endoteliales, monocitos y neutrófilos, las cuales pudieron ser previamente activadas por productos bacterianos como endotoxinas. Subsecuentemente, la activación del Plg a Plm mediada por uPA unida a células favorece la liberación de mediadores pro-inflamatorios, tales como IL-1 $\beta$  y activa las pro-formas de MMPs, lo que amplifica la reacción inflamatoria aguda (Mondino & Blasi, 2004).

Un ejemplo del papel que puede jugar este sistema en una infección bacteriana, se observó en estudios con ratones deficientes de uPA, en donde los neutrófilos, macrófagos y células T, fallaron para ser reclutados en la respuesta pulmonar a *Cryptococcus neoformans*, el cual se diseminó ampliamente infectando el cerebro y los ratones sucumbieron a la infección. Este patrón de diseminación y muerte con la cepa 52D sólo se había observado en ratones inmuno-deficientes (Collen, 1999).

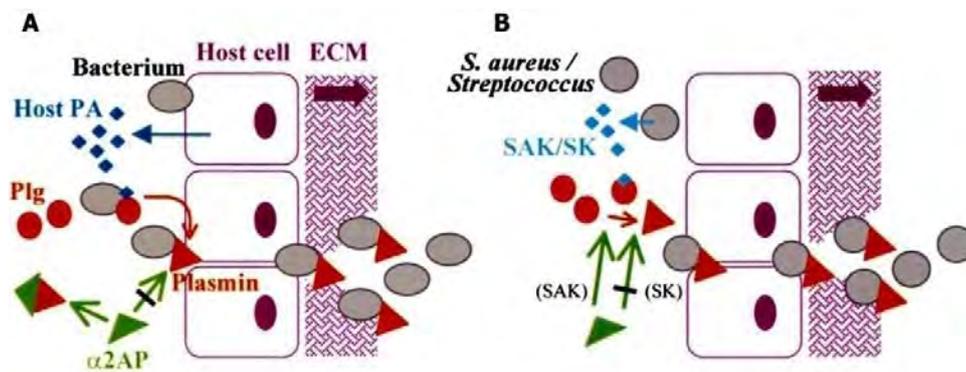
### ***1.2.2. Metástasis bacteriana***

El papel del sistema Plg/Plm en las infecciones bacterianas no sólo está restringido a nivel de la inflamación. En los últimos años se ha descrito que un gran número de bacterias invasivas también puede interactuar con el sistema Plg/Plm del hospedero. Este sistema proteolítico puede ser aprovechado por algunos patógenos para facilitar su diseminación a través de las barreras tisulares (Lottenberg et.al., 1994). Al igual que las células tumorales metastáticas, se ha



propuesto que los patógenos bacterianos adquieren en su superficie la actividad de Plm y aunado a su capacidad de adherencia a componentes de matriz extracelular, este sistema les permite abrirse paso a través de barreras tisulares, de tal manera que el término de metástasis bacteriana se ha introducido en este campo de la investigación y se le ha considerado como un mecanismo de diseminación para algunas bacterias (Lähteenmäki et.al., 2005).

Numerosas bacterias patógenas pueden interactuar con el sistema Plg/Plm de diversas maneras promoviendo la generación de Plm, por lo cual, se han descrito básicamente dos mecanismos de activación de Plg (Bergmann & Hammerschmidt, 2007); el primero es mediante la expresión y secreción de activadores de Plg bacterianos endógenos, y el segundo mediante la unión del Plg a la superficie bacteriana a través de moléculas que les permita aprovechar a los activadores de Plg del hospedero para la activación a Plm (Collen, 1999) (Figura 1.10). En la interacción con el Plg a través de moléculas de superficie, se ha reportado que éstas se unen mediante los LBS del Plg y se les ha denominado receptores de Plg (**PlgRs**) (Lähteenmäki et.al., 2001). La mayoría de los PlgRs, ejercen una función de cofactor facilitando la conversión del Plg a Plm por los activadores tPA y uPA, ya que se cree que los receptores inmovilizan al Plg y favorecen el cambio de conformación en la molécula de la conformación cerrada a abierta para así exponer el sitio de corte al activador (Lähteenmäki et.al., 2005), tal como se mostró en la Figura 1.4.



**Figura 1.10 Metástasis bacteriana.** Representación esquemática de las dos formas en que las bacterias patógenas pueden activar el Plg a Plm y aprovecharlo para invadir los tejidos. A. Activación directa por activadores producidos por la bacteria. B. Activación por los activadores propios del hospedero y potenciada por los PlgRs. (Tomado de Lähteenmäki et.al., 2001).

### 1.2.3. Activadores de Plg bacterianos

En cuanto a los activadores endógenos, la producción de éstos está restringida a muy pocas especies bacterianas. La estreptocinasa (**SK**) producida por los grupos A, C y G de estreptococos (Reddy & Markus, 1972) y la estafilocinasa (**SAK**) producida por *Staphylococcus aureus* (Kuusela & Saksela, 1990; Mölkänen et.al., 2002), son proteínas secretadas que forman complejos 1:1 con el Plg produciendo cambios conformacionales en la molécula que modifican su capacidad enzimática. A diferencia de lo que ocurre con los activadores de Plg, dicho complejo es proteolíticamente activo, sin que el corte proteolítico en la molécula de Plg del complejo tenga lugar (Parry et.al., 2000). Estos activadores han sido muy estudiados, y actualmente, su investigación se enfoca en el desarrollo de su uso clínico como agentes trombolíticos (Collen, 1999).

Otro activador reportado más recientemente es la proteasa Pla de *Yersinia pestis*, el agente causal de la plaga bubónica (Lähtenmäki et.al., 1998). Pla es una proteasa de serina que actúa al igual que los activadores fisiológicos tPA y uPA. El papel de esta proteína en la virulencia de *Yersinia pestis* se ha demostrado con cepas deficientes en Pla (*pla-*), las cuales fueron menos patogénicas (Sodeinde et.al., 1992).

### 1.2.4. Proteínas de unión a Plg o PlgRs

La capacidad de interacción de las bacterias con el Plg humano para reclutar Plm en su superficie ha sido descrita tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Algunos ejemplos de ello son también los grupos A, C y G de *Streptococcus* (Kuusela et.al., 1992), *Salmonella sp.* (Korhonen et.al., 1997), *Borrelia burgdorferi* (Hu et.al., 1997; Fuchs et.al., 1994), *Haemophilus influenzae* (Ullberg et.al., 1990), *Escherichia coli* (Korhonen et.al., 1997; Lähtenmäki et.al., 1993), *Helicobacter pylori* (Ljungh, 2000; Jönsson et.al., 2004) entre otras.

En los grupos de estreptococos, se han identificado y caracterizado tres PlgRs. El primero de ellos, es la proteína PAM (*plasminogen-binding group A streptococcal M protein*), la cual además tiene capacidad de adhesión a fibrinógeno (Berge & Sjobring, 1993). Otro PlgR es la enzima glicolítica Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH), la cual inicialmente fue identificada en el grupo A de estreptococos y posteriormente se encontró que también estaba localizada en la



superficie celular de neumococos (Bergmann et.al., 2004). GA3PDH, también conocida como SDH o Plr, presenta una Lys en el extremo C-terminal que se une a Plg, en particular a la forma procesada Lys-Plg (Winram & Lottenberg, 1998). Otra enzima glicolítica identificada como un PlgR en la superficie de estreptococos es  $\alpha$ -enolasa (Bergmann S. et.al., 2001). Esta proteína posee dos residuos de Lys C-terminal importantes para la unión a Plg (Derbise et.al., 2004); sin embargo, un sitio adicional que contiene a dos Lys al interior de la secuencia también resultó ser significativo en la unión a Plg (Bergmann et.al., 2003).

Estas enzimas glicolíticas, habían sido sólo consideradas como enzimas domésticas o de mantenimiento celular, su función quedaba restringida al metabolismo y su localización al citoplasma. No obstante al ser encontradas en la superficie celular de diferentes organismos, algunos de ellos patógenos, estas enzimas domésticas han adquirido una nueva faceta al considerarse que pueden tener funciones diferentes a las metabólicas. Una muestra de ello es la interacción que tienen con el sistema Plg/Plm sumado a la capacidad de adherirse a otros componentes del hospedero, como es el caso de la GA3PDH que tiene interacción con fibronectina (**Fn**). El mecanismo de secreción de estas enzimas y su asociación en la superficie celular es desconocido, ya que no presentan una secuencia señal o un motivo de anclaje a membrana. Sin embargo, lo que es cada vez más claro, es que estas funciones recién descubiertas en enzimas típicas del metabolismo, aumentan la virulencia de varias especies bacterianas permitiéndoles localizarse en el ambiente intercelular o de matriz extracelular, ayudándoles a colonizar y subsecuentemente invadir los tejidos, por lo que se les ha considerado también como factores de virulencia (Pancholi & Chhatwal, 2003).

La mayoría de los PlgRs identificados en estos géneros bacterianos tienen otras funciones, las cuales pueden ser esenciales en la mayoría de los casos, tales como adhesión, movimiento o función metabólica, lo que ha hecho difícil su estudio en el contexto de la bacteria al intentar un bloqueo o silenciamiento específico (Lähteenmäki et.al., 2005). En la Tabla 1 se resumen las proteínas de unión a Plg descritas hasta el momento para diferentes patógenos.



Tabla 1. Proteínas de unión a Plg o PlgRs en diferentes patógenos.

Especie bacteriana	Receptor	Otras funciones	Referencia
<i>Borrelia burgdorferi</i>	70 kDa (OppA)	Homología con proteínas periplásmicas de unión a oligopeptidos	(Hu et al., 1997).
	Lipoproteína A (OspA)		(Fuchs et al., 1994).
<i>Borrelia coriaca</i> , <i>B. garinii</i> , <i>B. parkeri</i> , <i>B. anserina</i> , <i>B. turicatae</i> y <i>B. hermslii</i>	No identificado		(Coleman et al., 1995).
<i>Branhamella catarrhalis</i>	No identificado		(Ullberg et al., 1990).
<i>Escherichia coli</i>	Fimbriae	Adhesión a receptores celulares y componentes de MEC (laminina, fibronectina, colagenas)	(Korhonen et al., 1997).
	Flagelo	Organelo motil	(Lähteenmäki et al., 1993).
<i>Fusobacterium nucleatum</i>	No identificado		(Darenfed et al., 1999).
Grupo A de estreptococos	$\alpha$ -enolasa (SEN)	Enzima glicolítica	(Pancholi & Fischetti, 1998)
Grupos A y C de estreptococos	Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa (GA3PDH)	Enzima glicolítica. Adhesión a fibronectina, lisozima, miosina y actina.	(Lottenberg et al., 1992) (Winram & Lottenberg, 1998).
Grupos A, C y G de estreptococos	Proteína tipo M (PAM)	Adhesión a fibrinógeno y actina. Mediadores de resistencia a fagocitosis.	(Berge & Sjöbring, 1993).
<i>Haemophilus influenzae</i>	Aspartasa	Enzima catabólica	(Ullberg et al., 1990) (Sjöström et al., 1997).
<i>Helicobacter pylori</i>	PgbA		(Ljungh, 2000)
	PgbB		(Jönsson et al., 2004).
<i>Mycoplasma fermentans</i>	No identificado		(Tarshis et al., 1993) (Yavlovich et al., 2001).
<i>Neisseria meningitidis</i> , <i>N. gonorrhoeae</i>	No identificado		(Ullberg et al., 1992).
<i>Proteus mirabilis</i>	No identificado		(Ullberg et al., 1990).
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	No identificado		(Ullberg et al., 1990) (Ferreira da Silva et al., 2004).
<i>Salmonella sp.</i> <i>Salmonella typhimurium</i>	Fimbriae	Adhesión a receptores celulares y componentes de MEC (laminina, fibronectina, colagenas)	(Korhonen et al., 1997).
	Flagelo	Organelo motil	Lähteenmäki K. and T.K. Korhonen (datos no publicados)
<i>Staphylococcus aureus</i>	No identificado		(Kuusela & Saksela, 1990) (Mölkänen et al., 2002).
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	$\alpha$ -enolasa (Eno)	Enzima glicolítica	(Eberhard et al., 1999) (Bergmann S. et al., 2001).
<i>Treponema denticola</i>	No identificado		(Lähteenmäki et al., 2001).
Otros patógenos	Receptor	Otras funciones	Referencia
<i>Candida albicans</i>	Fosfoglicerato mutasa, alcohol deshidrogenasa, tioredoxina peroxidasa, catalasa, factor de elongación transcripcional, GA3PDH, fosfoglicerato cinasa y aldolasa fructosa bisfosfato	Metabolismo	(Crowe et al., 2003).
<i>Pneumocystis carinii</i>	$\alpha$ -enolasa	Enzima glicolítica	(Fox & Smullan, 2001).

Tabla modificada y aumentada de (Lähteenmäki et al., 2001)

El papel del sistema Plg/Plm en infecciones bacterianas se ha caracterizado también empleando ratones deficientes de Plg (*plg*<sup>-/-</sup>). Los ratones *plg*<sup>-/-</sup> infectados con *Yersinia pestis* (Goguen et al., 2000) o con *Streptococcus* del grupo A (Li et al., 1999), mostraron mayor resistencia para desarrollar la patología en comparación con los ratones del tipo silvestre. De igual manera, la espiroqueta *Borrelia burgdorferi* necesitó de la presencia de Plg para diseminarse eficientemente dentro de su vector y para producir en ratones una bacteremia de mayor intensidad, según lo demostraron estudios con ratones ‘Knock-out’ de Plg (Coleman et al., 1997).



A diferencia de los estreptococos, en *B. burgdorferi*, el agente etiológico de la enfermedad de Lyme, no ha sido encontrado ningún activador de Plg endógeno, no obstante el Plg unido a la superficie de la espiroqueta es activado por uPA y la Plm unida a *B. burgdorferi* promueve la degradación de componentes de matriz extracelular (Coleman et.al., 1999) y la migración a través de monocapas endoteliales (Coleman & Benach, 1999). Además, tanto las células bacterianas como uno de sus PlgRs, la proteína OspA purificada, estimulan la producción de pro-uPA en monocitos humanos y aumentan la expresión y liberación de uPAR (Coleman et.al., 2001; Coleman & Benach, 2003). *B. burgdorferi* también muestra adherencia a componentes de matriz extracelular, los cuales pueden ser importantes como blancos de la Plm unida a la bacteria. Otro hecho notable en esta espiroqueta, es que no produce colagenasas, sin embargo, los niveles de MMP-1 y MMP-3 están elevados en los fluidos sinoviales de pacientes con artritis de Lyme y la infección con la bacteria induce expresión de MMPs en condrocitos humanos (revisado en (Lähteenmäki et.al., 2005)).

Los ejemplos anteriores demuestran la capacidad tan versátil de las bacterias para interactuar y aprovechar el sistema Plg/Plm como un mecanismo de diseminación e invasividad, al igual que sucede con las células tumorales.

Otro patógeno que ha mostrado tener interacción con este sistema y es el tema central de este trabajo es *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la tuberculosis humana, lo cual se tratará con más detalle a continuación.



### **1.3. *Mycobacterium tuberculosis* y *La Tuberculosis humana***

#### **1.3.1. *M. tuberculosis***

*M. tuberculosis* es un microorganismo intracelular aerobio facultativo. Es una bacteria con forma de bacilo de lento crecimiento (replicación cada 18 hrs) que posee una pared celular muy compleja compuesta por una gran cantidad de lípidos (60% aproximadamente), entre los que se encuentran los ácidos micólicos (ácidos grasos de cadena muy larga) y las ceras D. Esta característica permite la retención del colorante carbol fucsina fenificada en la pared aún después de ser tratadas con una mezcla de ácido hidroclicórico-etanol, por lo que también se les considera bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) (Levinson & Jawetz, 2000).

*M. tuberculosis* pertenece a la Clase de las actinobacterias; Orden Actinomycetales; Familia Mycobacteriaceae; Género *Mycobacterium*; y al complejo *Mycobacterium tuberculosis* que incluye a las especies *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. africanum*, *M. microti*, "*M. canettii*", *M. caprae* y *M. pinnipedii*.

La mayoría de las micobacterias son organismos de vida libre y sólo muy pocas causan enfermedad como *M. leprae* y los miembros del complejo *M. tuberculosis*. *M. tuberculosis*, el causante de la tuberculosis en humanos, ha evolucionado como un patógeno exitoso debido a su habilidad para sobrevivir en su hospedero y evadir la respuesta del sistema inmune habitando incluso en el interior de células fagocíticas como macrófagos.

#### **1.3.2. *Importancia de la tuberculosis humana***

La tuberculosis (**TB**) es una enfermedad muy antigua y en la actualidad continúa siendo un problema de salud pública en todo el mundo, por lo que la Organización Mundial de la Salud (OMS) la ha declarado como emergencia global desde 1993. La OMS estimó que 1.3 millones de personas fallecieron a causa de esta enfermedad en el 2007 y que 9.27 millones de nuevos casos ocurrieron en el mismo año. Además estima que más de 2 billones de personas, lo que equivale a un tercio de la población mundial, está infectada con el bacilo tuberculoso (WHO, 2009; World Health Organization; Tuberculosis Facts, 2008 ). Así mismo, al control de este problema de salud se le suman: la aparición de cepas resistentes a drogas, algunas incluso multi-drogo-resistentes y la pandemia con el Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), ya que se calcula que de los



casos de incidencia de TB el 33% son VIH positivos. Las perspectivas indican que la fuente de desarrollo de nuevas drogas no es suficiente y no hay evidencias de que una vacuna para la tuberculosis en adultos esté disponible por lo menos en una década (Kaufmann, 2008).

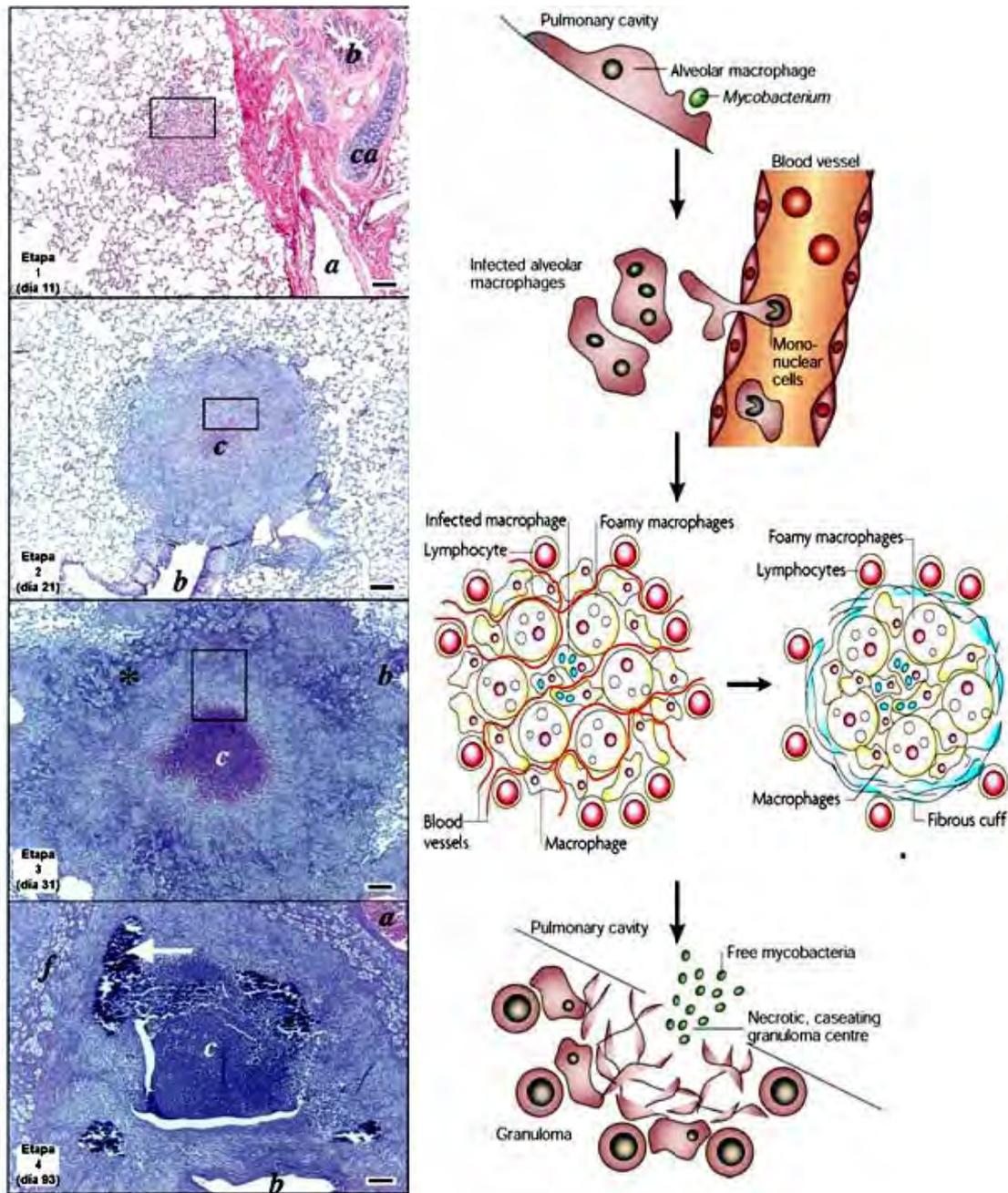
### ***1.3.3. Patogénesis de la Tuberculosis***

La TB es una enfermedad infecciosa de transmisión aérea que se caracteriza por formar lesiones denominadas granulomas o tubérculos. Aunque es alto el número de individuos infectados, solo del 5 al 10 % desarrollan la enfermedad de manera progresiva, lo que indica que el sistema inmune es eficiente en el control de la misma. La TB pulmonar es la forma principal de la enfermedad ya que el pulmón es el blanco primario de la micobacteria, la cual causa una infección focal en el sitio donde se deposita después de la inhalación (Palomino, Leão, & Ritacco, 2007). Una vez que se encuentra en el lumen de los alvéolos pulmonares, se cree que el bacilo es fagocitado rápidamente por los macrófagos alveolares residentes, lo que induce una respuesta pro-inflamatoria localizada que conduce al reclutamiento de células mononucleares provenientes de los vasos sanguíneos adyacentes (Russell, 2001). Las células reclutadas producen quimiocinas y citocinas que amplifican el reclutamiento celular y remodelan el sitio de infección dando lugar a una masa celular que es a lo que se le conoce como granuloma (Figura 1.11).

El granuloma se compone de un centro que comprende a los macrófagos infectados rodeados por células gigantes vacuoladas o macrófagos espumosos y en la capa más externa se reconoce la presencia de linfocitos que delimitan la periferia de la estructura, la cual puede estar rodeada por colágena y otros componentes de matriz extracelular (Russell, 2007).

Si la infección no puede contenerse en el nivel local, la bacteria se multiplica y subsecuentemente puede ganar acceso al torrente sanguíneo. Este proceso de diseminación extrapulmonar puede ocurrir por la vía hematológica, probablemente mediante el transporte de los bacilos en el interior de macrófagos; o bien, alcanzar los nódulos linfáticos por la ruta linfática (Harmsen et.al., 1985).

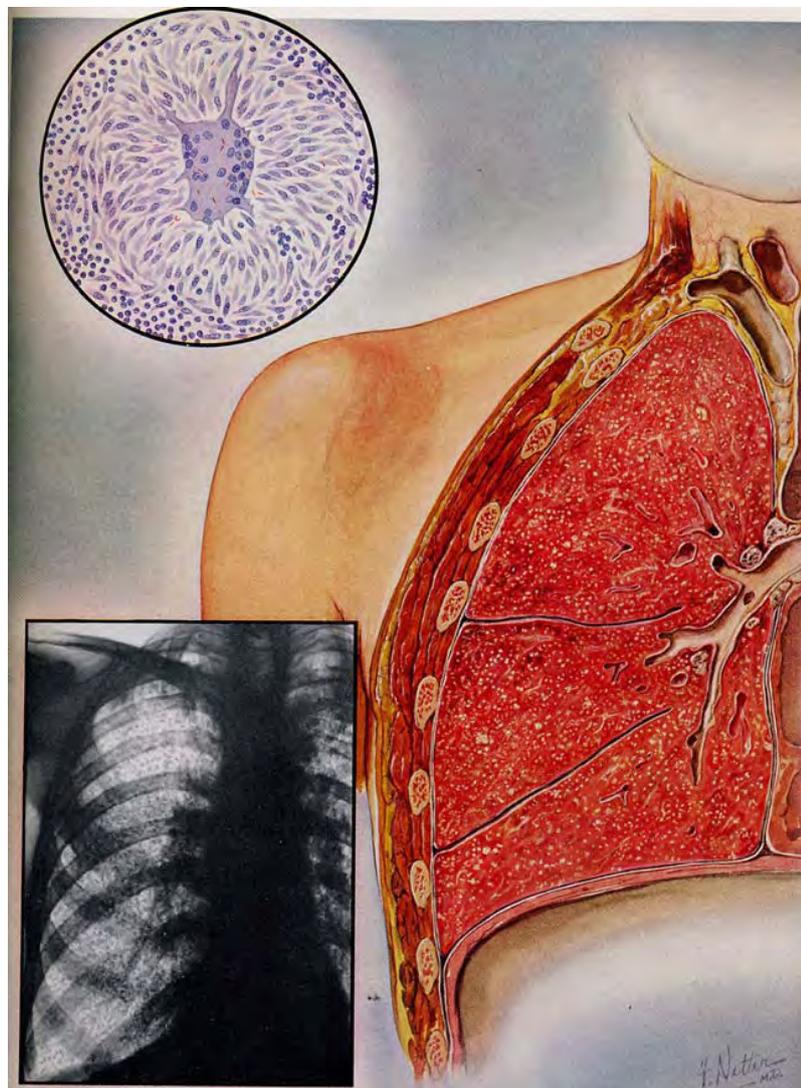




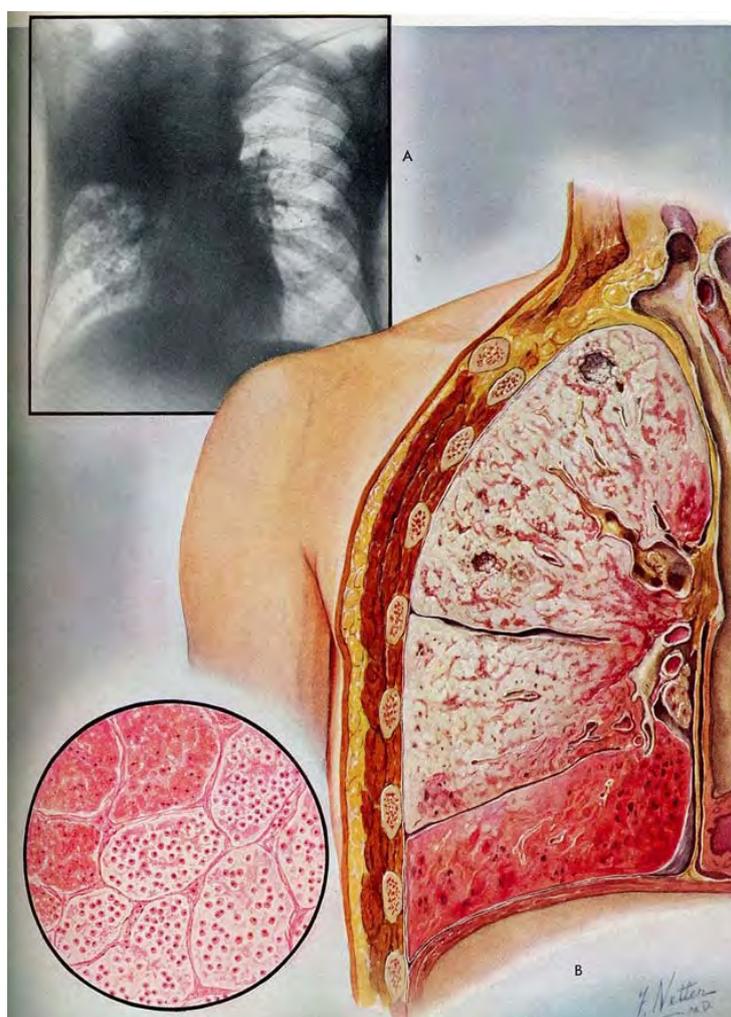
**Figura 1.11 Formación y desarrollo del granuloma.** Derecha. Representación esquemática de las etapas de formación de un granuloma desde la infiltración inicial de las células del sistema inmune hasta la maduración y desregulación en la contención de la infección. Izquierda. Desarrollo de un granuloma en cortes histológicos de pulmón en un modelo de infección en cobayo; cada cuadro corresponde a los días 11, 21, 31 y 93 post-infección con *Mycobacterium tuberculosis*. (Tomado y modificado de Turner et.al., 2003; Russell, 2001; Russell, 2007).

En estudios recientes, se ha sugerido que también pueden existir mecanismos de diseminación de la micobacteria macrófago-independientes, dado que en ratones depletados de macrófagos alveolares aun se observa la diseminación extrapulmonar (Leemans et.al., 2001). La diseminación hematogena masiva puede resultar en TB miliar, en la cual se observa a los granulomas caseificados como pequeñas semillas distribuidas por todo el órgano afectado (Figura 1.12). El proceso de diseminación sistémica le permite a la bacteria alcanzar regiones vulnerables como los huesos y articulaciones, como es en el caso de la tuberculosis espinal o enfermedad de Pott; el sistema nervioso central, en el caso de la tuberculosis meníngea o diversos órganos importantes como riñones, médula ósea, bazo, hígado, intestino y genitales (Vidal Pessolani et.al., 2003).

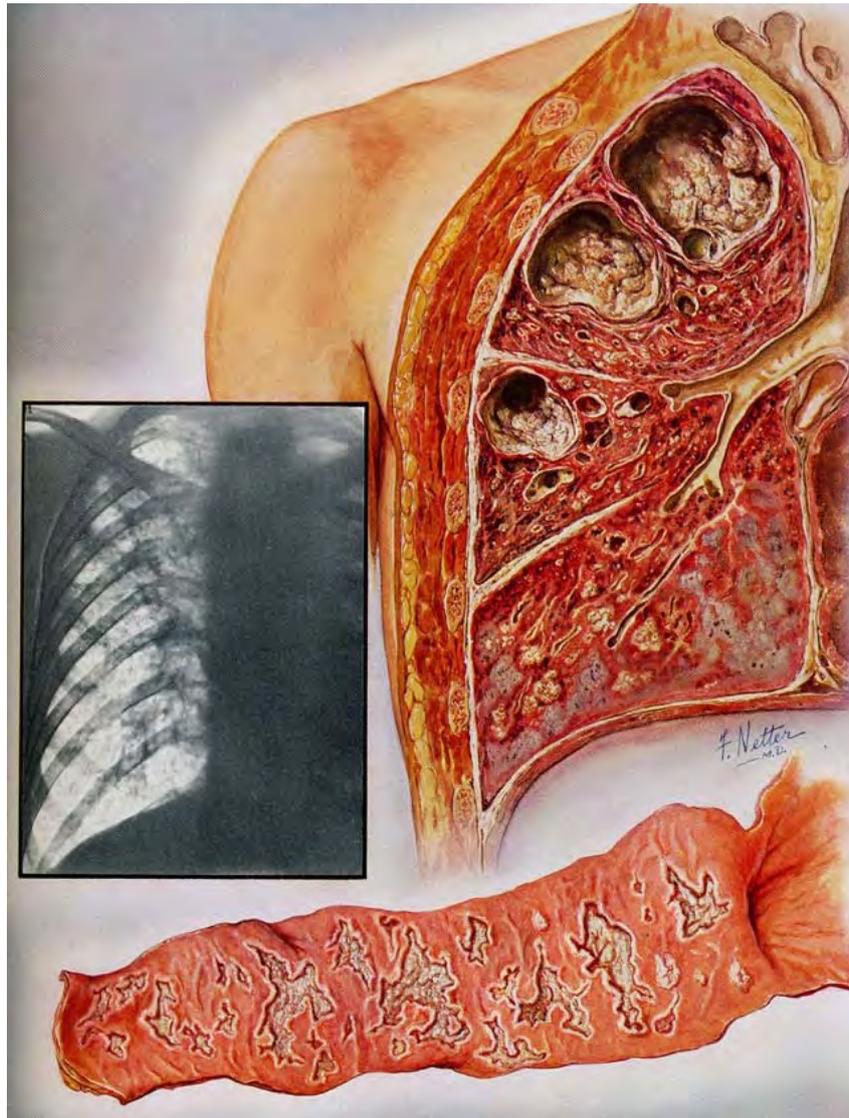
**Figura 1.12 Representación esquemática de un pulmón con TB miliar.** Los granulomas caseificados están distribuidos desde la región apical hasta la base del pulmón y son claramente evidentes en la radiografía. La figura en la esquina superior izquierda representa a un solo granuloma que contiene bacilos ácido-alcohol resistentes dentro de una célula gigante irregular rodeada por células epitelioides y monocitos (Tomado de Rubin & Rubin, 1948 con Copyright de Ciba Pharmaceutical Products Inc., Summit, N.J.)



Durante la enfermedad progresiva, el serio daño tisular que la presencia de la micobacteria puede generar incluye lesiones caseosas (Figura 1.13), fibrosis, necrosis licuefactiva y cavitación (Dheda et.al., 2005) (Figura 1.14). Es en este punto cuando la transmisión de la bacteria es más alta, ya que las lesiones acarrear la presencia de tos en el individuo infectado, lo que facilita la dispersión de los bacilos infecciosos (Russell, 2001). La neumonía y el daño tisular ocasionados llevan a la pérdida del volumen en el pulmón, bronquiectasia y hemoptisis, concluyendo con fallo respiratorio del individuo (Dheda et.al., 2005).



**Figura 1.13 Representación esquemática de un pulmón con neumonía caseosa.** Consolidaciones densas en el lóbulo superior derecho del pulmón delineadas por fisuras interlobulares con presencia de pequeñas cavitaciones. En la figura insertada, se representa a las infiltraciones celulares de la región inferior en el pulmón. (Tomado de Rubin & Rubin, 1948 con Copyright de Ciba Pharmaceutical Products Inc., Summit, N.J.)



**Figura 1.14 Representación esquemática de TB fibro-ulcerativa.** En el pulmón se observan tres grandes cavidades de contornos caseosos en los lóbulos superior y medio del pulmón, el resto muestra pequeñas cavidades y focos caseosos. En la figura de la parte inferior, se representa un segmento de intestino con úlceras superficiales 'apolilladas' características de una tuberculosis intestinal. (Tomado de Rubin & Rubin, 1948 con Copyright de Ciba Pharmaceutical Products Inc., Summit, N.J.)

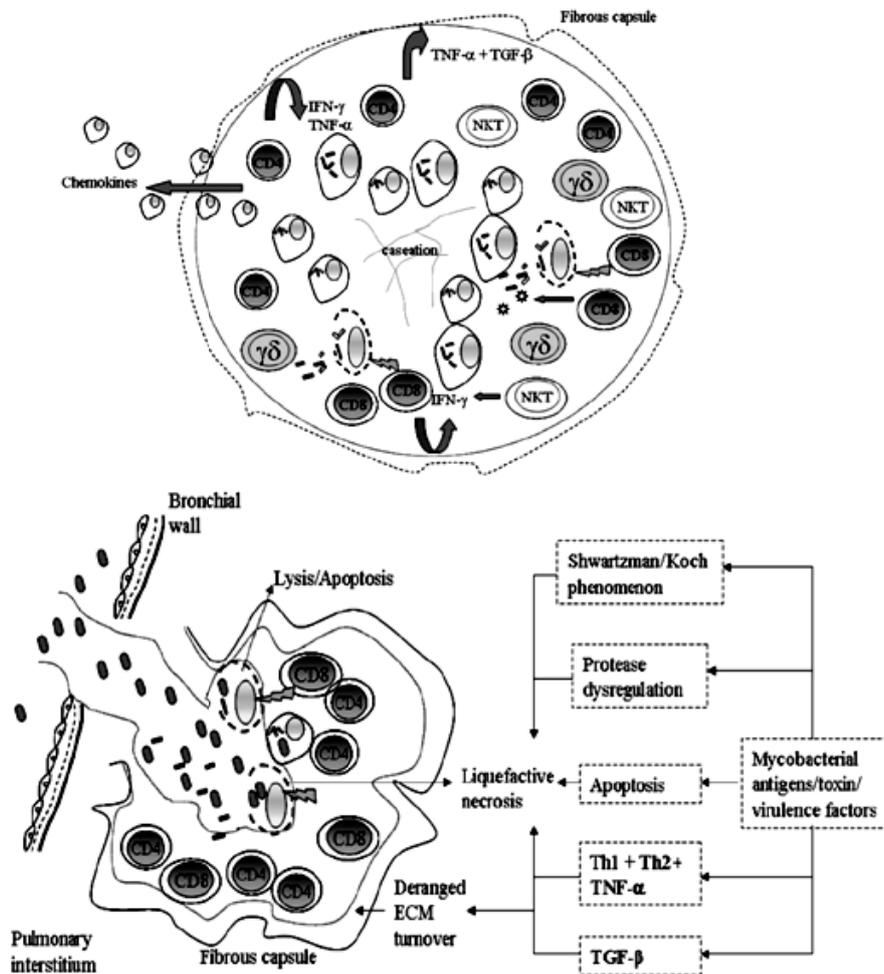
El papel del granuloma ha sido muy importante en la contención de la infección restringiendo a las bacterias tuberculosas en un sitio donde los elementos del sistema inmune pueden resolver la infección y prevenir la enfermedad progresiva (Saunders et.al., 1999). Sin embargo, recientemente se ha sugerido que puede tener una faceta opuesta, ya que por un lado, es el que contiene a la infección, pero por el otro lado, si esta contención falla después de un cambio en el estatus inmunológico del hospedero, lo cual es usual en una edad avanzada,

desnutrición, estrés o co-infección con VIH, entonces el granuloma se convierte en la fuente y ambiente propicio para la diseminación sistémica de las bacterias (Russell, 2001).

Se ha sugerido que un granuloma desregulado está asociado con la presencia de necrosis licuefactiva, en donde la licuefacción es un medio de cultivo ideal para la multiplicación extracelular de las micobacterias, debido a que los macrófagos no pueden sobrevivir en el tejido necrótico. Es posible que las enzimas proteolíticas producidas por las células del sistema inmune (MMPs, proteasas lisosomales como catepsinas, y el sistema Plg/Plm) afecten la integridad de la cápsula fibrosa que rodea al granuloma y es entonces cuando el material del centro caseoso puede ser descargado en los vasos sanguíneos vecinos (Dheda et.al., 2005).

Dheda y colaboradores proponen que aunque el mecanismo exacto de la licuefacción es desconocido, existe información que sugiere que una proteólisis desregulada, la toxicidad directa de la micobacteria, el fenómeno de Koch (necrosis en el sitio de infección después de un reto con tuberculina), la reacción de Shwartzman (necrosis cutánea después de una inyección intravascular de lipopolisacárido en el sitio previo de inyección de endotoxina) y las citocinas y factores producidos por las células efectoras del sistema inmune del hospedero son piezas clave en el balance en la contención por el granuloma (Figura 1.15).





**Figura 1.15 Elementos involucrados en la formación de granulomas y remodelación de la arquitectura del pulmón.** La llegada temprana de células T  $\gamma\delta$ , células NK T y granulocitos es importante en la etapa inicial del granuloma, le sigue la infiltración de poblaciones de células T efectoras, tanto CD4+ como CD8+ productoras de interferón gamma (INF $\gamma$ ) y del factor de necrosis tumoral alfa (TNF $\alpha$ ). Colectivamente estas células inician una cascada de quimiocinas y citocinas que atraen a otros macrófagos y células T tardías al sitio de infección. Diversos factores pueden contribuir a la desregulación del granuloma; los antígenos micobacterianos pueden mediar la actividad de proteasas, apoptosis, el fenómeno de Koch/Shwartzman y quizás la lisis mediada por células e inducir la liberación de citocinas que en conjunto promoverían la licuefacción y la remodelación de la matriz extracelular. Las micobacterias extracelulares pueden multiplicarse y degradar la cápsula fibrosa del granuloma, lo que les abriría paso al interior del lumen bronquial o de vasos sanguíneos. (Tomado de Dheda et.al., 2005).

Este daño causado por la infección con *M. tuberculosis* se ha atribuido principalmente a la respuesta exacerbada del sistema inmune, sin embargo se conoce muy poco del papel de la bacteria en el daño e invasividad.



### 1.4. *Mycobacterium tuberculosis* y El Sistema Plg/Plm

Como ha sido descrito anteriormente, en respuesta a una infección bacteriana, las células del sistema inmune son reclutadas al sitio de infección y en los procesos de inflamación el sistema Plg/Plm juega un papel importante (Del Rosso et.al., 2008). En la infección con algunas bacterias, se describió que además de interactuar con este sistema, las bacterias pueden mediar la secreción de componentes del sistema principalmente activadores fisiológicos, favoreciendo la generación de Plm.

Existen algunos reportes que sugieren que los elementos del sistema Plg/Plm también están presentes en el sitio de infección con miembros del género *Mycobacterium*, o bien, que su secreción esté mediada por antígenos de la micobacteria. En 1978, Gordon y Cohn demostraron que los macrófagos peritoneales de ratones infectados con *Mycobacterium bovis* BCG producen activador de Plg y que los niveles de este activador se incrementan de manera específica cuando los macrófagos son estimulados con derivado proteico purificado (PPD) (Gordon & Cohn, 1978). Otro estudio evidenció que los niveles de activador de Plg secretado por macrófagos alveolares derivados de conejos, es mayor en conejos previamente tratados con BCG que en conejos normales, lo cual no se observa con la presencia de otro microorganismo como *Bordetella bronchiseptica* (Schuyler & Forman, 1984).

Así mismo, la estimulación de macrófagos peritoneales con BCG o con *M. tuberculosis* induce la producción de MMPs (Quiding-Järbrink et.al., 2001). Y en estudios *in vivo*, los ratones infectados con *M. tuberculosis* presentan niveles incrementados de MMP9 y MMP2, que son sustratos de Plm (Rivera-Marrero et.al., 2000).

Otro reporte que pone de manifiesto que elementos del sistema Plg/Plm están presentes, es la alta expresión de uPAR en monocitos de pacientes con tuberculosis (Juffermans et.al., 2001). De igual manera, en sueros de pacientes con tuberculosis son detectados niveles altos de uPAR soluble, lo cual está asociado a un pronóstico de mortalidad (Eugen-Olsen et.al., 2002).

Estos estudios sugieren que posiblemente los niveles de Plg en el sitio de la infección también se encuentren elevados lo que facilitaría la interacción de la micobacteria con el sistema Plg/Plm.



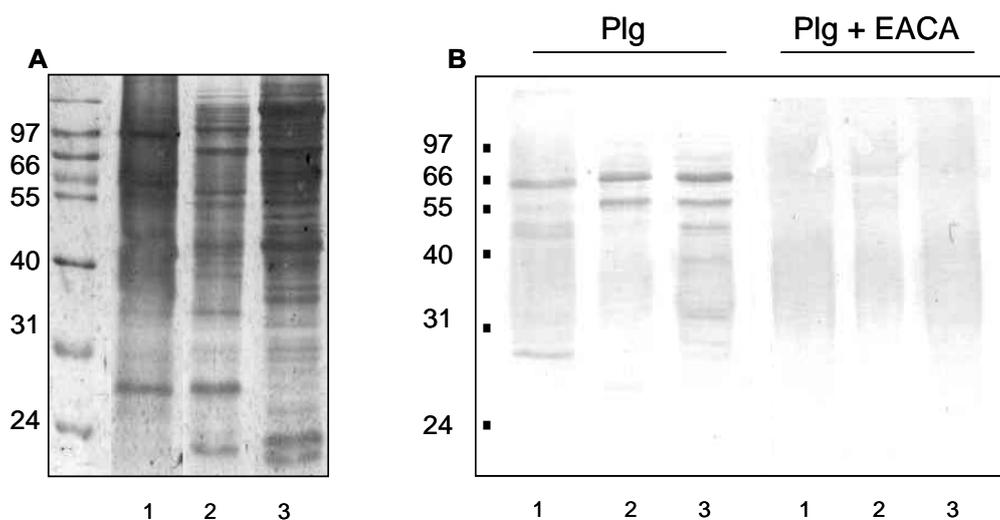
## Capítulo 2

# Antecedentes

**E**n el año 2000, en el grupo de la Dra. Espitia, se describió la interacción de *M. tuberculosis* con el sistema Plg/Plm *in vitro* (Monroy et.al., 2000). En ese trabajo se observó que la interacción de la micobacteria con el Plg humano involucra la participación de los LBS, ya que la interacción puede ser inhibida con un análogo de Lys, el ácido  $\epsilon$ -aminocaproico (**EACA**). Además, se demostró que en presencia de fibrina, un extracto proteico soluble de la micobacteria puede actuar como un activador de Plg.

En el mismo trabajo, se encontró por Westernblot en tres fracciones proteicas analizadas, la presencia de varias bandas de proteína con capacidad para unir Plg como se muestra en la Figura 2.1, sin embargo, su identidad no fue determinada.





**Figura 2.1** Fracciones proteicas de *M. tuberculosis* resueltas por SDS-PAGE al 12% y transferidas a membranas PVDF. A) Membrana teñida con azul de coomassie. B) Ligand blot, membrana incubada con Plg/AntiPlg y con Plg+EACA/AntiPlg. 1. Fracción de Paredes celulares, 2. Extracto proteico soluble ES, 3. Proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis*.

De acuerdo a los antecedentes mencionados, puede sugerirse que el sistema Plg/Plm es un sistema susceptible de ser aprovechado por la micobacteria, tal como se ha descrito para otros patógenos. Lo cual le ayudaría a adquirir en su superficie una actividad proteolítica que le permita abrirse paso a través de barreras tisulares como uno de los mecanismos de diseminación y/o daño.

La identificación y caracterización de las moléculas que participan en esta interacción es fundamental tanto en el conocimiento de la biología de la bacteria como en la relación con el hospedero.

# Capítulo 3

## Hipótesis

**M***ycobacterium tuberculosis* posee proteínas que interactúan con el sistema Plg / Plm humano favoreciendo la conversión del Plg a la forma enzimáticamente activa Plm, lo cual puede jugar un papel muy importante en la patogenia de la enfermedad.



# Objetivos

## 3.1. Objetivo general

Identificar y caracterizar las proteínas de *Mycobacterium tuberculosis* que unen plasminógeno humano.

## 3.2. Objetivos específicos

- ♣ Separar e identificar las proteínas de *M. tuberculosis* que unen Plg por electroforesis bidimensional y *ligand blotting*.
- ♣ Evaluar el efecto de la presencia de las proteínas de *M. tuberculosis* en la conversión del Plg a Plm por tPA.
- ♣ Evaluar la conversión del Plg a Plm por tPA con las proteínas de *M. tuberculosis* en presencia de un análogo de lisina o el inhibidor fisiológico  $\alpha 2$ -antiPlm.
- ♣ Obtener algunas de las proteínas de *M. tuberculosis* que unen Plg de manera recombinante en *E. coli*.
- ♣ Evaluar el efecto de la presencia de las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* en la conversión del Plg a Plm por tPA.
- ♣ Identificar la región de unión a plg en las proteínas.
- ♣ Determinar las constantes de unión entre Plg y las proteínas de unión a Plg de *M. tuberculosis*.
- ♣ Demostrar la interacción de las proteínas recombinantes con las proteínas de MEC fibronectina y laminina.

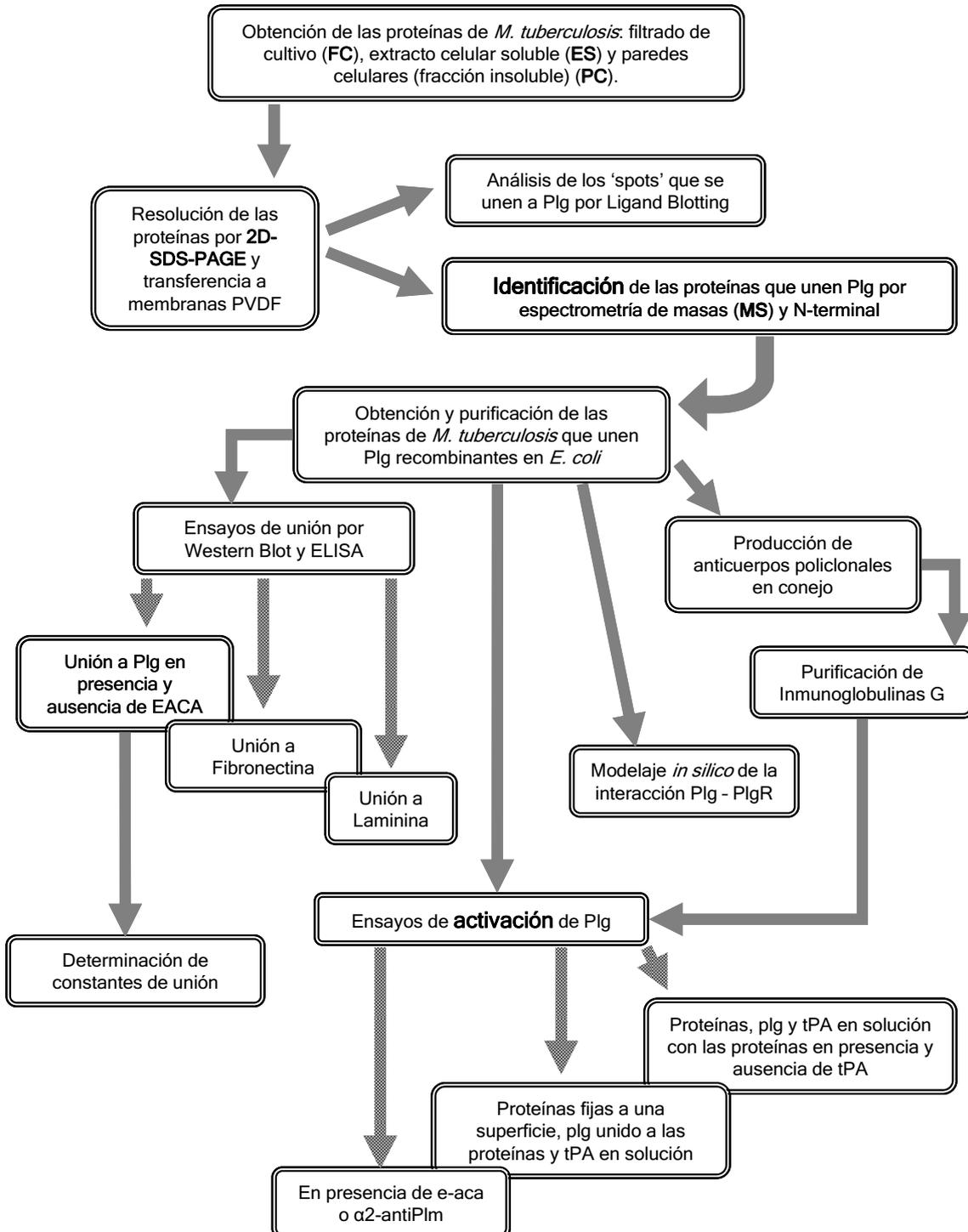


# *Capítulo 4*

# **Materiales y Métodos**



### 4.1. Diseño Experimental



## ***4.2. Identificación de las proteínas de unión a Plg***

### ***4.2.1. Obtención de diferentes extractos proteicos de M. tuberculosis.***

**L**a cepa H37Rv de *M. tuberculosis* se cultivó durante 6 semanas en medio PBY (Proskauer y Beck modificado por Youmans). La masa bacteriana se separó del medio de cultivo por filtración; las proteínas del filtrado de cultivo (**FC**) se precipitaron con sulfato de amonio como lo describió Espitia y colaboradores en 1991 (Espitia et.al., 1991). Las células bacterianas se trataron con azida de sodio al 2% por 48 horas a temperatura ambiente. Una vez inactivadas, las bacterias se lavaron y resuspendieron en solución amortiguadora PBS (10 mM de amortiguador de fosfatos; fosfato de sodio monobásico y fosfato de sodio dibásico, 150 mM NaCl, pH 7.4) y lisadas por sonicación durante 15 minutos (alternando pulsos de 1 min on y 1 min off). El lisado celular se centrifugó a 10,000 xg por 20 min para separar las paredes rotas (pellet) de la porción soluble (sobrenadante) obteniendo así las proteínas del Extracto Soluble (**ES**). Las proteínas de las paredes celulares (**PC**) se trataron con SDS al 2 % a 60°C durante 2 horas, la muestra se centrifugó a 10,000 xg por 10 min y el sobrenadante se separó y almacenó a -20 °C.

### ***4.2.2. Electroforesis bidimensional o 2D-SDS-PAGE.***

Las proteínas de las fracciones ES y FC se desalaron por filtración en gel (columna de Sephadex G-25 Nap-5, GE Healthcare) con amortiguador de fosfatos 10 mM pH 7.4, concentradas por ultrafiltración, cuantificadas por el método de Lowry modificado y tratadas con un kit de limpieza comercial (2D-Clean Up Kit, Amersham Biosciences). La fracción de PC también se desaló usando una columna de filtración en gel pero en el procedimiento se desplazó el SDS que contenía la muestra con 2% del detergente no iónico CHAPS en el amortiguador de fosfatos. Después de lo anterior, la muestra se cuantificó y trató con el método de precipitación TCA-DOC-Acetona. Se resuspendieron aproximadamente 90 µg de cada fracción proteica en 125 µl de solución de rehidratación (8M urea, 2% CHAPS, 0.5% amortiguador IPG pH 4 a 7 y 20 mM DTT) y con ello se rehidrató durante 16 h una tira IPG de 7 cm con gradiente inmovilizado de pH 4-7 (GE Healthcare). Las proteínas se separaron por isoelectroenfoque en la



unidad Ethan IPGphor 3 con el siguiente programa: a) step 300 V, 200 V/h, b) grad 1000 V, 300 V/h, c) grad 5000 V, 4500 V/h, d) step 5000 V, 2000 V/h. Después de la focalización, las tiras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso o bien se re-equilibraron inmediatamente en una solución de equilibrio (2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glicerol, 0.002% azul de bromofenol y 0.5% DTT) por 20 min. Las proteínas focalizadas se resolvieron en geles desnaturalizantes con SDS al 12% e inmediatamente a la electroforesis se transfirieron a membranas de PVDF (Millipore). Las membranas se emplearon en los ensayos de *ligand blotting* o bien se tiñeron con azul de Coomassie para utilizarse en la identificación por espectrometría de masas (MS) o N-terminal. Para facilitar el análisis e identificación de los ‘spots’ positivos, se capturó la imagen de las membranas teñidas con un scanner de escritorio para luego ser desteñidas y emplearlas en los ensayos de *ligand blotting*. Esto permitió correlacionar directamente el ‘spot’ en el blot y en el Coomassie al momento de comparar y analizar las imágenes de 2D.

#### ***4.2.3. Ligand Blotting con Plg.***

El Plg humano (Roche) se preparó en una solución de albúmina sérica bovina (BSA) al 3% w/v en amortiguador PBS con 0.05% del detergente Tween20 (Sigma) (PBS-T). Cada membrana se incubó con Plg 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  durante 1 h a temperatura ambiente (TA) en presencia o ausencia de 100 mM EACA (Merck). Después, se lavó la membrana tres veces con PBS-T para eliminar el Plg unido inespecíficamente. Se incubó nuevamente durante 30 min. a TA con un anticuerpo policlonal comercial producido en conejo contra Plg humano (**antiPlg**) (Dako) diluido 1:1000 en la solución de BSA PBS-T. Se lavó de nuevo con PBS-T y se incubó posteriormente con Proteína A conjugada a peroxidasa (Zymed) diluida 1:2000. Los ‘spots’ que mostraron unión a Plg se revelaron después de lavar exhaustivamente, la membrana se incubó con una solución de revelado que contenía 1  $\mu\text{l}/\text{ml}$  de peróxido de hidrógeno al 30% en PBS-T y 0.4 mg/ml de 3-3 diaminobencidina (Sigma). Como controles se incluyeron membranas en las que el Plg o el antiPlg fueron omitidos durante la incubación.



#### **4.2.4. Identificación por espectrometría de masas (MS) o secuenciación de extremo amino-terminal.**

La identidad de algunos de los ‘spots’ que reaccionaron en el *ligand blotting* con Plg fue determinada cortando los spots a partir de los geles bidimensionales o bien de las membranas 2D teñidos con azul de Coomassie. La secuencia del extremo N-terminal se determinó por degradación de Edman en un secuenciador de fase gaseosa (PE Applied Biosystems, Weiterstad, Germany) gracias a las facilidades del Dr. Mahavir Singh del German Research Center for Biotechnology (GBF) en Braunschweig, Alemania. El análisis por MS se realizó en un sistema QTRAP 3200 (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada) equipado con una fuente de nano-spray y un sistema de cromatografía líquida de nano-flujo (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn, Germany) en colaboración con el Dr. Guillermo Mendoza Hernández del departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, UNAM. La identidad de las proteínas se determinó mediante el análisis de la secuencia de los péptidos obtenidos en MS con el software MASCOT (Matrixscience).

#### **4.2.5. Producción de proteínas recombinantes.**

Las regiones codificantes de los genes *Rv2220* y *Rv1886c* correspondientes a las proteínas glutamina sintetasa (GlnA1) y antígeno 85B (Ag85B) de *M. tuberculosis* respectivamente, se clonaron en el plásmido de expresión pET15b (Novagen) con el que se le adiciona a la proteína un tallo de 6 histidinas en el extremo N-terminal para facilitar su posterior purificación. La inducción y expresión de las proteínas GlnA1 en *E. coli* BL21 (DE3) y Ag85B en *E. coli* C41 permitió la sobreexpresión de cada una de las proteínas formando cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión se lavaron con PBS conteniendo Triton X-100 al 2% y se solubilizaron con un amortiguador desnaturizante (solución A: 50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 10mM imidazol, 8M urea, pH 8). La purificación de ambas proteínas se realizó mediante cromatografía de afinidad empleando una columna de níquel HiTrap Chelating HP (Pharmacia), a la cual se le acopló previamente níquel y se equilibró con el amortiguador desnaturizante o solución A. La muestra solubilizada y clarificada por centrifugación se aplicó a la columna previamente equilibrada en la solución A empleando el equipo semiautomatizado ÄKTAprime (Pharmacia). La proteína recombinante se eluyó con la solución B (50mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 300mM NaCl, 500mM



imidazol, 8M urea, pH8) generando un gradiente lineal de imidazol de 10-500 mM, las fracciones obtenidas se dializaron contra el amortiguador PBS y se analizaron por SDS-PAGE. Las proteínas DnaK o Hsp70 y  $\alpha$  cristalina o HspX también recombinantes en *E. coli*, se obtuvieron por donación del Dr. Mahavir Singh (GBF, Alemania) y de la Dra. Gabriela Barcenas (Medical Research Council Clinical Sciences Center, Hammersmith Hospital, Londres, Inglaterra) respectivamente.

#### ***4.2.6. Producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes.***

Se resolvieron 100  $\mu$ g de las proteínas DnaK, GlnA1 y Ag85B por SDS-PAGE en geles preparativos al 12 % y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. A partir de la membrana se cortó sólo la banda correspondiente a la proteína de interés teñida previamente con rojo de Ponceau. Cada tira de nitrocelulosa con antígeno fue triturada mecánicamente y pulverizada con DMSO y amortiguador de carbonatos, posteriormente se precipitó con amortiguador PBS. La nitrocelulosa pulverizada con el antígeno se emulsificó con adyuvante incompleto de Freund y con ello se inmunizó un conejo New Zeland vía subcutánea (con la asistencia del MVZ Gerardo Arrellin, Bioterio del Instituto de Investigaciones Biomédicas). Por cada proteína recombinante se inmunizaron 2 conejos; posterior a la primera inmunización se les aplicó de 2 a 3 refuerzos cada 21 días con la misma cantidad de proteína. Los títulos de anticuerpo se monitorearon por *western blot* con el suero hiperinmune obtenido a los 15 días posteriores a cada refuerzo. Cuando la detección de las proteínas con el suero hiperinmune alcanzó títulos igual o mayores a 1:2000, los conejos fueron sangrados a blanco para obtener el suero total. A partir del suero hiperinmune contra Ag85B se purificaron las inmunoglobulinas G mediante cromatografía de afinidad. Para ello, se empleó una columna de rProteína G acoplada a agarosa. El suero fue filtrado y diluido con agua 1:1 previamente a la cromatografía. Las inmunoglobulinas fueron eluidas por diferencia de pH y las fracciones obtenidas se monitoreron a  $A_{280nm}$ . Debido a que la muestra eluida quedó muy diluida respecto a la original, se concentró por ultrafiltración y se evaluó su capacidad de detección contra la proteína Ag85B por Dot Blot y por ELISA.



#### ***4.2.7. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano, fibronectina y laminina por Ligand Blotting.***

Las proteínas recombinantes DnaK, GlnA1, Ag85B y HspX purificadas se resolvieron y analizaron por SDS-PAGE al 12%. Se transfirieron a membranas PVDF y mediante *ligand blotting* se confirmó la unión de estas proteínas a Plg tal y como se describió para las membranas de 2D; esto es, incubando en presencia de Plg, después con anti-Plg y finalmente con proteína A peroxidasa. La inhibición también se confirmó incubando con 100 mM de EACA y Plg simultáneamente. De igual manera, la interacción con fibronectina (**Fn**) se llevó a cabo incubando las membranas con Fn humana (Dako) durante 1 h a TA, después con un anticuerpo policlonal hecho en conejo anti-Fn humana (Dako) 1:2000 y finalmente con proteína A peroxidasa. La unión de laminina con las proteínas también fue evaluada de forma similar, empleando merosina humana purificada (Chemicon International), anticuerpo anti-laminina producido en conejo (Dako) y proteína A peroxidasa.

#### ***4.2.8. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano por ELISA.***

Las proteínas DnaK, GlnA1, Ag85B y HspX se cuantificaron por el método de Lowry modificado y 1 µg de cada una de ellas se adsorbió a los pozos de placas de ELISA en 100 µl de amortiguador de carbonatos pH 9.6 durante 16 h a 37°C. Los pozos se bloquearon con 300 µl de BSA al 1 % en PBS-T durante 1 h a 37°C. La unión a Plg se realizó incubando a las proteínas previamente inmovilizadas durante 1 h a 37°C con 100 µl de Plg 1µg/ml en BSA al 1 % en PBS-T. La placa se lavó 2 veces con PBS-T. La detección del Plg unido a la proteína recombinante se realizó con 100 µl del anticuerpo policlonal antiPlg 1:1000 en BSA PBS-T durante 1 h también a 37°C. Finalmente la detección se hizo con 100 µl de proteína A peroxidasa diluida 1:2000 en BSA PBS-T y después de lavar exhaustivamente con PBS-T, se reveló con 150 µl de orto-fenildiamina (Sigma) 0.4 mg/ml en amortiguador fosfato-citrato pH 5 que contenía 0.4 µl/ml de peróxido de hidrógeno al 30%. La reacción colorimétrica generada se detuvo después de transcurrir de 10 a 15 min con 50 µl de HCl 3N y posteriormente se leyó a D.O.<sub>492 nm</sub> en un lector de placas para ELISA (Thermolabsystems). Al igual que en el ligand blotting, el experimento se realizó en presencia de EACA como inhibidor.



### ***4.3. Caracterización de la interacción de Plg con la proteína Ag85B.***

#### ***4.3.1. Modelo de la interacción Plg-Lys.***

Para evaluar cual de las lisinas presentes en Ag85 era capaz de mediar las interacciones dependientes de lisina con los LBS del Plg, en colaboración con la Dra. Blanca Ruiz y el Dr. Luis Rosales, se realizaron ensayos de docking y modelaje molecular. Para ello, se emplearon las estructuras del Ag85A y del dominio kringle 1 del Plg (Plg-K1).

Como ninguna de las proteínas del complejo Ag85 posee Lys C-terminal, estos ensayos se llevaron a cabo usando como referencia la interacción Lys-LBS del complejo homodimérico del kringle 2 (K2) del tPA (PDB ID:1TPK), la cual es un modelo funcional de interacciones entre el LBS de un dominio K2 y una Lys interna del dominio adyacente. En este modelo se ha caracterizado el microambiente y exposición en la superficie de la Lys que interactúa con el LBS. Con base en este modelo, se analizaron las estructuras de las proteínas del complejo Ag85, las cuales se han resuelto por cristalografía de rayos X. Inicialmente, se analizó cada Lys presente en las tres proteínas de Ag85 (Ag85A, PDB ID:1SFR; Ag85B, PDB ID:1F0P; Ag85C, PDB ID:1DQZ) buscando las siguientes características estructurales: (1) un área expuesta al disolvente mayor a  $130 \text{ \AA}^2$ . Este valor fue determinado con el programa NACCESS (NACCESS, version 2.1.1. , 1996) considerando un área 30% menor que el área de interfase. (2) La presencia de un grupo carboxilo expuesto y (3) su posición dentro de un asa. A partir de este análisis se obtuvieron valores de probabilidad que permitieron comparar las características entre las Lys. De todas las Lys analizadas, se seleccionó a la Lys de la posición 89 presente en Ag85A y Ag85B como el mejor candidato para mediar la interacción dependiente de Lys y sus coordenadas fueron empleadas en un ensayo de docking manual entre Ag85A y el Plg-K1 (PDB ID: 1CEA). Con la finalidad de evaluar el posible papel de la Lys 89 entre esas dos proteínas, se analizó la estabilidad de los siguientes complejos: (1) el complejo entre Plg-K1 y Ag85B; (2) el complejo Plg-K1 y la proteína mutante Ag85B<sup>arg89</sup> y (3) el complejo Plg-K1 y la mutante de Ag85B<sup>ala89</sup>. El afinamiento de cada complejo se llevó a cabo por dinámica molecular usando el programa NAMD2 (Kalé et.al., 1999) con el campo de fuerza CHARMM19 (Brooks et.al., 1983). En la configuración del sistema se incluyó el método de partícula mesh Edwald (PME) para un rango amplio de electrostática (Darden et.al., 1993), un punto de corte de  $10 \text{ \AA}$  para interacciones de Van der Walls y condiciones periódicas alrededor que permitieran una distancia mínima de  $5 \text{ \AA}$



desde el modelo hacia el borde de la caja. Todos los puentes que involucraran un átomo de hidrógeno fueron constreñidos utilizando el algoritmo SHAKE (Ryckaert et.al., 1977) para permitir un paso de tiempo de 2 fs. Para generar el disolvente, una caja fue llenada con moléculas de agua permitiendo una distancia mínima de 15 Å entre los complejos y los bordes de la caja, el solapamiento de las moléculas de agua fue removido usando el programa Visual Molecular Dynamics (VMD) (Humphrey et.al., 1996). El protocolo de afinamiento consistió en: (1) minimizar la energía a 2500 pasos; (2) dos ciclos de dinámica molecular (MD) (2.5 ps) y minimización de energía (2500 pasos), átomos de proteína fijos; (3) 2 ciclos de MD (2.5 ps) y minimización de energía (2500 pasos), átomos de carbonos alfa refrenados; (4) 2 ciclos de MD no refrenados (2.5 ps) y minimización de energía (2500 pasos). Para estudiar la estabilidad global del complejo, el sistema disolvente/proteína fue equilibrado a 300 K por 2 ns de MD y la trayectoria de la simulación fue muestreada cada 10 ps.

#### ***4.3.2. Producción de las proteínas Ag85B, Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup> recombinantes en forma soluble.***

El gen *Rv1886c* fue amplificado por PCR como se mencionó anteriormente, se introdujo una mutación dirigida en el aminoácido 89 intercambiando la Lys por arginina (Arg) o por alanina (Ala) mediante mutagénesis por PCR “overlapping” (de solapamiento) con los primers Fo: 5'- GTTCTCCCGGCCGGGGC-3' Re: 5'- CCTTCGGTTGATCCCGTCAGC-3'. Para amplificar el gen completo se utilizaron los mismos primers del Ag85B no mutante. Las mutaciones se confirmaron por secuenciación del producto de PCR. Los genes mutados se clonaron en el vector pET15b. Como ya se tenía clonado el gen de la proteína Ag85B en el mismo vector, se transformaron células competentes de *E. coli* BL21(DE3) con las 3 construcciones pET15b-Ag85B, pET15b-Ag85B<sup>arg89</sup> y pET15b-Ag85B<sup>ala89</sup>. Para obtener de manera soluble a las proteínas recombinantes y evitar la formación de cuerpos de inclusión que luego tienen que ser tratados bajo condiciones desnaturalizantes, la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes se realizó a una temperatura de 16°-18°C; para ello se realizó una curva de crecimiento de la bacteria con la construcción a 37°C y se determinó que el mejor tiempo para inducir era a las 5 hrs de crecimiento cuando todavía el crecimiento bacteriano está en fase logarítmica. En este tiempo, la temperatura se bajó a 16°C y la inducción de la expresión de la proteína se llevó a cabo con 100 µM de IPTG. Las bacterias fueron cosechadas a las 10 h



después de la inducción, lavadas con PBS y sonicadas en solución de lisis (PBS pH 7.4 con 1mM EDTA, 1mM benzamidina y 1mM aprotinina). El lisado bacteriano se centrifugó a 1,600  $\times g$ , se separó el sobrenadante del pellet y ambas fracciones se analizaron por SDS-PAGE al 12%. La purificación de las proteínas solubles se realizó en condiciones no desnaturalizantes (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mM NaCl, 10mM imidazol, pH 8) empleando una columna HisTrap Quelating (GE Healthcare). En el programa para la elución se adicionó un paso de 0 a 10 % del amortiguador de elución (50mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , 300mM NaCl, 500mM imidazol, pH 8) y luego un gradiente de 10 a 100 % del amortiguador de elución. Después de ser analizadas por SDS-PAGE, se juntaron aquellas fracciones que contenían a la proteína de interés; estas fracciones se dializaron contra el amortiguador 30 mM Tris pH 8 y se pasaron por una columna de intercambio aniónico HiTrap Q HP (GE Healthcare) como segundo paso de purificación, la elución se llevó a cabo mediante un gradiente de 0 a 100% del amortiguador 30 mM Tris pH 8, NaCl 1M. Las fracciones obtenidas se analizaron por SDS-PAGE y se juntaron aquellas de mayor pureza, se hicieron alícuotas y se almacenaron a  $-70^\circ\text{C}$  hasta su uso.

#### ***4.3.3. Determinación de las constantes de afinidad Plg-Ag85B por ELISA.***

Para la determinación de las constantes de unión a Plg, con las proteínas Ag85B y Ag85B<sup>arg89</sup>, se adsorbieron diferentes concentraciones de proteína (100  $\mu\text{l}$  de 0.1, 0.5, 1 o 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) a una placa de ELISA (Nunc Maxisorp). La concentración de proteína se determinó previamente por el método de Lowry modificado, aun así, para asegurar que la cantidad de proteína adsorbida en los pozos fuera igual para las 3 proteínas recombinantes, éstas se detectaron con anticuerpo anti-His peroxidasa diluido 1:3000 (Roche), o bien, con el suero hiperinmune anti-Ag85B diluido 1:1000 producido en este trabajo. La curva que se obtuvo con las diferentes concentraciones de proteína detectada con el suero hiperinmune nos permitió conocer la concentración de saturación para la adsorción de proteína en el pozo de la placa de ELISA. El ensayo de unión a Plg se realizó incubando las proteínas inmovilizadas con diferentes concentraciones de Plg (0-2  $\mu\text{M}$ ) comercial (Roche) o Plg purificado preparadas en PBS. La interacción con Plg se detectó como se describió anteriormente en los ensayos de ELISA para las proteínas recombinante. Los datos obtenidos se graficaron en función de la concentración de Plg. Los datos de concentración de proteína Ag85B adsorbida se convirtieron de  $\mu\text{g}/\text{ml}$  a



unidades de molaridad. Los datos de las lecturas de absorbancia a 492nm obtenidos para cada concentración de proteína adsorbida fueron convertidos a velocidades  $\Delta 492\text{nm}/\text{min}$  y posteriormente graficados. Se realizó un ajuste manual por el método de Lineweaver-Burk o de doble recíproco, y un ajuste no lineal a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten empleando el software KaleidaGraph 4.0. Se tomó el valor de  $K_m$  como el correspondiente a la  $K_d$ , la constante de afinidad. Como control se realizó una curva de unión a Plg con fibrinógeno y se compararon las constantes obtenidas.

#### ***4.3.4. Purificación de Plg a partir de plasma humano.***

Para hacer la determinación de las constantes de afinidad fue necesaria la purificación de Plg humano a partir de plasma humano. El plasma utilizado para ello fue una donación del Hospital de Cardiología del Centro Médico Nacional Siglo XXI IMSS. El plasma se descongeló y suplementó con inhibidores de proteasas y se centrifugó para separar el material insoluble. El sobrenadante se diluyó con agua estéril 1:1, se filtró con papel whatman y se preparó para hacer la purificación de Plg por cromatografía de afinidad, para lo cual se empleó una columna de Lys-sefaraosa (Amersham Biosciences) que se equilibró en el amortiguador 20 mM fosfato pH 7.4, 0.5 M NaCl y 10 KIU/ml de aprotinina. El sobrenadante del plasma filtrado se aplicó a la columna y posteriormente ésta se lavó toda la noche con el amortiguador A que contiene 50 mM fosfato pH 7.4, 80 mM NaCl y 10 KIU/ml de aprotinina. El Plg unido a la columna fue eluido con amortiguador B o de elución que es el amortiguador A suplementado con 100 mM de EACA. Se colectaron fracciones de 1.5 ml las cuales fueron analizadas por SDS-PAGE y por *Western Blot* empleando el anticuerpo policlonal antiPlg. Las fracciones que contenían el Plg se juntaron y se pasaron por una columna de filtración en gel (Sephadex G-25) para eliminarles el EACA. Las fracciones de esta última cromatografía se liofilizaron y resuspendieron en amortiguador 50 mM fosfatos pH 7.4 y se cuantificaron por el método de Lowry modificado.



#### ***4.4. Ensayos de Activación de Plg humano***

##### ***4.4.1. Ensayos de Activación de Plg humano unido a las proteínas recombinantes inmovilizadas.***

Las proteínas recombinantes y las proteínas del ES se inmovilizaron en una placa de ELISA (Nunc Maxisorp) adsorbiéndolas en amortiguador de carbonatos 100 mM pH 9.6 durante toda la noche a 37 °C. Se les incubó con 6 µg/ml de Plg humano (Roche) durante 2 h a 37 °C y después se lavó la placa 3 veces con PBS para eliminar el Plg no unido a las proteínas. A continuación se incubó cada pozo a 37 °C con 3 ng de tPA para activar el plg unido a las proteínas y se adicionó 0.25 mM de un sustrato cromogénico específico para Plm, Chromozym PL (Roche). Mediante la degradación del sustrato colorimétrico se determinó la actividad de Plm generada y unida a cada proteína recombinante, el color liberado por el sustrato fue medido a diferentes intervalos de tiempo a D.O.  $_{405\text{ nm}}$ . También se realizó la incubación con Plg en presencia del inhibidor EACA.

##### ***4.4.2. Ensayo de Activación de Plg por tPA en presencia de las proteínas de M. tuberculosis.***

Para los ensayos en solución se utilizaron placas de microtitulación (Thermolabsystems), se adicionaron: Plg 6 µg/ml, tPA 3 ng y Chromozym 0.25 mM. La actividad de Plm generada por la conversión del Plg por tPA se monitoreó a D.O.  $_{405\text{ nm}}$ . Este ensayo de activación de Plg por tPA se evaluó en presencia de las proteínas del ES de *M. tuberculosis* y de las proteínas recombinantes purificadas. La activación de Plg a Plm también se evaluó en ausencia o presencia de diferentes concentraciones del inhibidor EACA, desde 0.1 hasta 50 mM. Todo esto en un volumen final de 200 µl en amortiguador Tris 50 mM pH 7.4. Los valores de D.O. se normalizaron con respecto a la Plm generada por el tPA solo, obteniendo así las unidades relativas expresadas como el número de veces la actividad de Plm generada por tPA. Se compararon dos concentraciones de ES 2.5 µg y 5 µg de proteína por pozo.



# Capítulo 5

## Resultados

### *5.1. Identificación de proteínas de unión a Plg en M. tuberculosis.*

#### *5.1.1. Electroforesis Bidimensional y Ligand Blotting*

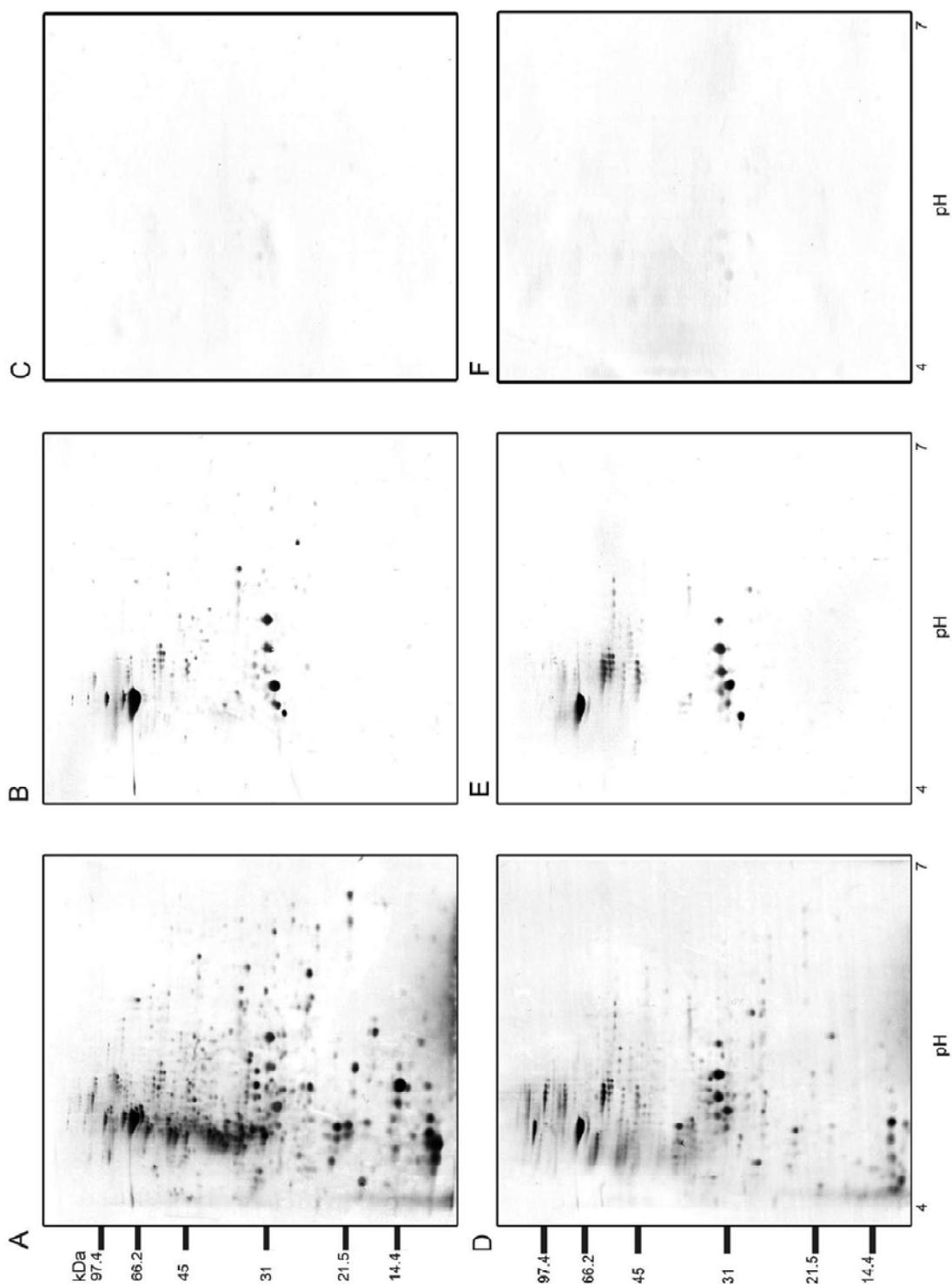
Como se describió en el trabajo de Monroy et.al. en el 2000, los estudios *in vitro* hicieron evidente la interacción del Plg humano con la bacteria completa y con las proteínas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, la identidad de dichas proteínas permaneció sin estudiarse debido a las limitantes de las técnicas de separación y resolución entonces disponibles. Actualmente, las herramientas de proteómica en combinación con el *ligand blotting* nos permiten identificar interacciones de proteínas mediante el uso de geles bidimensionales. Esta forma de identificación ya había sido utilizada previamente por Crowe y colaboradores en el 2003 para la identificación de proteínas de unión a Plg en *Candida albicans*. De manera similar, nosotros identificamos proteínas de unión a Plg empleando tres fracciones proteicas de *M. tuberculosis*: la fracción proteica soluble del lisado celular, denominada extracto soluble (ES); la fracción de las proteínas que son secretadas al medio de cultivo, denominada filtrado de cultivo (FC); y la fracción proteica insoluble que contiene a las proteínas de la pared celular (PC). Las proteínas de cada fracción se separaron mediante geles bidimensionales y se transfirieron a membranas de PVDF. Las membranas con el perfil proteico de doble dimensión (2D) se tiñeron con azul de Coomassie o bien se emplearon para *blots*, los cuales se incubaron



con Plg humano. Los resultados revelaron un gran número de puntos o manchas que potencialmente pueden ser PlgRs. En la Figura 5.1 A y D se muestran las proteínas de las fracciones ES y FC teñidas con azul de Coomassie. En la Figura 5.1 B y E se muestran aquellos puntos que reaccionaron con Plg. Se determinó que un punto era positivo a Plg si consistentemente aparecía en 3 blots reproducibles de cada fracción. La especificidad de la unión a Plg se demostró cuando las membranas 2D se incubaron con Plg en presencia del análogo de lisina EACA, como se observa en la Figura 5.1 C y F. En este ensayo la reactividad de la mayoría de los puntos desapareció y la de otros se redujo considerablemente dejando solamente un fondo producto del anticuerpo antiPlg. Esto confirmó lo que se había observado en el SDS-PAGE de una dimensión en el trabajo de Monroy et.al., en donde la interacción de las proteínas de *M. tuberculosis* con el Plg humano se inhibió con EACA, indicando la participación de los LBS de los dominios kringle del Plg en la interacción con la micobacteria.

Como se muestra en las figuras 5.2B y 5.2D, se identificaron 57 puntos que unieron Plg en la fracción ES, 22 en la fracción FC y alrededor de 50 en la fracción PC (Figura 5.3). Se encontró que algunas proteínas aparecieron en las 3 fracciones de manera consistente, a la altura de 66, 55 y 31 kDa, lo que también correspondió con las bandas observadas en el *ligand blot* del SDS-PAGE de una dimensión reportada en el 2000 (Monroy et.al., 2000).

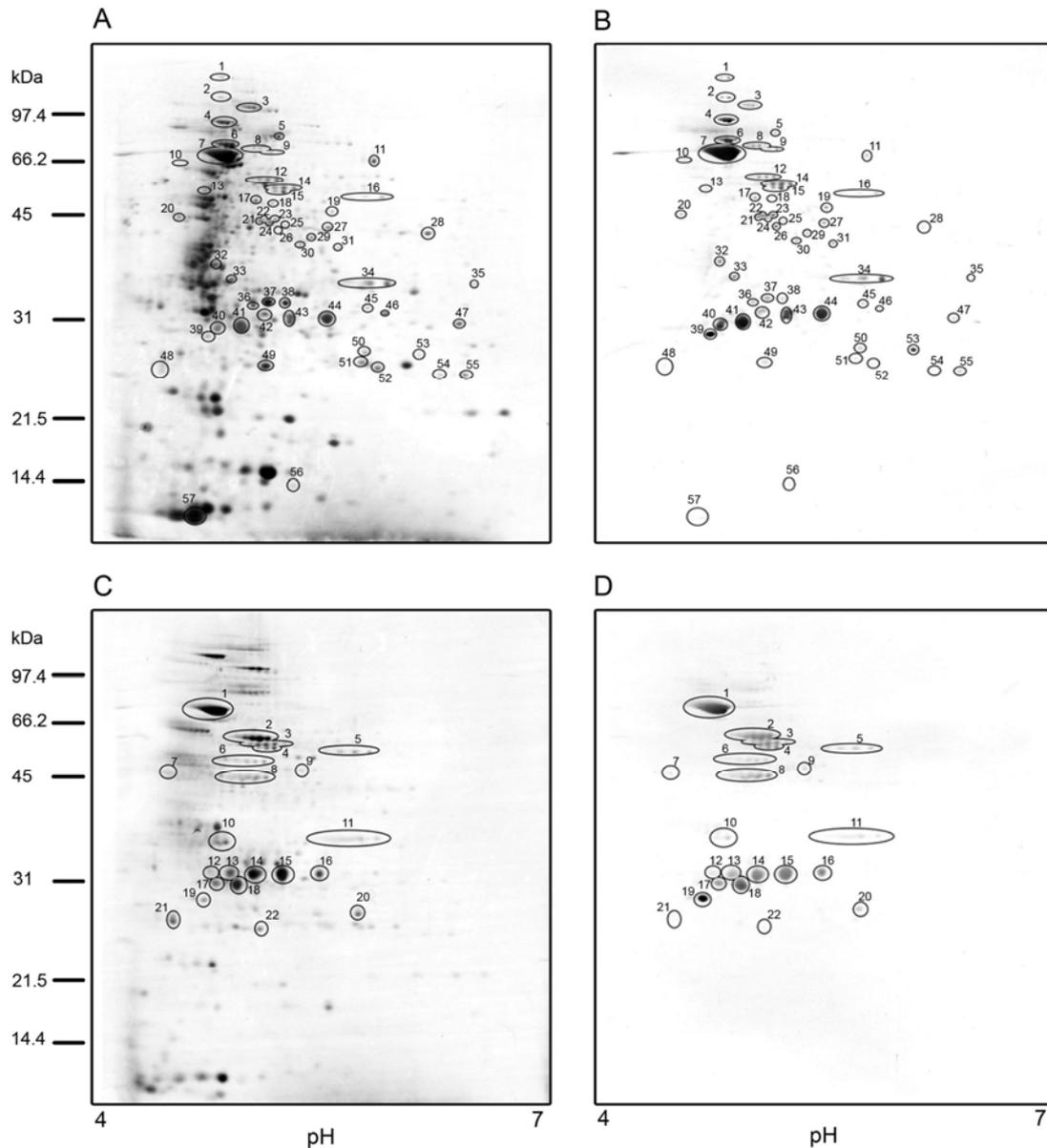




**Figura 5.1** Proteínas del ES y FC de *Mycobacterium tuberculosis* separadas por electroforesis de doble dimensión (2D SDS-PAGE) y transferidas a membranas PVDF. A y D. Membranas teñidas con azul de Coomassie. B y E. Membranas incubadas con Plg 1 $\mu$ g/ml, antiPlg 1:1000 y proteína A peroxidasa 1:2000. C y F. Membranas incubadas con Plg y 100 mM EACA. A, B y C corresponden a las proteínas el ES. D, E y F corresponden a las proteínas del FC.



Resulta evidente la abundancia de algunas proteínas como la mancha 7 en el ES o la mancha 1 en el FC cuya reactividad con Plg es clara. En la figura 5.2A se observan otros puntos o manchas que corresponden a proteínas abundantes, sin embargo no unen Plg, lo que demuestra también la especificidad de la interacción. Un ejemplo de ello es la mancha cercana al punto 56 en el ES.



**Figura 5.2 Identificación de los puntos que unen Plg.** A. y B. Membranas teñidas con azul de Coomassie. C. y D. Blots en los que se identifica a los puntos que reaccionaron con Plg. Los puntos identificados por MS o N-terminal se muestran encerrados en círculos enumerados para resaltar su correspondencia entre membranas. Se consideró a un punto como positivo sólo si éste apareció en 3 réplicas del blot. A y C proteínas del ES. B y D proteínas del FC.



De la fracción PC no se determinó la identidad de las proteínas que unieron Plg, sin embargo el perfil proteico de los puntos que reaccionaron con Plg es muy parecido al de ES y FC. El principal resultado en este ensayo fue haber obtenido una separación óptima de las proteínas a partir de una muestra insoluble como esta que puede incluir a proteínas de la pared celular.

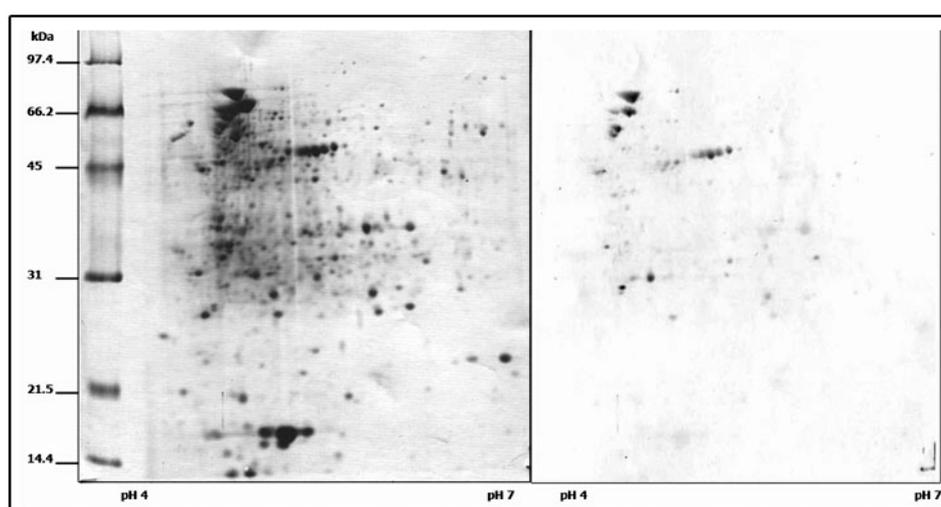


Figura 5.3 Proteínas de la fracción PC de *Mycobacterium tuberculosis* separadas por 2D SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF. A la izquierda se muestra la membrana teñida con azul de Coomassie. A la derecha el blot incubado con Plg. De esta fracción no se hizo identificación.

Los puntos de las fracciones ES y FC que reaccionaron con Plg se identificaron en geles paralelos teñidos con azul de Coomassie. A partir de ellos se cortaron los puntos y se determinó la identidad de las proteínas mediante degradación de Edman o secuencia del extremo N-terminal o mediante espectrometría de masas acoplada a cromatografía líquida (LC/MS/MS). De todos los puntos reconocidos, sólo se obtuvo claramente la identidad de 15 proteínas.

La identificación correspondiente a las proteínas de *M. tuberculosis* que unen Plg se presenta en la Tabla 2.

De las 15 proteínas identificadas, una sólo se reconoce por su capacidad inmunogénica, otra corresponde a una proteína que forma parte de la estructura del proteasoma; dos son chaperonas, proteínas de estrés calórico; y las 11 restantes corresponden a enzimas que participan en distintos procesos del metabolismo, lo que corresponde al 73% de las proteínas identificadas.



Tabla 2. Identificación de las proteínas de unión a Plg en *Mycobacterium tuberculosis*.

Número de spot <sup>a</sup>	Proteína Identificada	Gen en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv	Método de Identificación <sup>c</sup>	Secuencia N-terminal identificada <sup>d</sup>	Peso molecular teórico (kDa)	Punto Isoeléctrico pI teórico
ES: 7 FC: 1	<b>DnaK</b> (Proteína de choque térmico Hsp70)	<i>Rv0350</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> ARAVGIDLGTNSV <sup>15</sup>	66.8	4.6
ES: 12 FC: 2	<b>GlnA1</b> (Glutamina sintetasa A1)	<i>Rv2220</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> TEKTPDDVFK <sup>11</sup>	53.5	4.8
ES: 14 & 15 FC: 3 & 4	<b>SahH</b> (S-Adenosil-L-homocisteína hidrolasa)	<i>Rv3248c</i>	N-term, MS	<sup>11</sup> XLTPDVR <sup>17</sup>	54.3	4.8
ES: <u>16</u> <sup>b</sup> FC: 5	<b>Lpd</b> (Dihidrolipoamida deshidrogenasa)	<i>Rv0462</i>	MS		49.2	5.7
FC: 6	<b>Icl</b> (Isocitrato liasa)	<i>Rv0467</i>	MS		47.1	4.8
FC: 8	<b>EF-Tu</b> (Factor de elongación TU regulado por hierro)	<i>Rv0685</i>	MS		43.6	5.1
ES: 17	<b>MetK</b> (Metionina adenosiltransferasa)	<i>Rv1392</i>	N-term	<sup>2</sup> XEKGRFLTXXV <sup>13</sup>	43.0	4.7
ES: <u>34</u> <sup>b</sup> FC: 11	<b>Fba</b> (Fructuosa-bifosfato aldolasa)	<i>Rv0363c</i>	MS		36.5	5.6
ES: 40,41,42,43 & 44 FC: 13,14,15,16 & 18	<b>Ag85A, Ag85B y Ag85C</b> Complejo Antígeno 85 (Micolil transferasas, proteínas de unión a fibronectina,)	<i>Rv3804c</i> <i>Rv1886c</i> <i>Rv0129c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> FSRPLPVEY <sup>11</sup>	35.7 34.6 36.7	6.5 5.7 6.3
ES: 50 FC: 20	<b>Mpt51</b> (Proteína relacionada al complejo Antígeno 85, micolil transferasa, proteína de unión a fibronectina D)	<i>Rv3803c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> APYENLMVPS <sup>11</sup>	31.1	6.6
ES: 39 FC: <u>19</u> <sup>b</sup>	<b>PrcB</b> (Subunidad beta del proteasoma)	<i>Rv2110c</i>	N-term	<sup>58</sup> TTIVALKYPG <sup>67</sup>	30.3	4.4
ES: 48 FC: 21	<b>Mpt64</b> (Proteína inmunogénica)	<i>Rv1980c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> APKTYCEELK <sup>11</sup>	24.8	4.6
ES: 57	<b>GroES</b> (Chaperonina de 10 kDa, Hsp10)	<i>Rv3418c</i>	N-term	<sup>2</sup> AKVNIKPLED <sup>11</sup>	10.8	4.3

<sup>a</sup> Número correspondiente a los puntos mostrados en la figura 5.2, fracción ES o fracción FC.

<sup>b</sup> El número subrayado corresponde a un punto que no fue identificado por MS o N-term, pero se consideró ser la misma proteína identificada en otra fracción por correlación de su posición después del análisis de las imágenes entre fracciones.

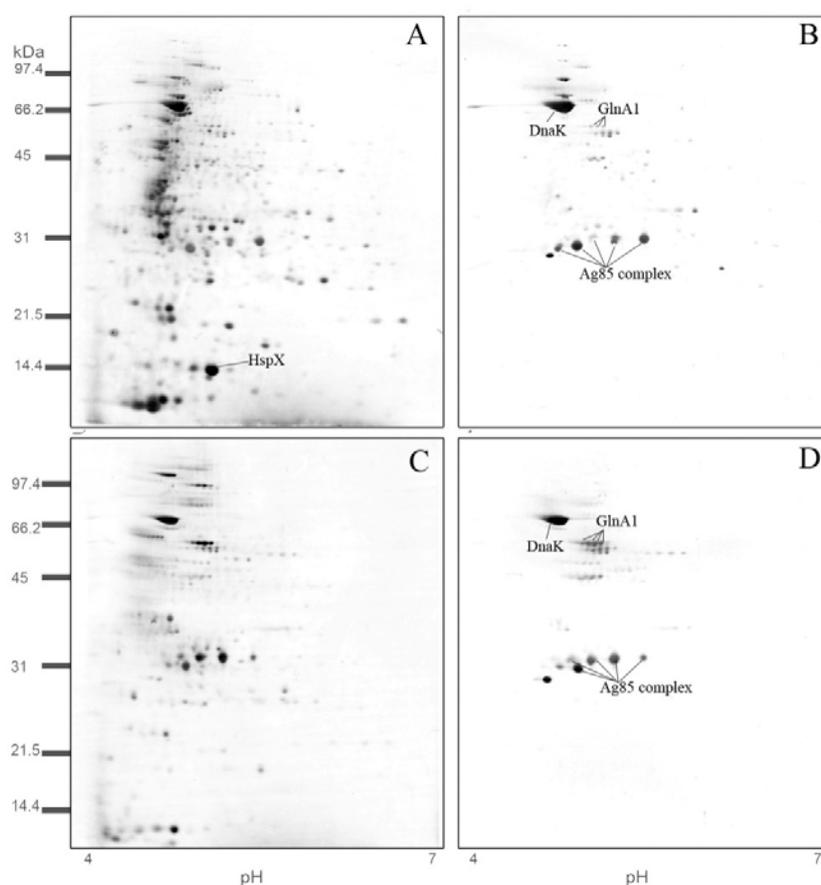
<sup>c</sup> Se designó como N-term, si la identificación se realizó por degradación de Edman. Se designó MS, si la identificación se realizó por análisis por espectrometría de masas.

<sup>d</sup> Los números que flanquean la secuencia corresponden a la posición de los aminoácidos en la secuencia completa de la proteína.



### 5.1.2. Obtención de las proteínas de *M. tuberculosis* recombinantes en *E. coli*.

Para demostrar el papel individual de algunas de estas proteínas en la interacción con Plg, se seleccionaron 3 de las 15 proteínas identificadas. Se tomaron como criterios de selección los siguientes aspectos: que las proteínas mostraran una reactividad muy fuerte con Plg; que estuvieran presentes en las fracciones ES y FC; y que hubieran reportes previos de que estas proteínas son secretadas o bien se localizan en la superficie de la micobacteria (Rosendkrands et.al., 2000 (a); Rosenkrands et.al., 2000 (b); Harth et.al., 1994). De acuerdo a lo anterior, las proteínas seleccionadas fueron: DnaK, GlnA1 y un miembro del complejo Ag85, el Ag85B, por ser el más abundante sobre Ag85A y Ag85C. Las proteínas seleccionadas se muestran en la Figura 5.4. Puede notarse la presencia de isoformas de la proteína GlnA1 a lo largo del mismo peso molecular. Se eligió también a una proteína que funcionara como control negativo, la HspX, que es una proteína abundante pero que no une Plg.

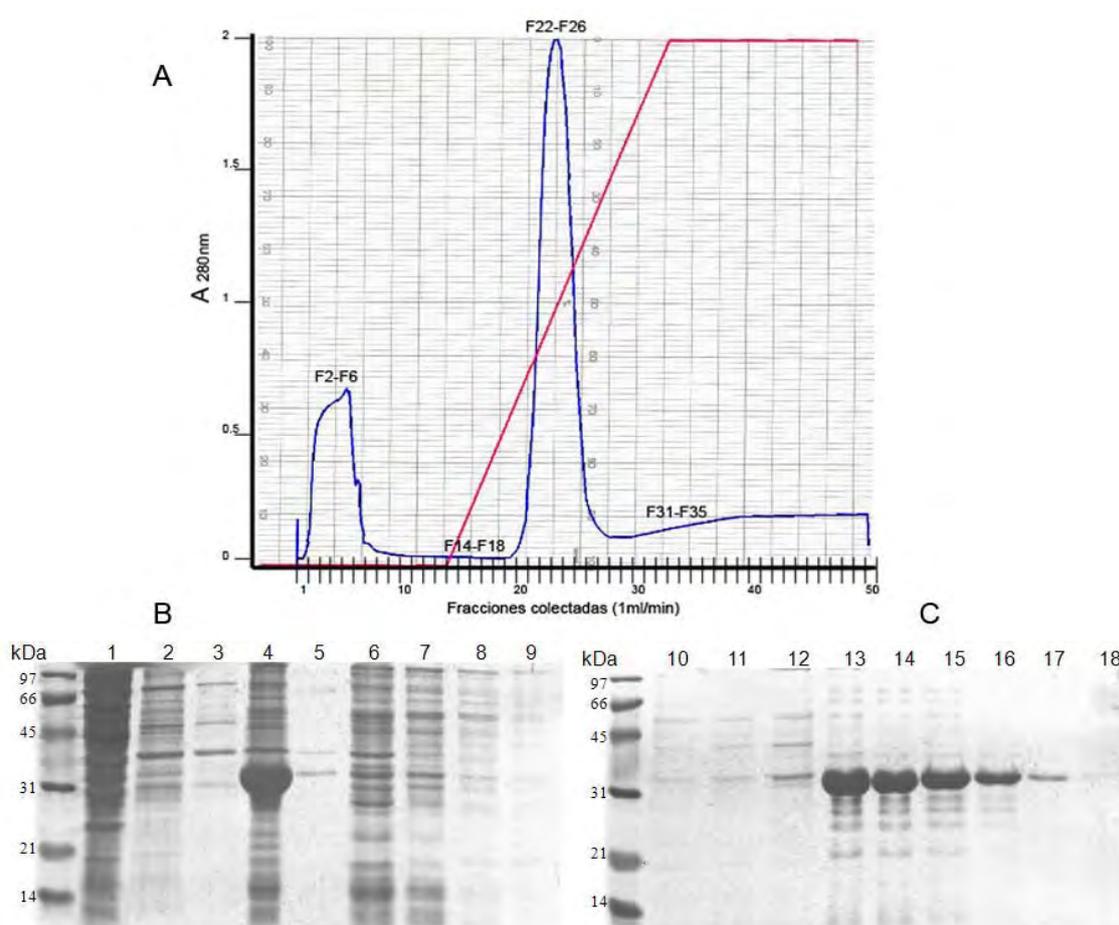


**Figura 5.4 Proteínas de unión a Plg.** Las proteínas que fueron seleccionadas para su caracterización en este estudio están presentes en las fracciones ES (A y B) y FC (C y D). HspX se seleccionó para usarse como un control negativo por ser una proteína abundante que no une Plg.



Para poder caracterizar la interacción de Plg con cada una de las proteínas seleccionadas, se utilizó como estrategia producirlas como proteínas recombinantes en *E. coli*.

Debido a que se cuenta con la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* (Cole et.al., 1998), fue posible amplificar los genes codificantes para las proteínas GlnA1 y Ag85B a partir del DNA genómico de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv, éstos se clonaron en un vector de expresión procarionte para sobreexpresar las proteínas en *E. coli*. La construcción se diseñó adicionando un tallo de histidinas para facilitar la purificación de la proteína mediante cromatografía de afinidad a níquel, la cual se realizó en condiciones desnaturalizantes ya que la sobreexpresión generó la inducción de cuerpos de inclusión.



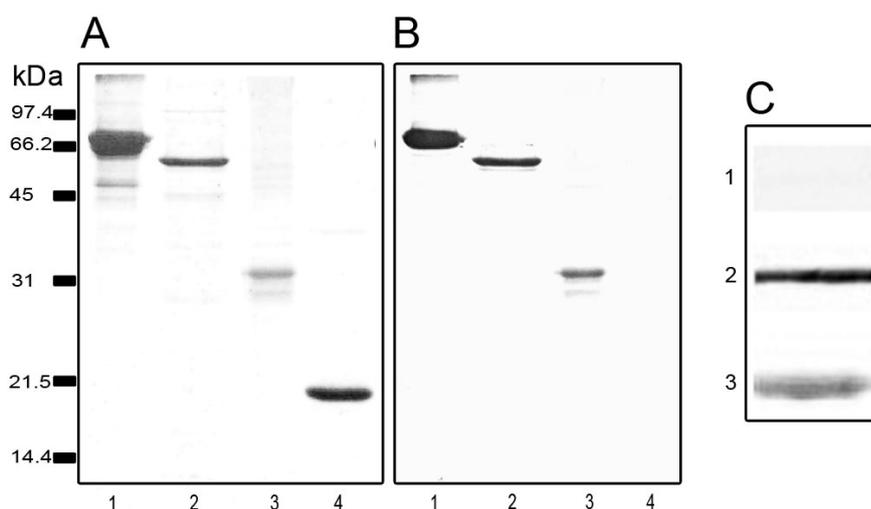
**Figura 5.5 Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína Ag85B de *M. tuberculosis* recombinante en *E. coli*.** A. Cromatograma de la purificación de Ag85B al pasar el extracto soluble (ES) de *E. coli* por una columna de níquel, la proteína se eluyó con un gradiente de imidazol (línea roja: gradiente de 0 a 100% del amortiguador de elución); se indican las fracciones (F) colectadas y enumeradas de acuerdo al gráfico de densidad óptica de proteína (línea azul). B. y C. Análisis por SDS-PAGE al 12% de las fracciones obtenidas en la cromatografía de afinidad; 1) Proteínas del ES de *E. coli*. 2) 1er lavado de los cuerpos de inclusión (CI). 3) 2º lavado de los CI. 4) CI lavados y solubilizados. 5) fracción 1 ó F1 de la cromatografía. 6) F2-F6. 7) F7-F9. 8) F10-F13. 9) F14-F18. 10) F19. 11) F20. 12) F21. 13) F22-F26. 14) F27. 15) F28. 16) F29. 17) F30. 18) F31-35.



En la Figura 5.5 se muestra el cromatograma y las fracciones obtenidas durante la purificación de la proteína Ag85B. En la figura 5.5B se observa en el carril 4 del gel la sobreexpresión de la proteína a la altura de 31 kDa. La proteína tuvo que ser renaturalizada al final de la cromatografía mediante diálisis. Se siguieron los mismos pasos para la expresión y purificación de la proteína GlnA1 (no mostrado). Las proteínas DnaK y HspX recombinantes se obtuvieron por donación.

### 5.1.3. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano, fibronectina y laminina por Ligand Blotting.

Con las proteínas recombinantes purificadas se evaluó la capacidad de éstas para unir Plg humano, fibronectina (Fn), y laminina (no mostrado). Las proteínas DnaK, GlnA1 y Ag85B fueron resueltas por SDS-PAGE y transferidas a membranas PVDF. La interacción con Plg, Fn y laminina se evaluó por *ligand blotting*. Los resultados confirmaron la capacidad de estas proteínas para unirse a Plg como se muestra en la Figura 5.6B. La proteína HspX, conocida como alfa cristalina, la cual también se produjo de manera recombinante en *E. coli* y se purificó por afinidad a níquel, no unió Plg a pesar de que contiene numerosas lisinas a lo largo de su secuencia. El blot también se realizó en presencia de EACA y no mostró unión a Plg (datos no mostrados).



**Figura 5.6 Ligand Blot con las proteínas recombinantes.** Aproximadamente 2  $\mu$ g de cada proteína purificada fueron resueltos por SDS-PAGE al 12 %. A. Membrana teñida con azul de Coomassie. B. Membrana incubada con Plg, revelada con antiPlg y Proteína A peroxidasa. C. Membrana incubada con Fn, revelada con antiFn y Proteína A peroxidasa. 1. DnaK, 2. GlnA1, 3. Ag85B, 4. HspX se incluyó como control negativo, la proteína fue producida en condiciones similares a las otras recombinantes.

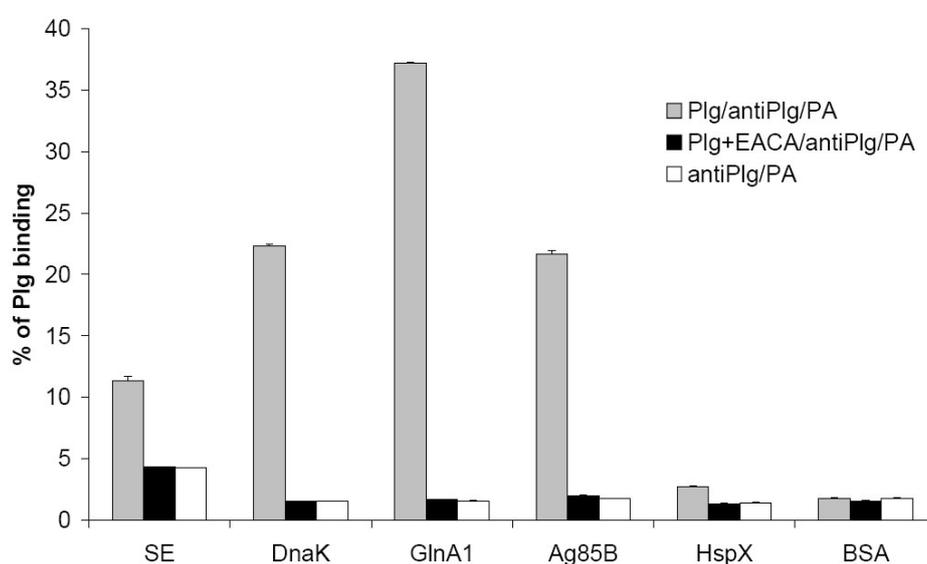


Al evaluar la interacción con Fn (Figura 5.6C), la proteína DnaK mostró una capacidad casi nula para interactuar con Fn. Sin embargo, en el caso del Ag85B, se pudo confirmar la interacción con esta proteína de MEC reportada previamente (Abou-Zeid et.al., 1988). Interesantemente, la proteína GlnA1 mostró una gran reactividad con Fn lo cual no se había descrito con anterioridad.

En el blot con laminina sólo GlnA1 mostró una ligera reactividad (no mostrado).

#### ***5.1.4. Unión de las proteínas recombinantes purificadas a Plg humano por ELISA.***

Las proteínas del ES o las proteínas recombinantes fueron adsorbidas a placas de ELISA y evaluadas cuantitativamente en su unión a Plg. Al igual que el ES, las 3 proteínas recombinantes unieron Plg en contraste con las proteínas control HspX o BSA. En comparación con fibrinógeno, DnaK y Ag85B unen aproximadamente 23% del Plg que une fibrinógeno, mientras que GlnA1 une alrededor del 35% del Plg que une fibrinógeno. En presencia de EACA la unión se ve completamente inhibida permaneciendo sólo el fondo que produce el anticuerpo (Figura 5.7).

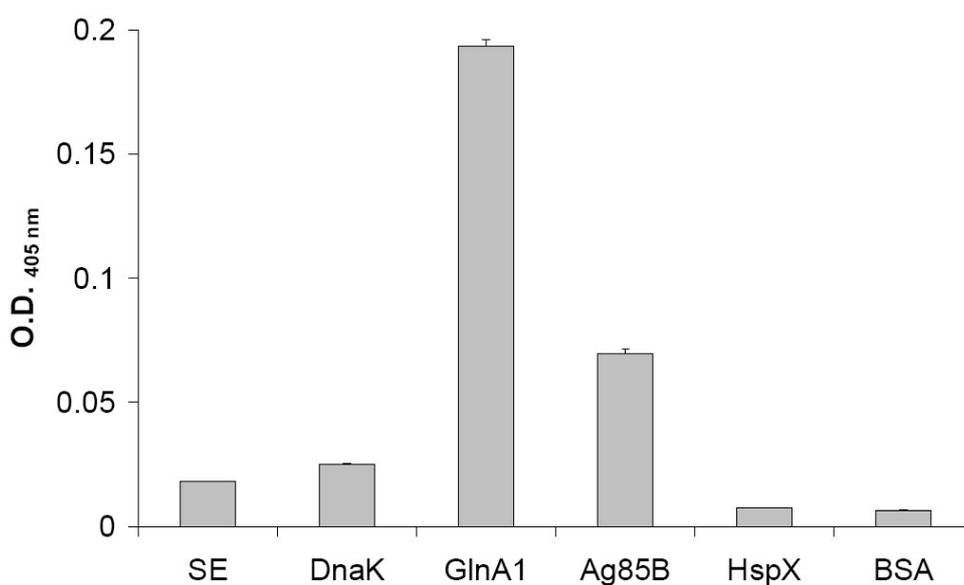


**Figura 5.7 Unión de las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis* a Plg.** 5 µg de proteínas del ES o 1 µg de cada proteína recombinante fueron adsorbidos a placas de ELISA. Las proteínas inmovilizadas fueron incubadas con 1 µg/ml de Plg en ausencia y presencia de 100 mM de EACA. La interacción fue detectada con el anticuerpo antiPlg y Proteína A peroxidasa. El porcentaje de unión se determinó con base en la D.O.<sub>492nm</sub> obtenida para la unión de Plg con 1 µg de fibrinógeno adsorbido al pozo.



### 5.1.5. Activación por tPA del Plg unido a las proteínas de *M. tuberculosis* inmovilizadas.

Para determinar si el Plg unido a las proteínas es activable a Plm, se diseñó un ensayo en el que las proteínas se adsorbieron a una placa de ELISA. Después de bloquear, las proteínas se incubaron con Plg para permitir su unión y el Plg no unido se eliminó con lavados exhaustivos. De esta manera sólo se activo a Plm el Plg unido empleando el activador fisiológico tPA. Los resultados en la Figura 5.8 mostraron que el Plg unido a las proteínas recombinantes conserva su capacidad para ser activado a Plm, por lo que la interacción no interfiere en la activación. Los controles negativos no unieron Plg por lo tanto no tienen actividad de Plm asociada.

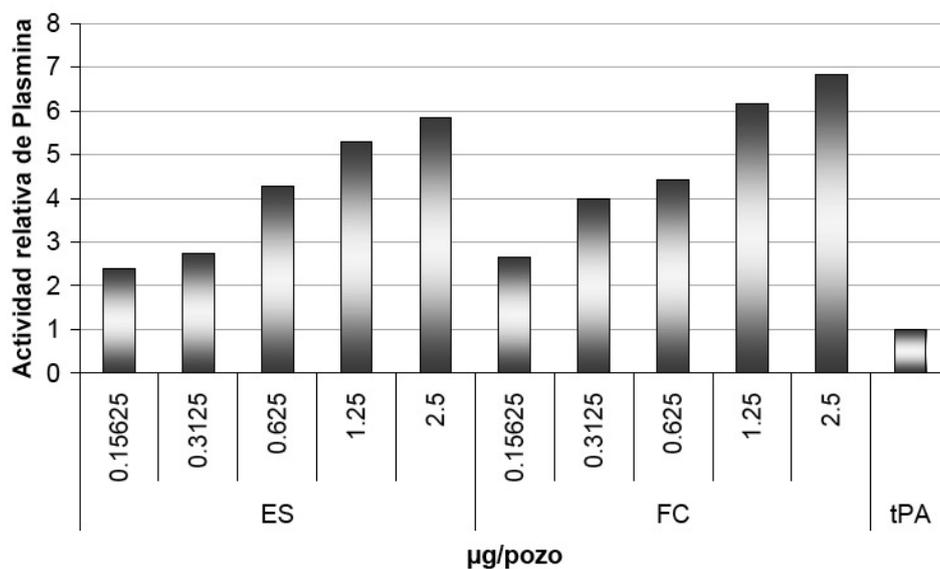


**Figura 5.8 Activación del Plg unido a las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*.** Las proteínas recombinantes fueron adsorbidas en placas de ELISA e incubadas con Plg humano, éste fue eliminado lavando los pozos y a continuación se incubó con el activador de Plg tPA para convertir el Plg unido a Plm. La actividad de Plm se monitoreó después de 18 horas mediante el color emitido por un sustrato cromogénico específico para Plm.



### 5.1.6. Activación de Plg por tPA en presencia de las proteínas de *M. tuberculosis*, ensayo en solución.

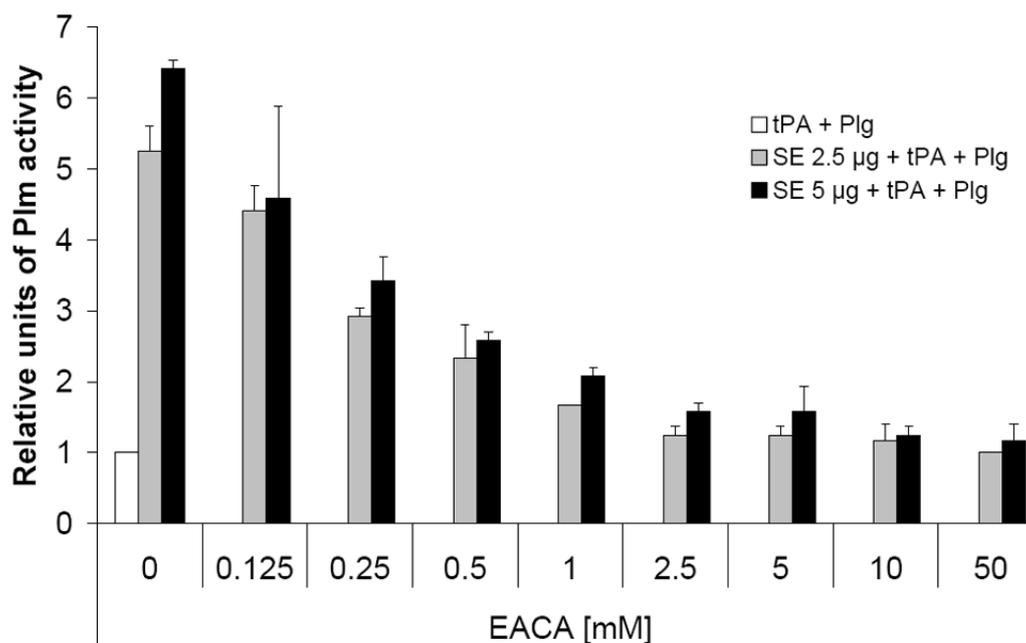
Durante la fibrinólisis, la activación de Plg a Plm es mediada y potenciada por tPA cuando ambos Plg y tPA se unen a fibrina. En algunos ensayos de activación de Plg en solución se ha demostrado que la activación de Plg catalizada por tPA se incrementa en presencia de elementos bacterianos como el flagelo de *E. coli* (Lähteenmäki et.al., 1993). Para evaluar el papel de las proteínas de *M. tuberculosis* en la activación de Plg a Plm, se activó en solución Plg humano por tPA en presencia de las proteínas del ES y del FC (Figura 5.9). Se encontró que las proteínas de las dos fracciones proteicas ES y FC de la micobacteria aumentan casi 6 o 7 veces la activación de Plg a Plm mediada por tPA, mostrando un efecto cofactor en la activación. Como se observa en la Figura 5.9 la actividad de Plm generada es dependiente de la concentración de proteína de ES o de FC presente en solución. Este efecto es abatido cuando se añade la presencia del análogo de lisina EACA demostrando la participación de los LBS en la activación (Figura 5.10).



**Figura 5.9 Activación del Plg mediada por tPA en presencia de las proteínas de *M. tuberculosis*.** El Plg humano fue convertido a Plm con tPA en presencia de diferentes concentraciones de ES o FC (0.15 a 2.5 µg de proteína por pozo), la actividad de Plm fue medida mediante la degradación de un sustrato cromogénico y leída a los 30 min a  $A_{405\text{ nm}}$ . La actividad obtenida fue normalizada con respecto a la actividad que genera tPA sin la presencia de proteínas micobacterianas.



El EACA compite por los LBS del Plg e impide que éste se una a las proteínas recombinantes. La potenciación de la activación disminuyó hasta el valor de Plm generado sólo por el tPA con la presencia de 50 mM de EACA, lo que indica que la interacción mediada por los LBS es importante para favorecer la activación de Plg mediada por tPA.



**Figura 5.10 Inhibición de la activación del Plg mediada por tPA en presencia de las proteínas de *M. tuberculosis*.** El Plg humano fue convertido a Plm con tPA en presencia de 2.5 y 5µg de ES. El ensayo de activación de Plg en solución se realizó en presencia de diferentes concentraciones de EACA (0.125-50 mM), el efecto de aumento de la activación de Plg mediada por tPA por las proteínas micobacterianas fue inhibido hasta obtener solo la actividad de Plm correspondiente a la generada por el tPA solo. La actividad de Plm fue evaluada mediante la degradación de un sustrato cromogénico y leída a  $A_{405nm}$ .

Con cada una de las 3 proteínas DnaK, GlnA1 y Ag85B recombinantes, se realizaron también ensayos de activación de Plg en solución. Sin embargo no se encontró que la presencia de las proteínas recombinantes potenciara la activación de Plg mediada por tPA.



## ***5.2. Caracterización de la interacción de Plg con la proteína Ag85B.***

### ***5.2.1. Identificación del sitio de unión a Plg, papel de las Lys internas.***

Con el conocimiento de que los LBS del Plg están participando en la interacción, se esperaba que el sitio blanco de unión a Plg en las proteínas micobacterianas incluyera lisinas (Lys). En la fibrinólisis, las Lys C-terminal de la fibrina potencian la activación del Plg a Plm mediada por tPA, y en algunos PlgRs bacterianos se ha logrado identificar a la o las Lys que participan en la interacción como en la  $\alpha$ -enolasa en el grupo A de estreptococos (Bergmann et.al., 2003). En esta proteína inicialmente se describió que la Lys del extremo C-terminal era la que mediaba la interacción con Plg y más tarde se demostró que otras dos Lys internas también desempeñaban un papel importante en la unión del zimógeno (Derbise et.al., 2004).

Al analizar las secuencias de las proteínas identificadas en la Tabla 2, se encontró que algunas de las proteínas presentan una Lys C-terminal, DnaK, EF-Tu, PrcB y GroES. De acuerdo a los resultados mostrados con las proteínas recombinantes en los que se confirma la interacción de las proteínas de *M. tuberculosis* con Plg, en la proteína DnaK es posible que la Lys C-terminal se encuentre involucrada en la interacción con Plg, sin embargo, la proteína GlnA1 y las proteínas del complejo Ag85 no presentan Lys C-terminal, por lo que se sugirió que algunas Lys internas estarían mediando la interacción.

Con la finalidad de identificar la región de unión a Plg al menos en una de las proteínas evaluadas, se aprovecharon las herramientas de bioinformática, estructura cristalográfica y modelaje molecular para determinar a la Lys o las Lys que potencialmente estarían involucradas en la interacción con los LBS del Plg. Para identificar a estas Lys en las proteínas micobacterianas, se tomó la información de la estructura homodimérica del kringle 2 (K2) del tPA. En este dímero queda de manifiesto la interacción del LBS del K2 del tPA con una Lys interna de un dominio K2 vecino, el grupo carbonilo de la Lys se encuentra expuesto al LBS por encontrarse este residuo de aminoácido siendo parte de un asa en la estructura del dominio. Los datos de la posición de la Lys con respecto al resto de la molécula, se tomaron como modelo para buscar Lys con características similares en las proteínas de *M. tuberculosis*. Con esta información se analizó en las proteínas del complejo Ag85: Ag85A, Ag85B y Ag85C a cada Lys



presente en la molécula y que probablemente mediaría la unión con Plg. Los resultados correspondientes a cada Lys de cada una de las proteínas se resumen en la Tabla 3.

**Tabla 3. Valores teóricos del análisis de cada Lys en la estructura de las proteínas del complejo Ag85.**

<b>Ag85A</b>							
<b>PDB ID:1SFR</b>	<b>NUM</b>	<b>All ABS</b>	<b>All REL</b>	<b>Side ABS</b>	<b>Side REL</b>	<b>MC ABS</b>	<b>MC REL</b>
K	23	48.620	24.200	44.950	27.500	3.670	9.800
K	89	182.060	90.700	151.260	92.600	30.800	82.100
K	96	57.300	28.500	57.300	35.100	0.000	0.000
K	116	59.710	29.700	58.840	36.000	0.870	2.300
K	175	113.800	56.700	113.500	69.500	0.310	0.800
K	183	140.120	69.800	120.910	74.000	19.210	51.200
K	199	89.940	44.800	89.940	55.100	0.000	0.000
K	215	123.050	61.300	123.050	75.300	0.000	0.000
K	227	64.510	32.100	61.320	37.600	3.190	8.500
K	239	86.880	43.300	84.180	51.600	2.700	7.200
K	275	53.300	26.500	53.300	32.600	0.000	0.000

<b>Ag85B</b>							
<b>PDB ID:1F0P</b>	<b>NUM</b>	<b>All ABS</b>	<b>All REL</b>	<b>Side ABS</b>	<b>Side REL</b>	<b>MC ABS</b>	<b>MC REL</b>
K	23	55.130	27.500	53.040	32.500	2.090	5.600
K	89	175.800	87.500	144.780	88.700	31.020	82.700
K	96	68.390	34.100	68.390	41.900	0.000	0.000
K	116	67.780	33.800	67.090	41.100	0.690	1.800
K	175	103.390	51.500	103.390	63.300	0.000	0.000
K	199	87.770	43.700	86.920	53.200	0.840	2.200
K	239	126.380	62.900	124.020	75.900	2.350	6.300
K	275	67.970	33.800	67.970	41.600	0.000	0.000

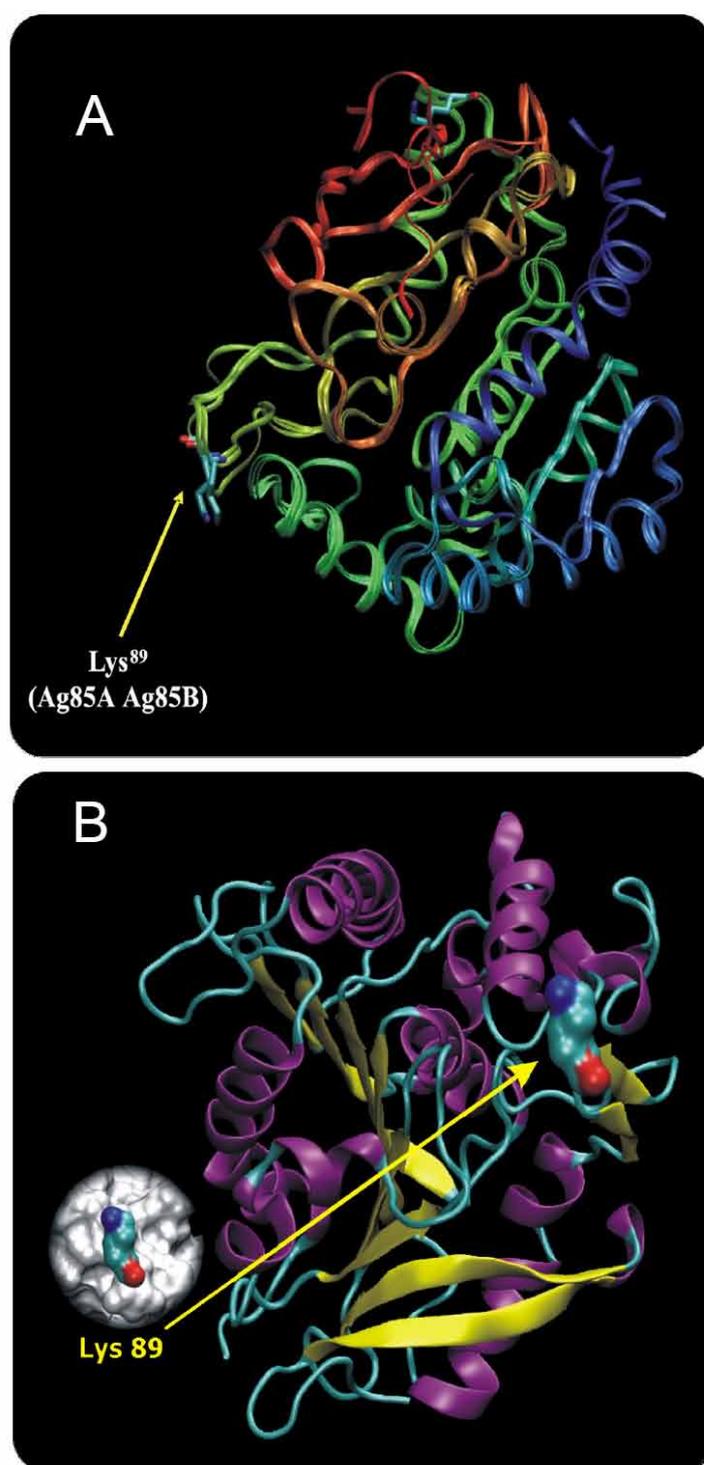
<b>Ag85C</b>							
<b>PDB ID:1DQZ</b>	<b>NUM</b>	<b>All ABS</b>	<b>All REL</b>	<b>Side ABS</b>	<b>Side REL</b>	<b>MC ABS</b>	<b>MC REL</b>
K	23	53.810	26.800	50.470	30.900	3.340	8.900
K	94	54.590	27.200	54.590	33.400	0.000	0.000
K	111	77.780	38.700	46.670	28.600	31.110	82.900
K	187	126.200	62.800	125.890	77.100	0.310	0.800
K	225	70.790	35.300	66.740	40.900	4.040	10.800
K	273	50.380	25.100	50.380	30.900	0.000	0.000



A partir de este análisis, se encontró que de las 11 y 8 Lys presentes en las moléculas de Ag85 A y B, respectivamente, la Lys de la posición 89 se encuentra en un asa y muestra casi un 90% de exposición en la superficie (Figura 5.11), lo que la hace un candidato de unión para los LBS tanto del Plg como del tPA. En Ag85C, no hay Lys en la posición 89, la Lys de la posición 111 es la que podría tener alguna interacción con LBS dado los datos teóricos (Tabla 3, columna MC REL).

De acuerdo con lo anterior, se determinó modelar *in silico* las interacciones entre un kringle del Plg y mutantes de la proteína Ag85B, sustituyendo a la Lys de la posición 89 por arginina (Arg89), un aminoácido que mantendría la carga positiva en el sitio de unión, o bien, para eliminar el efecto de carga, sustituirla por alanina (Ala89).

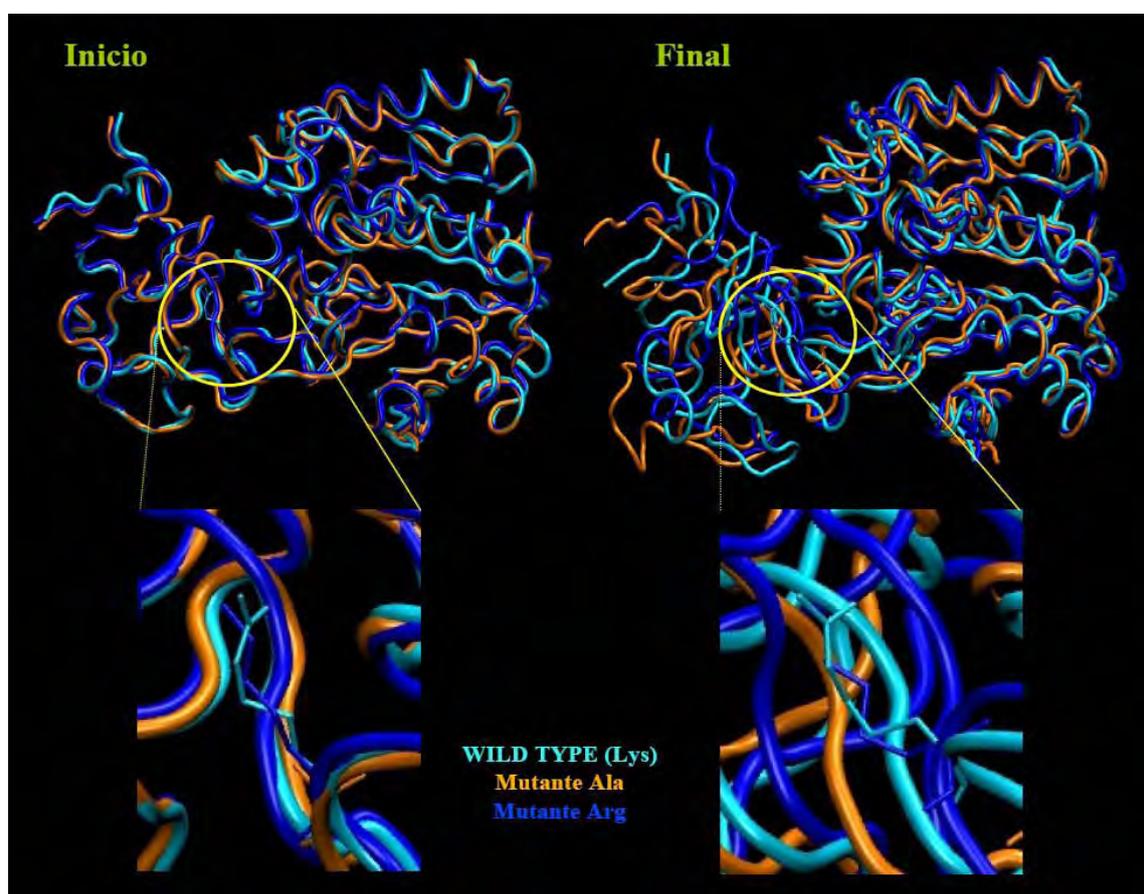




**Figura 5.11 Representación esquemática de las estructuras de las proteínas miembros del complejo Ag85.** A. Alineamiento estructural de las proteínas Ag85A, Ag85B y Ag85C, el listón que representa la cadena principal de las proteínas se encuentra coloreado de acuerdo a la posición en un gradiente rojo-verde-azul, estructuras sobrelapadas. La Lys89 sólo se encuentra en Ag85A y Ag85B. B. La Lys89, la cual fue propuesta como sitio de unión al plg de acuerdo a nuestros análisis teóricos, se muestra a manera de superficie accesible al solvente. El círculo en la parte inferior izquierda muestra la accesibilidad de la Lys89 en relación a la superficie de los residuos vecinos.

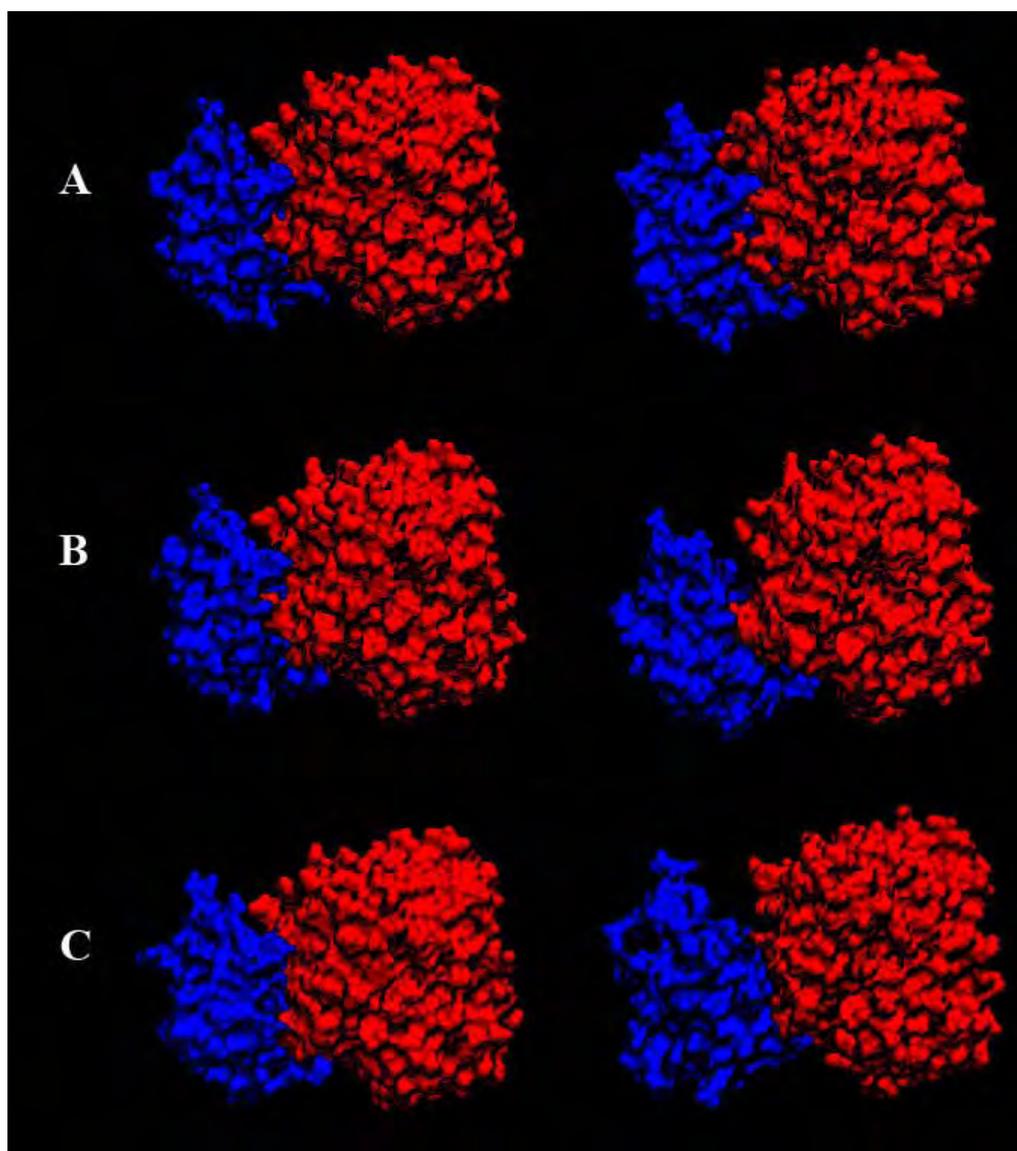
### 5.2.2. Modelaje de la Interacción Ag85B y Plg

La interacción de la proteína nativa o proteínas mutadas con Plg fue modelada mediante ensayos de docking y dinámica molecular. El ensayo de docking se llevó a cabo entre la proteína Ag85B o sus variantes mutadas (Ag85B<sup>Arg89</sup>, Ag85B<sup>Ala89</sup>) y el dominio kringle 1 (K1) del Plg. Esto se muestra en la Figura 5.12, al inicio del ensayo las estructuras se encuentran alineadas en un mismo plano, durante el docking, la estructura del K1 se acopla manualmente a la estructura del Ag85B manteniendo fija la estructura de este último. Cuando el aminoácido de la posición 89 se cambia, el acoplamiento de la estructura del K1 también cambia. En la Figura 5.12 se observa que al final del ensayo, si se mantiene la estructura del Ag85B en el mismo plano, el K1 cambia su posición con respecto al plano original.



**Figura 5.12** Modelo de la interacción del Kringle 1 del Plg con Ag85B y sus variantes mutadas. La estructura del K1 del Plg fue acoplada por docking molecular a las estructuras del Ag85B y de sus variantes mutadas Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup>. Las estructuras de cada interacción se muestran sobrelapadas, al inicio se encuentran alineadas y al final del ensayo la estructura del K1 se mueve notablemente de su posición. En verde agua se muestra la interacción con Ag85B (proteína nativa); en azul y en naranja se muestran las interacciones con Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup> respectivamente. El círculo amarillo señala el sitio de la mutación.

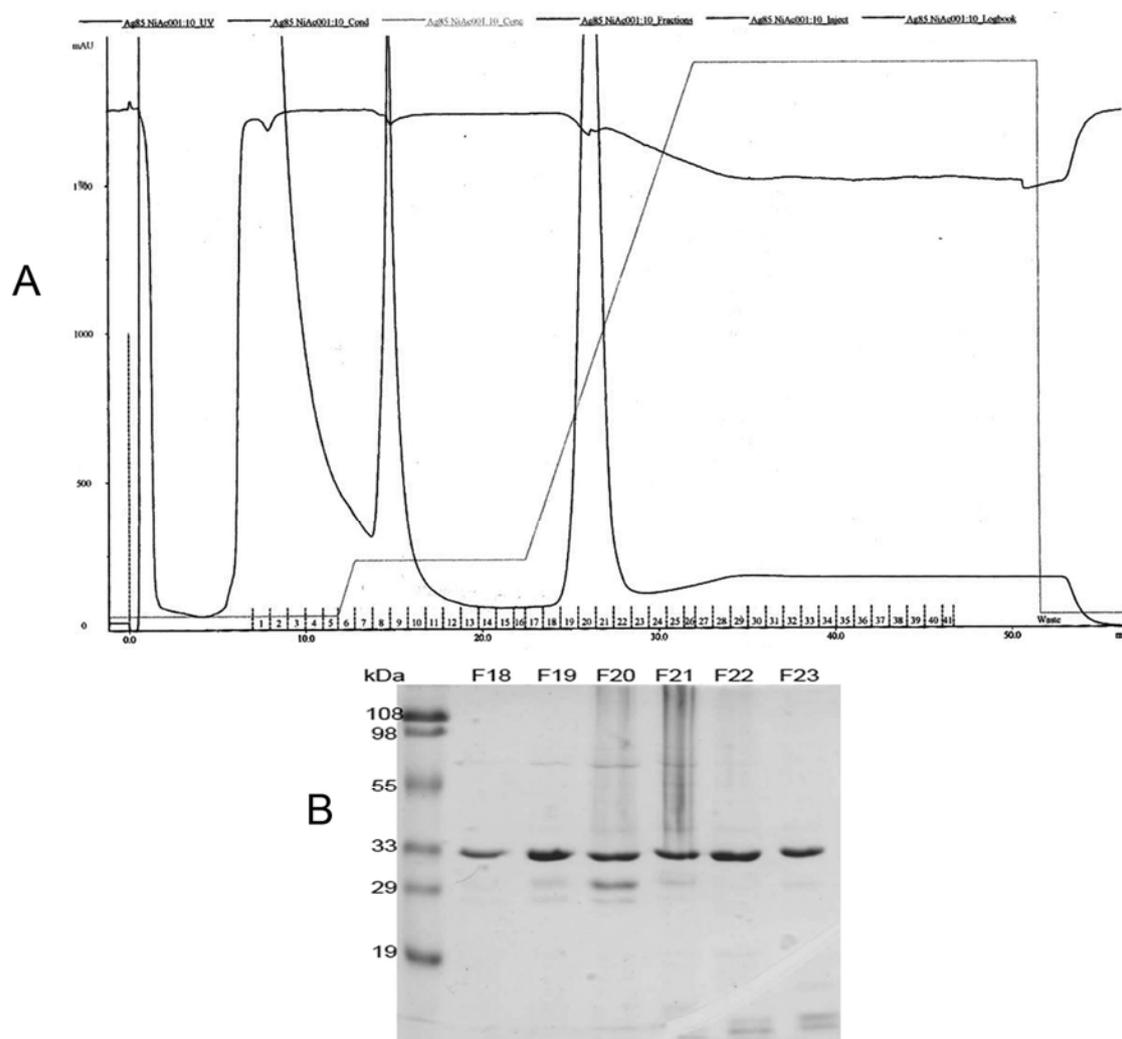
El análisis por dinámica molecular, demostró la importancia de un solo aminoácido en la interacción de Ag85B y Plg. Al final de la dinámica molecular, la interfaz entre Ag85B silvestre y Plg se mantiene estable mientras que la interacción con Ag85B<sup>arg89</sup> disminuye a pesar de que la carga positiva se mantiene. En la interfaz con Ag85B<sup>ala89</sup> se hace más evidente la separación entre las moléculas (Figura 5.13). Con este análisis se predijo que la interacción con las proteínas mutantes no tendrían la misma afinidad a Plg que la proteína silvestre.



**Figura 5.13 Dinámica molecular de la interacción entre el K1 del Plg y Ag85B o las proteínas mutadas.** Del lado izquierdo se muestra la interacción inicial con cada proteína antes de iniciar la dinámica molecular. La columna de la derecha muestra la interacción al final de la dinámica molecular. El K1 del Plg resalta en color azul mientras que en rojo se muestra el Ag85B (A) o las mutantes Ag85Barg89 (B) y Ag85Bala89 (C).

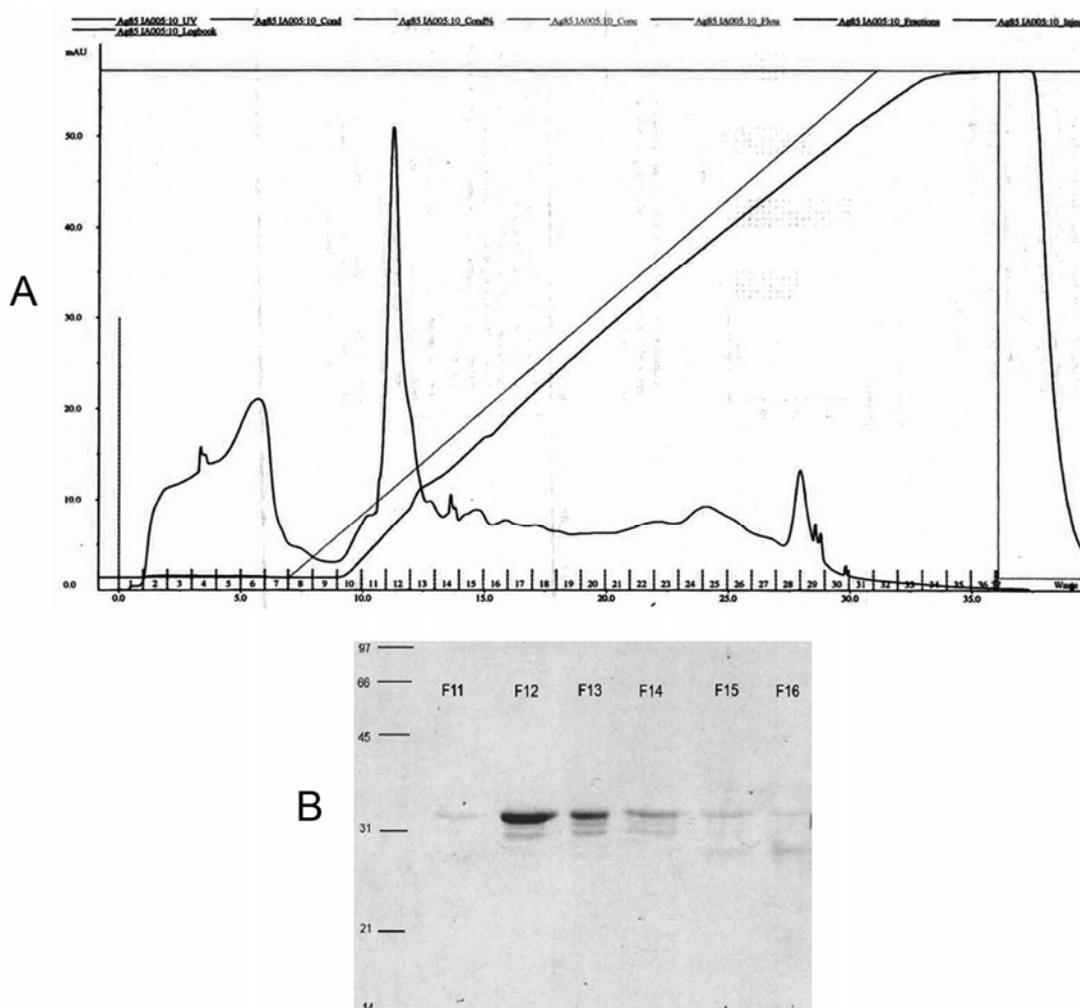
### 5.2.3. Mutagénesis, clonación, expresión y purificación de *Ag85B*, *Ag85B<sup>arg89</sup>* y *Ag85B<sup>ala89</sup>*.

Para demostrar que esta Lys de la posición 89 tiene un papel importante en la unión a Plg y confirmar lo predicho por docking molecular y la dinámica molecular, se intercambió la Lys 89 por Arg o por Ala mediante mutagénesis por PCR de solapamiento. Los genes amplificados y mutados se clonaron en un vector de expresión procarionte tal como se realizó para la obtención de las proteínas recombinantes previamente evaluadas.



**Figura 5.14 Purificación de la proteína recombinante Ag85B por cromatografía de afinidad a níquel. A.** Cromatograma de la purificación de la proteína Ag85B recombinante. El sobrenadante del lisado bacteriano se aplicó a una columna de níquel, la proteína se eluyó con imidazol y se colectaron fracciones de 1 ml. El eje Y muestra la detección de proteína con luz UV en miliunidades de absorbancia (mAU). El eje X muestra el volumen que pasa por la columna (ml). **B.** Análisis por SDS-PAGE al 12 % de las fracciones que corresponden al pico de la proteína eluida. El gel se tiñó con azul de Coomassie.

A diferencia de lo que se hizo en la producción de las proteínas anteriores, las proteínas recombinantes de Ag85B silvestre y mutadas se indujeron y expresaron de manera soluble en *E. coli* y se obtuvieron con mayor pureza por cromatografía de afinidad a níquel y cromatografía de intercambio iónico como paso adicional en la purificación. En las Figuras 5.14 y 5.15 se muestran solamente las cromatografías de la purificación de Ag85B pero el mismo procedimiento se aplicó para la obtención de Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup>.



**Figura 5.15 Cromatografía de intercambio iónico.** **A.** Las fracciones colectadas en la cromatografía de afinidad se dializaron y se pasaron por una columna de intercambio aniónico (matriz Q). Las fracciones se eluyeron con un gradiente de NaCl. El eje Y muestra la detección de proteína con luz UV en miliunidades de absorbancia (mAU). **B.** El pico más grande que se observa en el gradiente de elución corresponde a la proteína de interés. Se colectaron y juntaron las fracciones 12 y 13 por tener la máxima pureza como se muestra en el gel. La purificación se llevó a cabo en un equipo Akta FPLC.

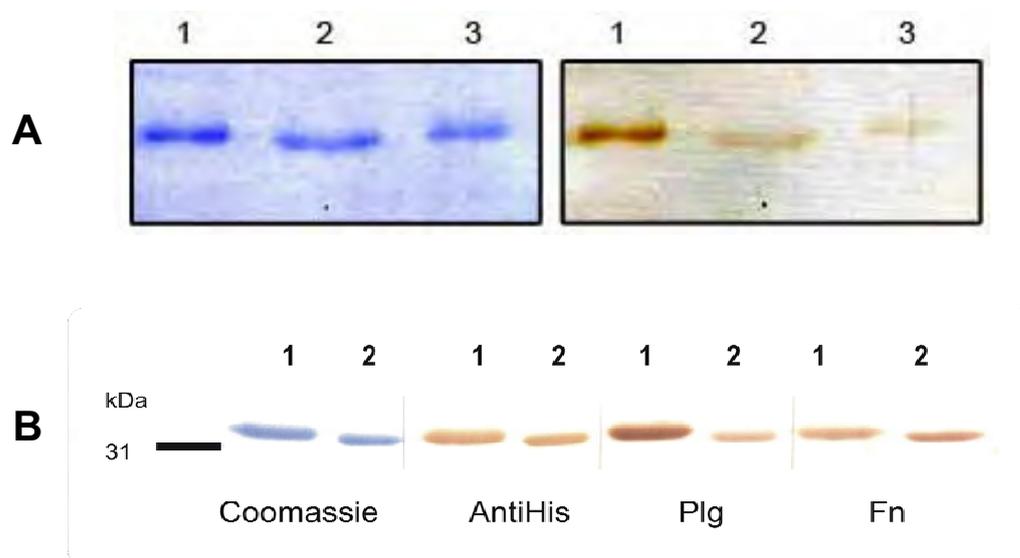


### 5.2.4. Ensayos de unión a Plg con las proteínas Ag85B, Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup>.

Con las proteínas purificadas se realizaron ensayos de unión a Plg por *ligand blotting* y por ELISA.

#### 5.2.4.1. Ligand Blotting

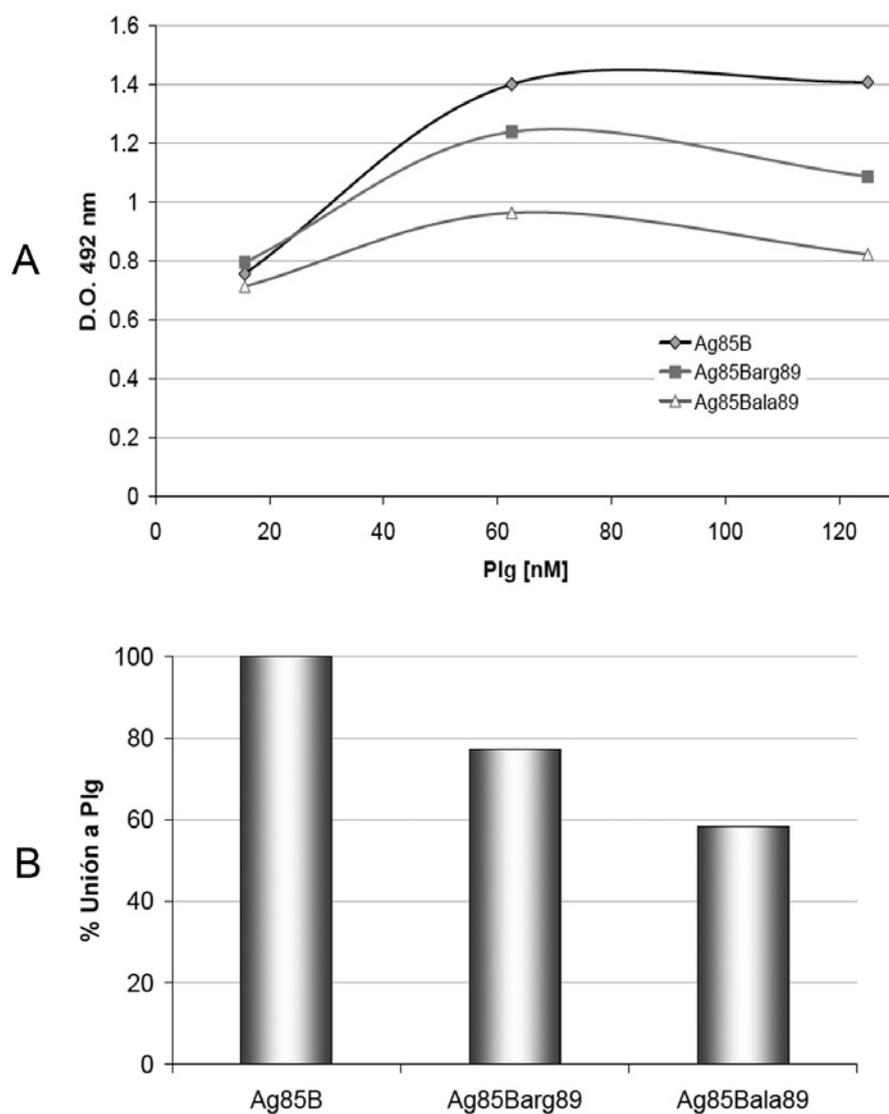
Como puede observarse en la Figura 5.16, la unión a Plg por *ligand blotting* se ve disminuida en Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup> comparada con Ag85B silvestre. También se evaluó la unión de Fn a las proteínas, la cual parece no ser afectada con la mutación como se ve en la Figura 5.16B.



**Figura 5.16** *Ligand Blot* de las proteínas recombinantes Ag85B y proteínas mutadas. Las proteínas purificadas fueron resueltas por SDS PAGE al 12% y transferidas a membranas PVDF. La proteína fue cuantificada por el método de Lowry modificado y 1  $\mu$ g de cada proteína recombinante se cargó en el gel. **A.** Izquierda, blot teñido con azul de Coomassie. Derecha, blot incubado con Plg 1 $\mu$ g/ml, antiPlg 1:1000 y proteína A peroxidasa 1:2000. **B.** Se muestra también la incubación con Fn y con el anticuerpo anti histidina. 1. Ag85B. 2. Ag85B<sup>arg89</sup>. 3. Ag85B<sup>ala89</sup>.

### 5.2.4.2. Ensayos de unión en placa de ELISA

Al evaluar la unión de Plg a las proteínas recombinantes Ag85B silvestre y proteínas mutadas mediante ELISA, se observó también una disminución de la unión a Plg con Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup> (Figura 5.17). La proteína Ag85B<sup>arg89</sup> une 20% menos Plg en comparación con la proteína silvestre, mientras que la proteína Ag85B<sup>ala89</sup> une 40% menos que la silvestre.



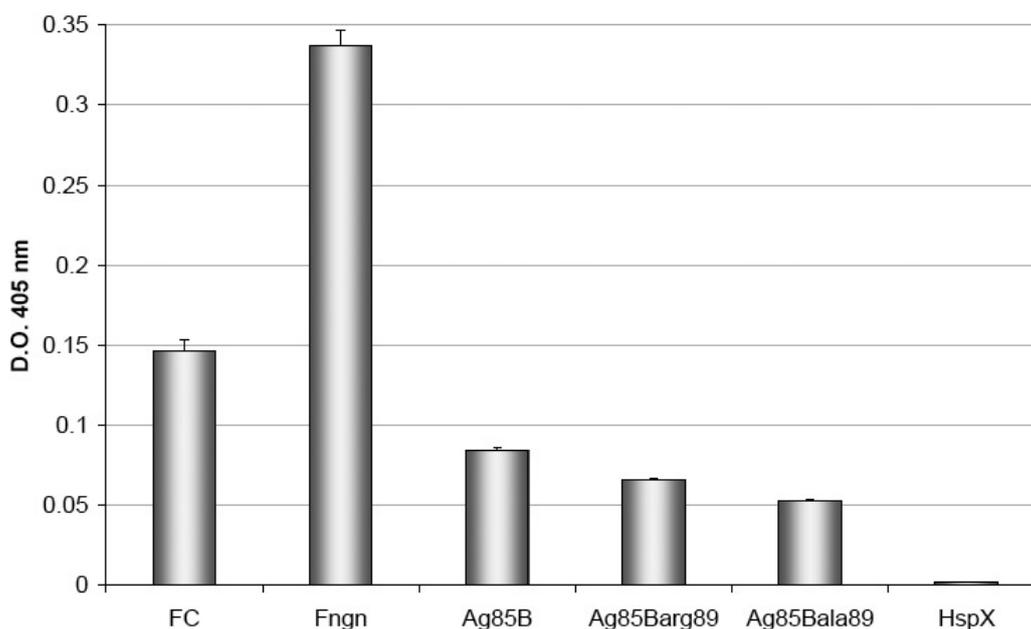
**Figura 5.17 Gráficas de la interacción Ag85B o de las proteínas mutantes con Plg evaluada por ELISA.** A. Se adsorbieron a los pozos de placas de ELISA 5 µg/ml de proteína recombinante. La unión a Plg se evaluó con 3 diferentes concentraciones de Plg 15, 62.5 y 125 nM. B. El valor de D.O. obtenido con la proteína Ag85B con la concentración de Plg 125 nM se tomó como el 100% de unión y respecto a este se normalizaron los datos obtenidos con las proteínas mutantes.



### 5.3. Ensayos de activación de Plg con las proteínas Ag85B, Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup>.

#### 5.3.1. Activación del Plg unido a las proteínas

Con las proteínas recombinantes se realizaron dos tipos de ensayos de activación de Plg, uno con las proteínas inmovilizadas y otro con las proteínas en solución. En el primero, las proteínas se adsorbieron de la misma manera en que se realizó para el ELISA y se incubaron con Plg, después los pozos se lavaron y el Plg unido se activó a Plm con tPA. En la Figura 5.18 se observa la actividad de Plm asociada a las proteínas recombinantes. Las proteínas Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup> unen menos Plg y por lo tanto presentan menor actividad de Plm asociada en comparación con la proteína silvestre. En este ensayo se empleó fibrinógeno como control positivo y a las proteínas de la fracción FC que contienen Ag85B nativa.

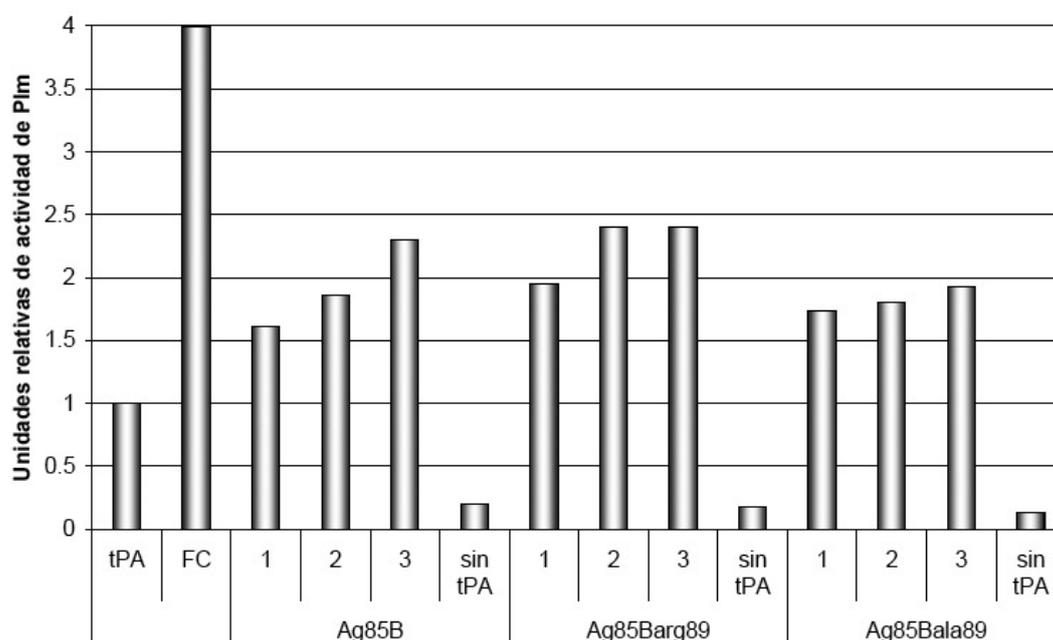


**Figura 5.18 Activación de Plg unido a Ag85B silvestre y proteínas mutadas.** El Plg unido a las proteínas recombinante previamente adsorbidas a los pozos de placas de ELISA, fue activado a Plm con tPA. Como controles positivos se adsorbieron las proteínas del FC y fibrinógeno. HspX se adsorbió como control negativo. El Plg convertido a Plm se midió por la degradación del sustrato para Plm Chromozym PL, el cual emite un color que es leído a  $\lambda_{405\text{ nm}}$ .



### 5.3.2. Activación del Plg en solución

En el ensayo en solución, el Plg es activado a Plm con tPA en presencia y ausencia de las proteínas recombinantes en solución (Figura 5.19). En este ensayo, se observó el mismo efecto de potenciación de la activación de Plg que se vio cuando se activa Plg en presencia de las proteínas del ES o del FC mostrado en la Figura 5.9 pero con la proteína Ag85B. El efecto es dosis dependiente según se observa con 1, 2 y 5  $\mu\text{g}$  de Ag85B. Si no hay tPA el Plg no se convierte a Plm aun en presencia de las proteínas recombinantes.



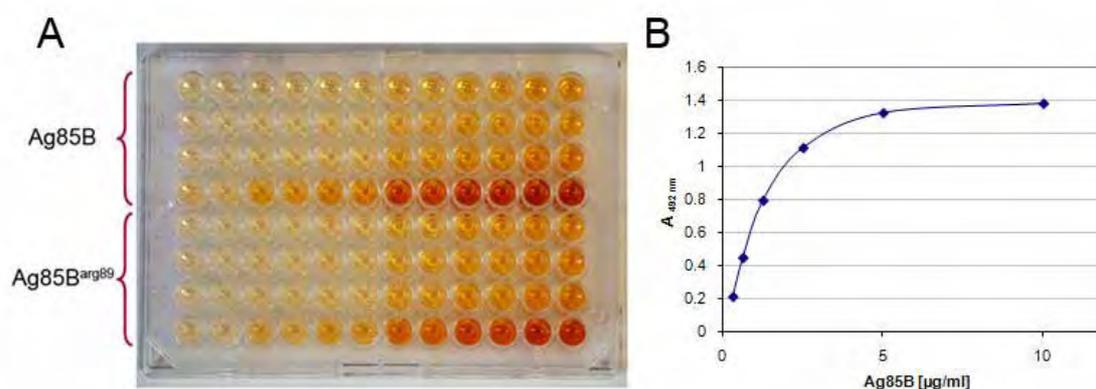
**Figura 5.19 Activación de Plg en solución en presencia de las proteínas recombinantes Ag85B o de las proteínas mutantes.** El Plg humano fue activado a Plm en presencia de las proteínas recombinantes en solución. Se incubaron tres diferentes concentraciones de cada proteína (1,2 y 5  $\mu\text{g}$ ) con Plg. Después de 1hr de interacción, el Plg fue activado a Plm con tPA. La actividad de Plm fue medida con un sustrato cromogénico específico para Plm. La actividad fue monitoreada a D.O.  $_{405\text{ nm}}$  cada 10 min. Los valores de D.O. de la región lineal de la curva obtenida fueron empleados para determinar la pendiente de cada activación con las diferentes concentraciones de proteínas. Los datos fueron normalizados con tPA. Los números 1, 2 y 3 corresponden a 1, 2 y 5  $\mu\text{g}$  de proteína recombinante respectivamente.

El aumento de la conversión de Plg a Plm por tPA en presencia de 5  $\mu\text{g}$  de Ag85B fue un poco más de 2 veces de lo que el tPA solo activa. Este resultado no se había obtenido con las otras proteínas recombinantes purificadas DnaK, GlnA1 y Ag85B inicialmente, en donde la inducción de GlnA1 y Ag85B se había obtenido como cuerpos de inclusión, lo que indica que la producción de la proteína recombinante Ag85B soluble fue importante para observar esta diferencia en el efecto cofactor de activación de Plg mediada por tPA.



### 5.3.3. Determinación de constantes de afinidad.

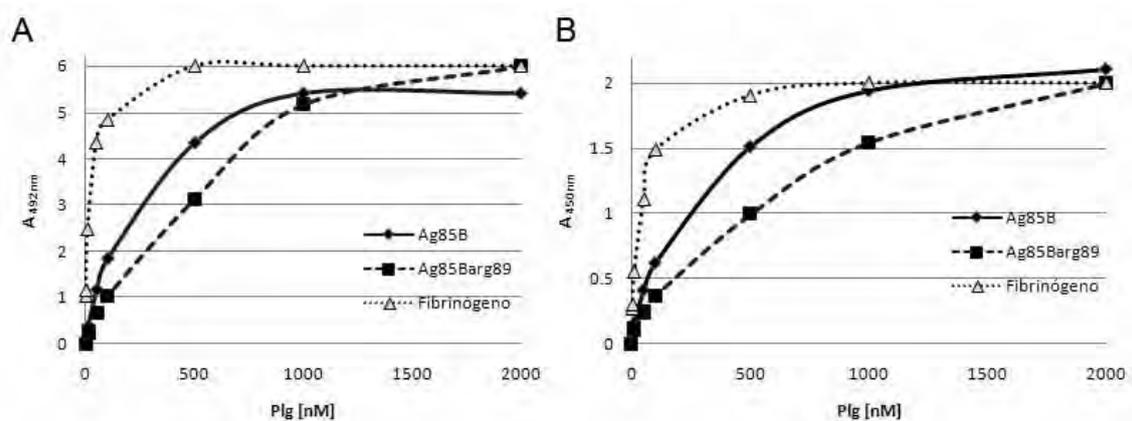
Para caracterizar mejor la unión de la proteína Ag85B recombinante a Plg se realizaron ensayos de unión por ELISA con diferentes concentraciones de Plg y con distintas concentraciones de Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup> adsorbidas a los pozos, como se observa en las Figuras 5.20 y 5.21. Se emplearon concentraciones de Plg en el rango de 0 a 2  $\mu\text{M}$ , ésta última concentración es la fisiológica circulante en plasma. Para determinar que las proteínas se adsorbieron diferencialmente, se detectó la proteína Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup> con un anticuerpo policlonal anti Ag85B hecho en conejo (ver Anexo). Como se muestra en la Figura 5.20B, el pozo de la placa de ELISA se satura cuando se adsorbe con una concentración de más de 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de la proteína recombinante.



**Figura 5.20** Ensayo de unión a Plg por ELISA con diferentes concentraciones de Plg y con distintas concentraciones de Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup>. **A.** Se adsorbieron 100  $\mu\text{l}$  de 0.1, 0.5, 1 o 5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de proteína recombinante a una placa de ELISA, lo que equivale a 7.25, 14.5, 29.0 y 144.0 nM de Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup>. Las proteínas adsorbidas se incubaron con Plg humano comercial en un rango de concentración de 0 a 2000 nM. El Plg unido se detectó con antiPlg y con proteína A peroxidasa cuya actividad fue medida a  $A_{492\text{nm}}$ . **B.** Diferentes concentraciones de A85B se adsorbieron a la placa de ELISA, la proteína adsorbida se detectó con un anticuerpo policlonal anti Ag85B 1:1000 y con proteína A peroxidasa medida espectrofotométricamente a  $A_{492\text{nm}}$ .

Los datos se obtuvieron empleando Plg purificado (Anexo) y Plg comercial. Los resultados de las curvas de saturación se graficaron y compararon con una curva de saturación obtenida con fibrinógeno. Se observó claramente como la unión de Plg a Ag85B es dosis-dependiente. La interacción Ag85B<sup>arg89</sup>-Plg también es dosis dependiente pero alcanza la saturación a concentraciones más altas de Plg (Figura 5.21).





**Figura 5.21 Gráficas de unión a Plg por Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup> en comparación con fibrinógeno.** Se empleó la concentración de 144 nM de Ag85B o Ag85B<sup>arg89</sup> adsorbida en el pozo y se comparó con 144 nM de fibrinógeno adsorbido para evaluar la unión a Plg, se utilizaron diferentes concentraciones de Plg hasta alcanzar la saturación. **A.** Valores de  $A_{492nm}$ . **B.** Valores determinados con el filtro a  $A_{450nm}$ . La medición se hizo con este filtro antes de detener la reacción con HCl, con la finalidad de compararla con  $A_{492nm}$  ya que el límite de sensibilidad en el lector de ELISA utilizado es de 6 puntos, y así corroborar que la saturación observada es debida a la unión de la proteína y no un efecto de la sensibilidad del equipo.

Las constantes de afinidad para cada proteína se obtuvieron ajustando los datos de la curva de saturación a la ecuación hiperbólica de Michaelis-Menten, el valor de  $K_d$  se determinó despejando el valor de la  $K_m$  en el ajuste matemático linearizado por doble recíproco y se comparó con la  $K_d$  de fibrinógeno obtenida también experimentalmente (Tabla 4). El ajuste matemático no linear se realizó con el programa KaleidaGraph 4.0 (Anexo). Aunque también se probaron los valores obtenidos en otras concentraciones de la proteína adsorbida, sólo se obtuvo un buen ajuste ( $R=0.99$ ) con la concentración de proteína adsorbida de 144.5 nM.

**Tabla 4. Constantes de afinidad a Plg comercial determinadas mediante ensayos de ELISA.**

	Kd (nM)	
	Ajuste manual por doble recíproco de M-M	Ajuste con KaleidaGraph 4.0.
Fibrinógeno	26.0	28.7
Ag85B	181.2	217.1
Ag85B <sup>arg89</sup>	415.8	718.2



## Capítulo 6

# Discusión

La estrategia que se empleó en este estudio nos permitió determinar la identidad de 15 proteínas de unión a Plg en *M. tuberculosis*. La combinación de geles bidimensionales junto con *ligand blotting* se había usado previamente para identificar 8 proteínas de unión a Plg en la levadura *C. albicans*. Es de notar que 2 de las proteínas identificadas en ese trabajo, el factor de elongación TU (EF-Tu) y la fructuosa-bifosfato aldolasa, también estuvieron entre las 15 proteínas que nosotros identificamos en *M. tuberculosis* (Crowe et.al., 2003).

Como ya se ha descrito para otros patógenos, los PlgRs no tienen un dominio en particular de unión a Plg y son diversas sus funciones. Muchas de las proteínas reportadas tienen función metabólica, como la  $\alpha$ -enolasa y la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa (GA3PDH) en el grupo A de estreptococos (Bergmann et.al., 2001; Bergmann et.al., 2004); o bien, participan como adhesinas como en el caso de los fimbrias de *Salmonella sp.* y *Escherichia coli* (Korhonen et.al., 1997). Algunas de las proteínas reportadas comparten la característica de presentar Lys en el extremo C-terminal (Miles et.al., 1991), las cuales median la unión a los LBS del Plg, aunque no en todos los PlgRs es esencial que las Lys estén en el extremo C-terminal (Derbise et.al., 2004). Igualmente algunas de las proteínas que nosotros hemos identificado en *M. tuberculosis* presentan una lisina C-terminal como las proteínas de estrés calórico DnaK y GroES, el factor de elongación EF-Tu y la subunidad beta del proteasoma PrcB. Otras tienen función metabólica como la enzima glutamina sintetasa (GlnA1) que participa en la síntesis de glutamina o como los miembros del complejo Ag85 (A, B y C) que participan en la síntesis de la pared celular, en la



transferencia de ácidos micólicos, estas últimas proteínas también son caracterizadas por su unión a fibronectina (Fn). Un hallazgo importante en el desarrollo de este trabajo, fue el de que algunas de las proteínas identificadas como PlgRs putativos mostraron esta capacidad de interactuar con Fn. En los miembros del complejo Ag85 al igual que en la proteína Mpt51 ésta característica ya había sido reportada, sin embargo en la proteína GlnA1 la facultad de unir Fn fue un hecho novedoso, lo cual correlaciona con lo que se ha descrito en otros PlgRs como las fimbrias y la GA3PDH (Tabla 1), que además de tener capacidad de unión a Plg también tienen interacción con proteínas de MEC como Fn y laminina (importante en la metástasis bacteriana) (Lähteenmäki et.al., 2005).

Los miembros del complejo Ag85 son proteínas involucradas en la síntesis de la pared celular (Belisle et.al., 1997). A pesar de estar codificadas por genes independientes su función es redundante pero esencial para la sobrevivencia de la bacteria (Puech et.al., 2002). Son proteínas secretadas por la vía sec-dependiente, y se caracterizan por ser muy abundantes en FC (Wiker & Harboe, 1992). Estas proteínas han sido muy estudiadas desde el punto de vista antigénico y actualmente el Ag85B es un candidato de vacunación (Horwitz et.al., 1995; Badell et.al., 2009). Aunque fueron descritas como proteínas de unión a Fn, su papel en este sentido no ha sido bien definido, pero se piensa que pueden mediar señalización para inducir fagocitosis a través de la interacción con Fn y de esta a su vez con integrinas (Peake et.al., 1993). La interacción de estas proteínas con Plg aunado a su capacidad de unir Fn sugiere la participación de ellas en procesos diferentes al de su actividad como micolil transferasas.

La mayoría de las proteínas identificadas en este estudio corresponden a proteínas que tienen funciones metabólicas cuya localización es predominantemente citosólica, según se conoce en otros organismos. No obstante, casi todas ellas, con excepción de isocitrato liasa (Icl) y metionina-adenosiltransferasa (MetK), se han identificado previamente como proteínas que pueden encontrarse en el filtrado de cultivo o en la pared celular (Rosendkrands et.al., 2000 (a); Rosenkrands et.al., 2000(b); Malen et.al., 2007).

El hecho de que proteínas del metabolismo puedan ser secretadas y asociarse en la superficie con funciones de adherencia o de unión a moléculas del hospedero con capacidad proteolítica, es ahora un evento que está tomando relevancia y que incluso puede considerársele como factor de virulencia, tal como se ha descrito para GA3PDH o  $\alpha$ -enolasa, enzimas cuya actividad se ha demostrado en la superficie bacteriana (Pancholi & Chhatwal, 2003). La presencia



de GA3PDH se ha reportado en la superficie de algunas micobacterias (Bermudez et.al., 1996), sin embargo, en el presente trabajo no se identificó a esta proteína en ninguna de las fracciones analizadas.

Otra evidencia de que algunas proteínas con actividad metabólica son secretadas por *M. tuberculosis*, se demostró en el trabajo de Reynaud et.al. en 1998, quienes exploraron si la actividad enzimática extracelular pudiera estar implicada en la virulencia de la bacteria. En este sentido, Reynaud y colaboradores encontraron que una de las proteínas que nosotros identificamos como PlgR putativo, la GlnA1, es secretada y su actividad extracelular está involucrada en la síntesis de L-glutamina, componente del polímero L-glutamato/glutamina que se asume está presente en la envoltura de cepas virulentas del complejo *M. tuberculosis* (Harth et.al., 1994).

Simultáneamente a este trabajo, se ha identificado a la DnaK como un PlgR en *Neisseria meningitidis* (Knaust et.al., 2007) y en diferentes especies de *Bifidobacterium* (Candela et.al., 2007). En este último estudio, se identificaron 5 proteínas de unión a Plg entre las que también se identificó a una glutamina sintetasa. A pesar de ser desconocido el mecanismo de secreción de las proteínas extracelulares con función metabólica, ya que no presentan un péptido señal, varios reportes confirman la presencia de enzimas citosólicas en la superficie de las bacterias (Pancholi & Chhatwal, 2003). La mayoría de ellas suelen ser muy conservadas aun entre diferentes especies bacterianas, la presencia de ellas en diferentes organismos demuestra que la capacidad de unir Plg es una función que también se conserva, como sucede con la  $\alpha$ -enolasa presente tanto en células eucariontes como en procariontes y ambas unen Plg.

En el presente trabajo, además de identificar algunos PlgRs putativos en *M. tuberculosis*, se confirmó la interacción con Plg *in vitro* de 3 de las 15 proteínas identificadas con la producción de las proteínas recombinantes. Se evaluó la interacción con Plg de las proteínas DnaK, GlnA1 y Ag85B de *M. tuberculosis* recombinantes en *E. coli* y se confirmó la capacidad de éstas para unirlos específicamente. De las tres, GlnA1 fue de las proteínas que mostró mayor unión a Plg, casi el 40% de la unión que presenta fibrinógeno. Además el Plg unido a las proteínas conserva la facultad de ser activado a Plm por el activador tPA, lo que es congruente con uno de los mecanismos propuestos para la activación de Plg e importante para la diseminación y virulencia bacteriana, ya que al unir el Plg humano en su superficie las bacterias pueden aprovechar los activadores del hospedero para convertir el Plg a Plm. Además de que el Plg unido a las proteínas



de *M. tuberculosis* fue susceptible de activarse a Plm, se observó también un efecto potenciador en la activación del Plg a Plm mediada por tPA en presencia de las proteínas del FC y ES. Esto podría ser debido al efecto cofactor que los numerosos PlgRs putativos de la micobacteria podrían ejercer sobre la conformación del Plg haciendolo más susceptible a ser activado por el activador fisiológico.

En este estudio también se demostró la participación de los LBS del Plg en la interacción con las proteínas de las fracciones ES y FC y las proteínas recombinantes de *M. tuberculosis*, ya que la unión se inhibió en presencia del competidor EACA, que al ser un análogo de lisina compitió por los LBS del Plg. Los estudios reportados con otras bacterias resaltan la importancia de unir el Plg de manera LBS-dependiente, ya que el inhibidor fisiológico  $\alpha$ 2-antiPlm, que regula la actividad de Plm y se une mediante los LBS a ella, no puede bloquear su actividad eficientemente cuando los dominios kringle están ocupados, lo que daría lugar a una proteólisis incontrolada asociada a la superficie de la bacteria (Bergmann & Hammerschmidt, 2007).

La unión de Plg con sus ligandos casi siempre ha involucrado la presencia de Lys y de los LBS, aunque también puede haber interacción con componentes no proteicos como gangliósidos y glicosaminoglicanos (Plow 1995). Se ha descrito que los LBS reconocen preferencialmente Lys C-terminal, sin embargo no es una característica estricta en los PlgRs, ya que algunos como PAM de estreptococos no tienen Lys C-terminal, en lugar de ello, posee un motivo al interior de su secuencia que mantiene una alta afinidad a Plg (1nM) (Berge & Sjobring, 1993; Sanderson-Smith, Walker, & Ranson, 2006). En el presente trabajo, sólo se identificaron 4 proteínas que presentan Lys C-terminal, por lo que el resto de las proteínas deben mediar su unión a Plg mediante Lys que se encuentren al interior de la secuencia. El hecho de que una proteína contenga Lys o la presencia de numerosas Lys en la proteína no es un requisito para que ésta se una a Plg, un ejemplo de ello se expuso en nuestro trabajo. Nosotros empleamos como control a una proteína de *M. tuberculosis* presente en la fracción ES y en la fracción de pared celular (PC), la proteína de estrés calórico HspX. Esta proteína contiene numerosas Lys a lo largo de su secuencia, a pesar de ello la proteína no une Plg por lo que funcionó como un buen control negativo en nuestros ensayos.



En otros géneros bacterianos solamente algunos PlgRs han sido caracterizados ampliamente en su interacción con Plg. En todos ellos la presencia de Lys ha sido importante. En este trabajo, la caracterización de la interacción con Plg y la identificación del sitio involucrado en la unión, se determinó específicamente en los miembros del complejo Ag85, en particular con la proteína Ag85B. El modelaje *in silico* permitió predecir en las proteínas Ag85A y Ag85B la participación de la Lys 89 en la interacción con un LBS, la cual fue corroborada posteriormente al mutar la Lys e intercambiarla por Arg o por Ala. Sólo se observó una disminución de la unión a Plg en las proteínas mutadas Ag85B<sup>arg89</sup> y Ag85B<sup>ala89</sup>, mientras que la unión a Fn permaneció sin cambios significativos, lo cual indica que la mutación es específica para la interacción con Plg. Aunque la unión a Plg disminuyó notablemente, es posible que otras Lys o sitios en la molécula estén mediando la unión a Plg ya que la interacción no se abatió completamente en las proteínas mutadas.

Como parte de la caracterización de la interacción de la proteína Ag85B con Plg, se obtuvieron proteínas recombinantes en forma soluble. La producción de éstas de manera soluble permitió un estado favorable de la proteína para los ensayos de interacción efectuados. Esto se comparó con lo que se había realizado en la primera parte del trabajo, en donde la obtención de la proteína se hizo mediante cuerpos de inclusión, en cuyo caso la proteína debía de ser desnaturalizada para purificarse. El inconveniente posterior a la renaturalización era que la proteína tendía a precipitarse, esto quizá debido a un plegamiento inadecuado. La inducción de la proteína soluble desde la generación del cultivo bacteriano eliminó estos inconvenientes aunque su purificación no fue tan limpia por lo que se empleó un paso adicional de purificación a la cromatografía de afinidad que fue cromatografía de intercambio iónico. Las proteínas obtenidas de esta manera permitieron que los ensayos de activación en solución mostraran un efecto cofactor en la conversión de Plg a Plm, ya que este resultado potenciador de activación de Plg mediado por tPA solo se había obtenido en presencia de las proteínas nativas (ES o FC). Cuando se intentaron estos ensayos con las recombinantes GlnA1 y Ag85B que formaron cuerpos de inclusión no se observó dicho efecto, no así con las proteínas producidas en forma soluble, en donde el efecto cofactor con la proteína Ag85B mostró ser claramente dosis dependiente.

Para determinar las constantes de afinidad entre Plg y Ag85B, se llevaron a cabo ensayos de unión a Plg por ELISA con las proteínas purificadas hasta alcanzar la saturación. Los valores obtenidos para el Ag85B, que fueron alrededor de 200 nM, caen en el rango reportado para otros



PlgRs el cual oscila entre 10 y 2000 nM, por lo que se le podría considerar un receptor de mediana afinidad. El método empleado para la determinación de las constantes de afinidad fue validado al determinar la constante de fibrinógeno y compararla con la descrita previamente obtenida por SPR (Surface Plasmon Resonance), la  $K_d$  que se ha reportado para fibrinógeno es de aproximadamente 10 nM, el valor de 26 nM obtenido mediante nuestros ensayos fue cercano al reportado. Comparada con la  $K_d$  de fibrinógeno, la  $K_d$  de Ag85B es aproximadamente 10 veces mayor, lo que indica que la interacción de Plg con Ag85B es más débil. De acuerdo con Plow et.al. 1995, las características que definen a los PlgRs, al menos en las células eucariontes son: 1) su baja afinidad; 2) su alta densidad; y 3) su distribución ubicua, lo que apoya el hecho de que los receptores sean muy heterogéneos en cuanto a su naturaleza. La heterogeneidad de un receptor no solo adapta la alta capacidad de las células por el Plg sino que también incrementa la posibilidad de que se produzcan respuestas funcionales diferentes en respuesta a interacciones individuales. Por ejemplo, algunos grupos específicos de receptores pueden ser efectivos particularmente en mantener la activación de Plg mientras que otros pueden producir respuestas específicas a eventos de adherencia o señalización intracelular (Plow et.al., 1995). De ahí que no sea de sorprender el que hayamos encontrado numerosas proteínas de unión a Plg en el presente trabajo.

En el contexto del bacilo causante de la tuberculosis, se ha visto que la formación del granuloma está regulada por diversos factores en los que participan tanto las células del sistema inmune como la bacteria. En la tuberculosis progresiva, se alcanza un punto en el que el granuloma ya no puede contener la infección y las bacterias se liberan y llegan al torrente sanguíneo para después diseminarse sistémicamente. Durante la formación del granuloma se ha visto que la MMP-9 es importante en el reclutamiento de macrófagos y en la remodelación del tejido que permiten el establecimiento de granulomas firmes y bien organizados, también se ha demostrado que al bloquear la actividad de esta MMP la diseminación de los bacilos tuberculosos disminuye considerablemente (Taylor et.al., 2006). MMP-9 es un sustrato importante de Plm, por lo que su presencia activa sugiere la presencia de Plm. Los eventos en la formación del granuloma pueden concentrar a los elementos del sistema Plg/Plm en el sitio de infección de tal manera que estén disponibles para que la bacteria pueda aprovecharlos. El balance del granuloma en la contención de la infección puede ser interrumpido por mediadores bacterianos, y aunado a la capacidad para adquirir Plm en su superficie, la micobacteria puede utilizar a los sistemas



Plg/Plm y de MMPs como un mecanismo de diseminación que facilitarían el movimiento de la micobacteria a través de barreras titulares, o bien para degradar la cápsula fibrosa que se cree mantiene la estructura del granuloma.

En el 2003, Sato y colaboradores evaluaron el papel del sistema fibrinolítico en la formación del granuloma en respuesta a una infección con micobacterias empleando ratones C57B/L6 individualmente deficientes en Plg, tPA, uPA, y uPAR. Los resultados de ese estudio mostraron que el Plg no desempeña un papel significativo en la iniciación o mantenimiento de la respuesta inmune contra *M. avium* 724 o contra *M. bovis* BCG. Sin embargo, mencionan que estas proteínas fibrinolíticas pueden regular la progresión de la fibrosis en el granuloma durante la fase crónica de la infección (Sato et.al., 2003). En este trabajo es claro que el Plg no es indispensable para la formación del granuloma. No obstante, en lo que respecta a diseminación, el modelo de infección con *M. avium* empleado en este trabajo no asemeja completamente a la patología desarrollada con *M. tuberculosis* ya que los tiempos en los que se evalúan las lesiones son muy largos (1, 5 y 10 semanas post-infección) reflejando un modelo de fase crónica en donde los ratones no sucumben a la infección.

Por otro lado, algunos datos aun no publicados (Rodríguez E. et.al.,) de un modelo murino de TB progresiva con *M. tuberculosis*, sugieren que la presencia de Plg/Plm en el sitio del granuloma ocurre a partir del día 14 post-infección alcanzando los niveles más altos en los días 21 y 28 post-infección, lo cual correlaciona con el momento en que la respuesta inmune ya no es solo del tipo Th1, asociado con protección, sino que tiene componentes de Th1 y Th2; la primera corresponde al perfil de citocinas producidas por los linfocitos T que median la respuesta celular y la segunda a citocinas que median la respuesta humoral.

Algunos estudios sugieren que la patología de la tuberculosis puede comportarse de manera similar al de una patología tumoral. Incluso, la presencia de niveles altos de algunos biomarcadores tumorales, ha llevado consigo a un diagnóstico erróneo. Se han presentado casos de pacientes diagnosticados con cáncer de ovario, mama o intestino, que en realidad eran formas crípticas de tuberculosis miliar o extrapulmonar (Alimaghham et.al., 2006).

La capacidad de la micobacteria para unirse a componentes de matriz extracelular y de adquirir una actividad proteolítica en su superficie, sugiere que esta podría aprovechar los componentes del hospedero para su diseminación o metástasis bacteriana, tal como se ha propuesto en otras bacterias (Lähtenmäki et.al., 2001; Lähtenmäki et.al., 2005).



La identificación y caracterización de las proteínas micobacterianas involucradas en el proceso de diseminación, así como la caracterización de sus receptores con las moléculas blanco del hospedero, pueden ser útiles en el desarrollo de nuevas drogas o agentes terapéuticos que impidan la diseminación y daño tisular, bloqueando la adherencia del bacilo y facilitando la eliminación del mismo.



# Capítulo 7

## Conclusiones

- ♣ Se identificaron 15 proteínas de unión a Plg en *M. tuberculosis*.
- ♣ La interacción con Plg es mediada por los LBS (lysine binding sites).
- ♣ Las proteínas recombinantes DnaK, GlnA1 y Ag85B unen Plg, y éste puede ser activado a Plm por tPA.
- ♣ Además de las proteínas del complejo Ag85 reconocidas como proteínas de unión a Fn, se demostró que la proteína GlnA1 de *M. tuberculosis* también une Fn.
- ♣ En la proteína Ag85B, se pudo predecir por modelaje molecular, la participación de la Lys 89 en la interacción con el LBS del Kringle 1 del Plg. Esta participación se comprobó *in vitro* al mutar esta Lys por Arg o Ala observándose una disminución de la unión a Plg en las proteínas mutadas.
- ♣ Se determinaron las constantes de afinidad entre Ag85B y Plg.
- ♣ La activación del Plg a Plm por tPA es potenciada en presencia de las proteínas del ES o del FC, este efecto es mediado por los LBS.



# Capítulo 8

## Perspectivas

El principal hallazgo de este trabajo fue la identificación de nuevas proteínas de unión a Plg en el patógeno *M. tuberculosis*. La caracterización *in vitro* de estas proteínas confirma que la micobacteria posee elementos que le permitirían interactuar con el sistema Plg/Plm del hospedero. Sin embargo, el estudio del papel de estas proteínas en el contexto de la bacteria queda por definirse. Al respecto, el desarrollo de anticuerpos contra las proteínas recombinantes puede ser una herramienta útil para bloquear específicamente a estas proteínas en la superficie de la bacteria y evaluar su interacción con Plg.

Una forma de evaluar invasión en otras bacterias, ha sido mediante el uso de matrices sintéticas como el matrigel o de matrices tisulares, *M. tuberculosis* podría ser recubierta de Plg y en un ensayo de migración a través de matrices evaluar su capacidad invasiva mediada por Plm.

Uno de los puntos importantes a evaluar en un futuro es el papel de la interacción de la micobacteria con el sistema Plg/Plm *in vivo*. Esto podría evaluarse en un modelo murino de TB progresiva, en donde, previo a la infección con *M. tuberculosis*, las bacterias fueran recubiertas con Plg, similar a lo que se realizó con el grupo A de estreptococos en un modelo murino de infección en piel, en donde demostraron que el Plg promovía la virulencia de esta bacteria.

Finalmente, sería interesante investigar la interacción de *M. tuberculosis* con otros elementos del sistema Plg/Plm como uPA y su receptor uPAR, y evaluar el papel de estas interacciones no solo en diseminación o invasión, sino en inflamación y fagocitosis. Al respecto de esto último, el hallazgo de que algunas de las proteínas de unión a Plg identificadas se unan también a Fn,



sugiere que estas proteínas podrían mediar interacciones con integrinas, y en este sentido el papel de una interacción con uPAR sería importante en transducción de señales.



# Capítulo 9

## Bibliografía

- Abou-Zeid, C., Ratliff, T. L., Wiker, H. G., Harboe, M., Bennedsen, J., & Rook, G. A. (1988). Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun* , 56 (12), 3046-51.
- Alimaghani, M., Aminiafshar, S., Hosseini Moghaddam, S. M., & Shokuhi, S. (2006). Two cases of miliary tuberculosis and elevated levels of cancer antigen 125. *Can J Infect Dis Med Microbiol* , 17 (2), 135.
- Andreasen, P. A., Egelund, R., & Petersen, H. H. (2000). The plasminogen activation system in tumor growth, invasion, and metastasis. *Cell. Mol. Life Sci.* , 57, 25-40.
- Badell, E., Nicolle, F., Clark, S., Majlessi, L., Boudou, F., Martino, A., y otros. (2009). Protection against tuberculosis induced by oral prime with *Mycobacterium bovis* BCG and intranasal subunit boost based on the vaccine candidate Ag85B-ESAT-6 does not correlate with circulating IFN-gamma producing T-cells. *Vaccine* , 27 (1), 28-37.
- Bass, R., & Ellis, V. (2002). Cellular mechanisms regulating non-haemostatic plasmin generation. *Biochemical Society Transactions* , 30 (2), 189-194.
- Belisle, J. T., Vissa, V. D., Sievert, T., Takayama, K., Brennan, P. J., & Besra, G. S. (1997). Role of the Major Antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in Cell Wall Biogenesis. *Science* , 276, 1420-22.
- Berge, A., & Sjobring, U. (1993). PAM, a Novel Plasminogen-binding Protein from *Streptococcus pyogenes*. *The Journal of Biological Chemistry* , 268 (34), 25417-25424.



- Bergmann, S., & Hammerschmidt, S. (2007). Fibrinolysis and host response in bacterial infections. *Thromb Haemost*, *98*, 512–520.
- Bergmann, S., Rohde, M., & Hammerschmidt, S. (2004). Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase of *Streptococcus pneumoniae* is a surface-displayed plasminogen binding protein. *Infect. Immun*, *72*, 2416–2419.
- Bergmann, S., Rohde, M., Chhatwal, G. S., & Hammerschmidt, S. (2001).  $\alpha$ -Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Molecular Microbiology*, *40* (6), 1273-1287.
- Bergmann, S., Wild, D., Diekmann, O., Frank, R., Bracht, D., Chhatwal, G. S., y otros. (2003). Identification of a novel plasmin(ogen)-binding motif in surface displayed  $\alpha$ -enolase of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol. Microbiol*, *49*, 411–423.
- Bermudez, L. E., Petrofsky, M., & Shelton, K. (1996). Epidermal growth factor-binding protein in *Mycobacterium avium* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*, *64*, 2917-2922.
- Blasi, F., & Carmeliet, P. (2002). uPAR: a versatile signalling orchestrator. *Nat Rev Mol Cell Biol*, *3* (12), 932-43.
- Boyle, M. D., & Lottenberg, R. (1997). Plasminogen activation by invasive human pathogens. *Thromb Haemost.*, *77* (1), 1-10.
- Brooks, B. R., Bruccoleri, R. E., Olafson, B. D., States, D. J., Swaminathan, S., & Karplus, M. (1983). CHARMM: A Program for Macromolecular Energy, Minimization, and Dynamics Calculations. *J. Comp. Chem*, *4*, 187-217.
- Candela, M., Bergmann, S., Vici, M., Vitali, B., Turrone, S., Eikmanns, B. J., y otros. (2007). Binding of Human Plasminogen to *Bifidobacterium*. *Journal of Bacteriology*, *189* (16), 5929–5936.
- Cesarman-Maus, G., & Hajjar, K. A. (2005). Molecular mechanisms of fibrinolysis. *British Journal of Haematology*, *129*, 307–321.
- Cole, S. T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., y otros. (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, *393* (6685), 537-44.
- Coleman, J. L., & Benach, J. L. (2003). The urokinase receptor can be induced by *Borrelia burgdorferi* through receptors of the innate immune system. *Infection and Immunity*, *71* (10), 5556-64.



- Coleman, J. L., & Benach, J. L. (1999). Use of the plasminogen activation system by microorganisms. *J. Lab. Clin. Med.* , 134, 567–576.
- Coleman, J. L., Gebbia, J. A., & Benach, J. L. (2001). *Borrelia burgdorferi* and other bacterial products induce expression and release of the urokinase receptor (CD87). *J. Immunol.* , 166, 473–480.
- Coleman, J. L., Gebbia, J. A., Piesman, J., Degen, J. L., Bugge, T. H., & Benach, J. L. (1997). Plasminogen is required for efficient dissemination of *B. burgdorferi* in ticks and for enhancement of spirochetemia in mice. *Cell* , 89 (7), 1111-1119.
- Coleman, J. L., Roemer, E. J., & Benach, J. L. (1999). Plasmin-Coated *Borrelia burgdorferi* Degrades Soluble and Insoluble Components of the Mammalian Extracellular Matrix. *Infection and Immunity* , 67 (8), 3929–3936.
- Coleman, J. L., Sellati, T. J., Testa, J. E., Kew, R. R., Furie, M. B., & Benach, J. L. (1995). *Borrelia burgdorferi* binds plasminogen, resulting in enhanced penetration of endothelial monolayers. *Infect Immun* , 63 (7), 2478-84.
- Collen, D. (1999). The Plasminogen (Fibrinolytic) System. *Trombosis and Haemostasis* , 82 (2), 259-270.
- Cromogenix, A. (1995). Plasminogen, Product Monograph.
- Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R., Gow, N. A., & Booth, N. A. (2003). *Candida albicans* binds human plasminogen: identification of eight plasminogen-binding proteins. *Molecular Microbiology* , 1637-1651.
- Danø, K., Behrendt, N., Høyer-Hansen, G., Johnsen, M., Lund, L. R., Ploug, M., y otros. (2005). Plasminogen activation and cancer. *Thromb Haemost* , 93, 676-81.
- Darden, T. A., York, D. M., & Pedersen, L. G. (1993). Particle mesh Ewald. An  $N \cdot \log(N)$  method for Ewald sums in large systems. *J. Chem. Phys.* , 98, 10089-10092.
- Darenfed, H., Grenier, D., & Mayrand, D. (1999). Acquisition of plasmin activity by *Fusobacterium nucleatum* subsp. *nucleatum* and potential contribution to tissue destruction during periodontitis. *Infect Immun* , 67 (12), 6439-44.
- Del Rosso, M., Fibbi, G., Pucci, M., Margheri, F., & Serrati, S. (2008). The Plasminogen activation system in inflammation. *Front Biosci* , 13, 4667-86.
- Derbise, A., Song, Y. P., Parikh, S., Fischetti, V. A., & Pancholi, V. (2004). Role of the C-Terminal Lysine Residues of Streptococcal Surface Enolase in Glu- and Lys-Plasminogen-Binding Activities of Group A Streptococci. *Infection and Immunity* , 94–105.



- Dheda, K., Booth, H., Huggett, J. F., Johnson, M. A., Zumla, A., & Rook, G. A. (2005). Lung Remodeling in Pulmonary Tuberculosis. *The Journal of Infectious Diseases* , 192, 1201–10.
- Eberhard, T., Kronvall, G., & Ullberg, M. (1999). Surface bound plasmin promotes migration of *Streptococcus pneumoniae* through reconstituted basement membranes. *Microb Pathog* , 26, 175-181.
- Espitia, C., Cervera, I., & Mancilla, R. (1991). The antigenic structure of *Mycobacterium tuberculosis* examined by immunoblot and ELISA. Influence of the age of the culture and of the obtaining method on the composition of the antigenic extracts. *Arch Invest Med (Mex)* , 22 (1), 101-7.
- Eugen-Olsen, J., Gustafson, P., Sidenius, N., Fischer, T. K., Parner, J., Aaby, P., y otros. (2002). The serum level of soluble urokinase receptor is elevated in tuberculosis patients and predicts mortality during treatment: a community study from Guinea-Bissau. *Int J Tuberc Lung Dis* , 6 (8), 686–692.
- Ferreira da Silva, C. M., Vidipó, L. A., Nishi, R., & Plotkowski, M. A. (2004). Binding of plasminogen to *Pseudomonas aeruginosa* results in formation of surface-associated plasmin and enhanced bacterial invasiveness. *Microbial Pathogenesis* , 36, 59-66.
- Fox, D., & Smulian, A. G. (2001). Plasminogen-binding activity of enolase in the opportunistic pathogen *Pneumocystis carinii*. *Med Mycol* , 39 (6), 495-507.
- Fuchs, H. R., Wallich, R., Simon, M. M., & Kramer, M. D. (1994). The outer surface protein A of the spirochete *Borrelia burgdorferi* is a plasmin(ogen) receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci.* , 91, 12594-12598.
- Goguen, J. D., Bugge, T., & Degen, J. L. (2000). Role of pleiotropic effects of Plasminogen deficiency in infection experiments with Plasminogen-deficient mice. *Methods* , 21, 178-183.
- Gordon, S., & Cohn, Z. A. (1978). Bacille Calmette-Guérin Infection in the Mouse Regulation of Macrophage Plasminogen Activator by T Lymphocytes and Specific Antigen. *J. Exp. Med.* , 147 (4), 1175-88.
- Hajjar, K. A., Jacovina, A. T., & Chacko, J. (1994). An endothelial cell receptor for plasminogen/tissue plasminogen activator I. Identity with annexin II. *J Biol Chem* , 269 (33), 21191-21197.



- Harmsen, A. G., Muggenburg, B. A., Snipes, M. B., & Bice, D. E. (1985). The role of macrophages in particle translocation from lungs to lymph nodes. *Science*, *230*, 1277–1280.
- Harth, G., Clemens D L, D. L., & Horwitz, M. A. (1994). Glutamina synthetase of *Mycobacterium tuberculosis*: extracellular release and characterization of its enzyme activity. *Proc Natl Acad Sci USA*, *91*, 9342-9346.
- Horwitz, M. A., Lee, B.-W. E., Dillon, B. J., & Harth, G. (1995). Protective immunity against tuberculosis induced by vaccination with major extracellular proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, *92*, 1530-1534.
- Hu, L. T., Pratt, S. D., Perides, G., Katz, L., Rogers, R. A., & Klempner, M. S. (1997). Isolation, cloning, and expression of a 70-kilodalton plasminogen binding protein of *Borrelia burgdorferi*. *Infect. Immun*, *65* (12), 4989-4995.
- Humphrey, W., Dalke, A., & Schulten, K. (1996). VMD - Visual Molecular Dynamics. *J. Molec. Graphics.*, *14*, 33-38.
- Jagneaux, T., Taylor, D. E., & Kantrow, S. P. (2004). Coagulation in sepsis. *Am J Med Sci*, *328*, 196—204.
- Jönsson, K., Guo, B. P., Monstein, H. J., Mekalanos, J. J., & Kronvall, G. (2004). Molecular cloning and characterization of two *Helicobacter pylori* genes coding for plasminogen-binding proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci U S A*, *101* (7), 1852-7.
- Juffermans, N. P., Dekkers, P. E., Verbon, A., Speelman, P., van Deventer, S. J., & van der Poll, T. (2001). Concurrent upregulation of urokinase plasminogen activator receptor and CD11b during tuberculosis and experimental endotoxemia. *Infect Immun*, *69* (8), 5182-5.
- Kalé, L., Skeel, R., Bhandarkar, M., Brunner, R., Guroso, A., Krawetz, N., y otros. (1999). NAMD2: Greater scalability for parallel molecular dynamics. *J. Comp. Phys.*, *151*, 283-312.
- Kaufmann, S. H. (2008). Tuberculosis Deadly Combination. *Nature*, *453*, 295-296.
- Knaust, A., Weber, M. V., Hammerschmidt, S., Bergmann, S., Frosch, M., & Kurzai, O. (2007). Cytosolic proteins contribute to surface plasminogen recruitment of *Neisseria meningitidis*. *Journal of Bacteriology*, *189* (8), 3246-3255.
- Korhonen, T. K., Lahteenmaki, K., Kukkonen, M., Pouttu, R., Hynonen, U., Savolainen, K., y otros. (1997). Plasminogen receptors turning *Salmonella* and *Escherichia coli* into proteolytic organisms. *Adv Exp Med Biol*, *412*, 185-92.



- Kuusela, P., & Saksela, O. (1990). Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*, increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. *Eur. J. Biochem* , 193, 759-765.
- Kuusela, P., Ullberg, M., Saksela, O., & Kronvall, G. (1992). Tissue-type plasminogen activator-mediated activation of plasminogen on the surface of group A, C, and G streptococci. *Infect. Immun* , 60, 196-201.
- Lähteenmäki, K., Edelman, S., & Korhonen, T. K. (2005). Bacterial metastasis: the host plasminogen system in bacterial invasion. *Trends in Microbiology* , 13 (2), 79-85.
- Lähteenmäki, K., Kuusela, P., & Korhonen, T. K. (2001). Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Micro. Reviews* , 25, 531-552.
- Lähteenmäki, K., Virkola, R., Sarén, A., Emödy, L., & Korhonen, T. K. (1998). Expression of plasminogen activator Pla of *Yersinia pestis* enhances bacterial attachment to mammalian extracellular matrix. *Infect. Immun* , 66, 5755-5762.
- Lähteenmäki, K., Westerlund, B., Kuusela, P., & Korhonen, T. (1993). Immobilization of plasminogen on *Escherichia coli* flagella. *FEMS Microb. Letters* , 106, 309-314.
- Leemans, J. C., Juffermans, N. P., Florquin, S., van Rooijen, N., Vervoordeldonk, M. J., Verbon, A., y otros. (2001). Depletion of alveolar macrophages exerts protective effects in pulmonary tuberculosis in mice. *J. Immunol.* , 166, 4604.
- Levinson, W., & Jawetz, E. (2000). *Medical Microbiology and Immunology: examination and board review* (6th edition ed.). USA: McGraw-Hill.
- Li, Z., Ploplis, V. A., French, E. L., & Boyle, M. D. (1999). Interaction between group A streptococci and the plasmin(ogen) system promotes virulence in a mouse skin infection model. *J Infect Dis* , 179, 907-914.
- Lijnen, H. R. (2001). Elements of the fibrinolytic system. *Annals New York Academy of Sciences* , 936, 226-236.
- Lijnen, H. R., & Collen, D. (1999). Matrix Metalloproteinase System Deficiencies and Matrix Degradation. *Thrombosis and Haemostasis* , 82 (2), 837-845.
- Ljungh, A. (2000). *Helicobacter pylori* interactions with plasminogen. *Methods* , 21 (2), 151-7.
- Lottenberg, R., Broder, C. C., Boyle, M. D., Kain, S. J., Schroeder, B. L., & Curtis, R. (1992). Cloning, sequence analysis, and expression in *Escherichia coli* of a streptococcal plasmin receptor. *J Bacteriol* , 174, 5204-5210.



- Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., & Boyle, M. D. (1994). Capturing host plasmin(ogen): a common mechanism for invasive pathogens? *Trends Microbiol*, 2, 20-24.
- Malen, H., Berven, F. S., Fladmark, K. E., & Wiker, H. G. (2007). Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics*, 7, 1702-1718.
- Matrixscience. (s.f.). Obtenido de <http://www.matrixscience.com>
- Mazar, A. P. (2008). Urokinase Plasminogen Activator Receptor Choreographs Multiple Ligand Interactions: Implications for Tumor Progression and Therapy. *Clin Cancer Res*, 14 (18), 5649-55.
- Mazzieri, R., & Blasi, F. (2005). The urokinase receptor and the regulation of cell proliferation. *Thromb Haemost*, 93, 641-6.
- Miles, L. A., & Plow, E. F. (1987). Receptor mediated binding of the fibrinolytic components, plasminogen and urokinase, to peripheral blood cells. *Thromb Haemost*, 58 (3), 936-942.
- Miles, L. L., Dahlberg, C. M., Plescia, J., Felez, J., & Kato, K. (1991). Role of cell-surface lysines in plasminogen binding to cells: identification of alpha-enolase as a candidate plasminogen receptor. *Biochemistry*, 30 (6), 1682-1691.
- Mölkänen, T., Tyynelä, J., Helin, J., Kalkkinen, N., & Kuusela, P. (2002). Enhanced activation of bound plasminogen on *Staphylococcus aureus* by staphylokinase. *FEBS letters*, 512, 72-78.
- Mondino, A., & Blasi, F. (2004). uPA and uPAR in fibrinolysis, immunity and pathology. *Trends Immunol*, 25 (8), 450-5.
- Monroy, V., Amador, A., Ruiz, B., Espinoza-Cueto, P., Xolalpa, W., Mancilla, R., y otros. (2000). Binding and activation of human plasminogen by *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect. Immun.*, 68 (7), 4327-4330.
- Myöhänen, H., & Vaheri, A. (2004). Regulation and interactions in the activation of cell-associated plasminogen. *Cell. Mol. Life Sci.*, 61, 2840-2858.
- NACCESS, version 2.1.1. . (1996). *Department of Biochemistry and Molecular Biology, University College London*. Obtenido de <http://www.bioinf.manchester.ac.uk/naccess/>
- Palomino, J. C., Leão, S. C., & Ritacco, V. (2007). Tuberculosis 2007: From basic science to patient care.
- Pancholi, V., & Chhatwal, G. S. (2003). Housekeeping enzymes as virulent factors for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*, 293, 391-401.
- Pancholi, V., & Fischetti, V. A. (1998). a-enolase, a novel strong plasmin (ogen) binding protein on the surface of pathogenic streptococci. *J Biol Chem*, 273, 14503-14515.



- Parry, M. A., Zhang, X. C., & Bode, W. (2000). Molecular mechanisms of plasminogen activation: bacterial cofactors provide clues. *TIBS*, *25*, 53-59.
- Peake, P., Gooley, A., & Britton, W. J. (1993). Mechanism of Interaction of the 85B Secreted Protein of *Mycobacterium bovis* with Fibronectin. *Infection and Immunity*, *61* (11), 4828-4834.
- Plow, E. F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L. A., & Hoover-Plow, J. L. (1995). The cell biology of the plasminogen system. *The FASEB journal*, *9*, 939-945.
- Ponting, C. P., Marshall, J. M., & Cederholm-Williams, S. A. (1992). Plasminogen: a structural review. *Blood Coagul. Fibrin.*, *3*, 605-614.
- Puech, V., Guillhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L. Y., Gicquel, B., y otros. (2002). Evidence for a partial redundancy of the fibronectin binding proteins for the transfer of mycoloyl residues onto the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*, *44* (4), 1109-1122.
- Quiding-Järbrink, M., Smith, D. A., & Bancroft, G. J. (2001). Production of Matrix Metalloproteinases in Response to Mycobacterial Infection. *Infect. Immun.*, *69* (9), 5661-5670.
- Raum, D., Marcus, D., Alper, C. A., Levey, R., Taylor, P. D., & Starzl, T. E. (1980). Synthesis of human plasminogen by the liver. *Science*, *208* (4447), 1036-7.
- Raynaud C, C., Etienne G, G., Peyron, P., Lanéelle, M. A., & Daffé, M. (1998). Extracellular enzyme activities potentially involved in the pathogenicity of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, *144*, 577-578.
- Reddy, K. N., & Markus, G. (1972). Mechanism of activation of human plasminogen by streptokinase. Presence of active center in streptokinase plasminogen complex. *J Biol Chem*, *247* (6), 1683-91.
- Rivera-Marrero, C. A., Schuyler, W., Roser, S., & Roman, J. (2000). Induction of MMP-9 mediated gelatinolytic activity in human monocytic cells by cell wall components of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog*, *29* (4), 231-44.
- Rosendkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M., Moertz, E., & P, A. (2000). Towards the proteome of *Mycobacterium tuberculosis*. *Electrophoresis*, *21*, 3740-3756.
- Rosenkrands, I., Weldingh, K., Jacobsen, S., Hansen, C. V., Florio, W., Gianetri, I., y otros. (2000). Mapping and identification of *Mycobacterium tuberculosis* proteins by two-dimensional gel electrophoresis, microsequencing and immunodetection. *Electrophoresis*, *21*, 935-948.



- Rubin, E. H., & Rubin, M. (1948). *Diseases of the chest, with emphasis on X-ray diagnosis*. W.B. Saunders Company.
- Russell, D. G. (2001). *Mycobacterium tuberculosis*: Here today, and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biol*, 2, 1-9.
- Russell, D. G. (2007). Who puts the tubercle in tuberculosis? *Nat Rev Microbiol*, 5 (1), 39-47.
- Ryckaert, J. P., Ciccotti, G., & Berendsen, H. J. (1977). Numerical integration of the cartesian equations of motion of a system with constraints: Molecular dynamics of n-alkanes. *J. Comput. Phys*, 23, 327–341.
- Sanderson-Smith, M. L., Walker, M. J., & Ranson, M. (2006). The Maintenance of High Affinity Plasminogen Binding by Group A Streptococcal Plasminogen-binding M-like Protein Is Mediated by Arginine and Histidine Residues within the a1 and a2 Repeat Domains. *The Journal Of Biological Chemistry*, 281 (36), 25965–2.
- Sato, J., Schorey, J., Ploplis, V. A., Haalboom, E., Krahule, L., & Castellino, F. J. (2003). The fibrinolytic system in dissemination and matrix protein deposition during a mycobacterium infection. *Am J Pathol.*, 163 (2), 517-31.
- Saunders, B. M., Frank, A. A., & Orme, I. M. (1999). Granuloma formation is required to contain bacillus growth and delay mortality in mice chronically infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Immunology*, 98, 324–328.
- Schouten, M., Wiersinga, W. J., Levi, M., & van der Poll, T. (2008). Inflammation, endothelium, and coagulation in sepsis. *J Leukoc Biol*, 83 (3), 536-45.
- Schuyler, M., & Forman, W. (1984). Alveolar macrophage plasminogen activator. *Exp Lung Res*, 6 (2), 159-69.
- Sjöström, I., Gröndahl, H., Falk, G., Kronvall, G., & Ullberg, M. (1997). Purification and characterization of a plasminogen-binding protein from *Haemophilus influenzae*. Sequence determination reveals identity with aspartase. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1324, 182-190.
- Sodeinde, O. A., Subrahmanyam, Y. V., Stark, K., Quan, T., Bao, Y., & Goguen, J. D. (1992). A surface protease and the invasive character of plague. *Science*, 258, 1004-1007.
- Sun, H. (2005). The Interaction Between Pathogens and the Host Coagulation System. *Physiology*, 21, 281-288.
- Syrovets, T., & Simmet, T. (2004). Novel aspects and new roles for the serine protease plasmin. *Cellular and molecular life sciences*, 61, 873-885.



- Tarshis, M., Moraq, B., & Mayer, M. (1993). *Mycoplasma* cells stimulate in vitro activation of plasminogen by purified tissue-type plasminogen activator. *FEMS Microbiol Lett* , 106 (2), 201-204.
- Taylor, J. L., Hattle, J. M., Dreitz, S. A., Troutd, J. M., Izzo, L. S., Basaraba, R. J., y otros. (2006). Role for Matrix Metalloproteinase 9 in Granuloma Formation during Pulmonary *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Infect and Immun* , 74 (11), 6135-6144.
- Tuberculosis Facts*. (2008 ). Obtenido de [http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet\\_april08.pdf](http://www.who.int/tb/publications/2008/factsheet_april08.pdf)
- Turner, O. C., Basaraba, R. J., & Orme, I. M. (2003). Immunopathogenesis of Pulmonary Granulomas in the Guinea Pig after Infection with *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* , 71 (2), 864–871.
- Ullberg, M., Kronvall, G., Karlsson, I., & Wiman, B. (1990). Receptors for human plasminogen on gram-negative bacteria. *Infect. Immun* , 58 (1), 21-5.
- Ullberg, M., Kuusela, P., Kristiansen, B. E., & Kronvall, G. J. (1992). Binding of plasminogen to *Neisseria meningitidis* and *Neisseria gonorrhoeae* and formation of surface-associated plasmin. *Infect. Dis* , 166 (6), 1329-34.
- Vidal Pessolani, M. C., Marques, M. A., Reddy, V. M., Loch, C., & Menozzi, F. D. (2003). Systemic dissemination tuberculosis and leprosy: do mycobacterial adhesins play a role? *Microbes Infect* , 5 (7), 677-84.
- WHO, r. (2009). *13th Annual Report on Global tuberculosis control : epidemiology, strategy, financing*.
- Wiker, H. G., & Harboe, M. (1992). The Antigen 85 Complex: a Major Secretion Product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiological Reviews* , 56 (4), 648-661.
- Winram, S. B., & Lottenberg, R. (1998). Site-directed mutagenesis of streptococcal plasmin receptor protein (Plr) identifies the C-terminal Lys334 as essential for plasmin binding, but mutation of the plr gen does not reduce plasmin binding to group A streptococci. *Microbiology* , 144, 2025-2035.
- World Health Organization. (s.f.). *Global report 2009*. Obtenido de [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2009/en/index.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2009/en/index.html)
- Yavlovich, A., Higazi, A. A., & Rottem, S. (2001). Plasminogen binding and activation by *Mycoplasma fermentans*. *Infection and Immunity* , 69 (4), 1977-1982.



# Anexo

## Determinación de concentración de proteínas Método de Lowry modificado en placa de microtitulación.

### *Soluciones:*

#### Solución A

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	2.0 %
NaOH	0.4 %
Tartrato de Na K	0.16 %
SDS	1.0 %

#### Solución B

CuSO <sub>4</sub>	2.0 %
-------------------	-------

#### Reactivo de Folin 2N

(Preparar sol. 1N antes de adicionar)

#### Solución de trabajo

Solución A	99 %
solución B	1 %

(preparar antes de adicionar)

### *Procedimiento:*

- Adicionar a cada pozo 50 µl de H<sub>2</sub>O
- Adicionar 5 µl de la muestra o del standard
- Adicionar 150 µl de la solución de trabajo
- Agitar fuertemente durante al menos 20 seg
- Incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 10 min
- Adicionar 15 µl del reactivo de Folin 1N
- Agitar fuertemente
- Incubar en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 min
- Leer D.O. a 660 nm o 620 nm



## Precipitación de Proteínas TCA-DOC/Acetona

1. A un volumen de solución de proteína adicionar 1/100 de DOC (detergente Deoxicolato de Na) al 2 %, concentración final 0.02 %. Ejemplo: Para 100µl de muestra adicionar 1µl de DOC 2 %.
2. Se mezcla en vórtex y se deja a temperatura ambiente (TA) por al menos 15 min.
3. Se añade TCA 100 % hasta alcanzar una concentración del 10 %. Ejemplo: Para 100 µl de muestra adicionar 10 µl de TCA.
4. Se mezcla en vórtex y se deja a TA por al menos 1 h.
5. Se centrifuga por 10 min a 13,500 rpm 4°C.
6. Se descarta el sobrenadante por decantación adsorbiendo en papel hasta secar.
7. Se añaden 200 µl de acetona previamente enfriada a -20°C.
8. Se mezcla y mantiene en hielo por 15 min.
9. Se centrifuga a 4°C por 10 min a 13,500 rpm.
10. Se remueve el sobrenadante y se deja secar el pellet por no más de 5 min para facilitar la resuspensión.

Para preparar CHAPS 2% en buffer de fosfatos 10 mM. Se tiene un stock 10X de CHAPS [0.2 g/ml]; diluir 1:10 ejemplo: para 5 ml de fosfatos añadir 500 µl de CHAPS 10X.



## Preparación de soluciones stock y buffers para 2D-SDS-PAGE

### I. Solución Stock de Rehidratación sin Buffer IPG.

- 1) Disolver 12 g de Urea en 15 ml de H<sub>2</sub>O dd (el volumen se incrementará casi a 25 ml).
- 2) Disolver 0.5 g de CHAPS en la solución de urea (concentración final 2%).
- 3) Adicionar 0.5 – 1.0 mg de Azul de bromofenol o 50 µl de la sol stock
- 4) Ajustar el volumen con H<sub>2</sub>O dd a 25 ml si es necesario.
- 5) Hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.
- 6) El buffer IPG y el DTT se adicionan antes de rehidratar la tira.

(Nota: las soluciones de urea nunca deben calentarse a más de 30 °C ni dejarse a temperatura ambiente (T.A.) por tiempos prolongados, esto para evitar la formación de isocianato el cual puede carbamilar las proteínas modificando el pI de las mismas.)

### II. Solución Stock de Azul de Bromofenol.

- 7) Disolver 60 mg de Tris en 10 ml de H<sub>2</sub>O destilada (50 mM).
- 8) Disolver 100 mg de Azul de Bromofenol (1%) en Tris.

### III. Buffer de Equilibrio con SDS

- 9) Preparar Tris 50 mM en 100 ml de H<sub>2</sub>O destilada ajustar a pH 8.8
- 10) Disolver 72.07 g de urea en Tris (6M)
- 11) Disolver 4 g de SDS (2% w/v)
- 12) Adicionar 60 ml de Glicerol (30% v/v)
- 13) Adicionar 400 µl de la sol stock de Azul de Bromofenol (0.002% w/v)
- 14) Aforar a 200 ml con H<sub>2</sub>O destilada
- 15) Hacer alícuotas y almacenar a -20 °C.
- 16) Antes de equilibrar la tira se le adiciona DTT (1%)



## Rehidratación de tiras IPG

### IV. Solución de Rehidratación:

- 8 M urea
  - 0.5% o 2.0% (w/v) CHAPS
  - 0.002% Azul de Bromofenol
  - 0.5% o 2.0% (v/v) Buffer IPG o Pharmalyte
  - 0.2% (w/v) DTT
- Solución stock de rehidratación

- 1) Prepare la solución stock de rehidratación como se mencionó anteriormente.
- 2) Justo antes de usar, descongele lentamente una alícuota.
- 3) Agregue la cantidad apropiada de buffer IPG o Pharmalyte (Para 2.5 ml de sol stock 50  $\mu$ l de buffer IPG (2%)).
- 4) Adicione 7 mg de DTT a 2.5 ml de sol stock y la muestra (si la muestra es cargada durante la rehidratación).
- 5) Prepare el soporte de rehidratación Immobiline DryStrip Reswelling Tray (previamente lavado con detergente y completamente seco) sobre una superficie limpia y asegúrese de nivelarlo.

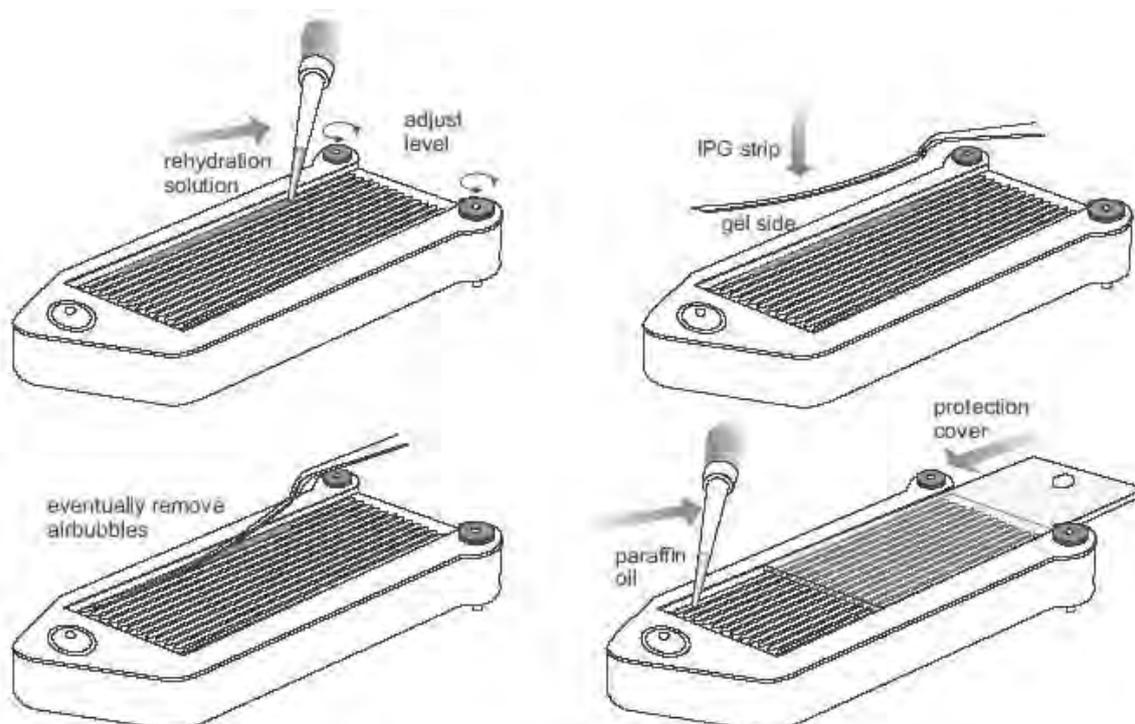


Fig. 2: Rehydration of IPG strips in individual grooves in the reswelling tray.

- 6) Aplique la solución de rehidratación pipeteando el volumen apropiado en cada surco para cada tira (ejemplo 250  $\mu\text{l}$  para tiras de 13 cm). Extienda la solución cuidadosamente evitando la formación de burbujas.

<b>IPG strip length (cm)</b>	<b>Total volume per strip* (<math>\mu\text{l}</math>)</b>
7 cm	125 $\mu\text{l}$
11 cm	200 $\mu\text{l}$
13 cm	250 $\mu\text{l}$
18 cm	340 $\mu\text{l}$
24 cm	450 $\mu\text{l}$

*\*Including sample, if applied.*

- 7) Previamente atemperadas las tiras IPG, remueva la cubierta protectora empezando por el extremo ácido (con reserva que se indique otro), el lado básico generalmente es más delicado. Posicione la tira colocando el lado del gel sobre la solución de rehidratación en el canal correspondiente. Tenga cuidado de no dejar burbujas entre el gel y la solución.
- 8) Cubra cada tira IPG con 2 ml de aceite mineral para minimizar la evaporación y la cristalización de la urea.
- 9) Permita que las tiras se hidraten a temperatura ambiente (TA) toda la noche (16 h).



## PBS

(Phosphate-Buffered Saline)

Para preparar la solución stock 10 X de PBS, se siguen las instrucciones para preparar la solución amortiguadora de fosfato (phosphate buffer) de acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbach (1) y se le adiciona la cantidad de NaCl necesaria para hacer a la solución salina.

Una solución 1 X de PBS debe tener una concentración final de:

**10 mM de fosfatos, NaCl 150 mM, pH 7.4.**

Reactivos:	P.M.
<b>Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, fosfato de sodio di-básico (anhidro)</b>	141.96
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, fosfato de sodio mono-básico (anhidro)</b>	119.99
<b>NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>O (monohidratado)</b>	137.99
<b>NaCl</b>	58.0

### Procedimiento:

1. Se preparan soluciones 1M de los fosfatos:
  - a. Monobásico (monohidratado). [138 g/L]. Para 500 ml, pesar 69 g y dissolver en H<sub>2</sub>O desionizada (MilliQ).
  - b. Dibásico (anhidro). [142 g/L]. Para 500 ml, pesar 71 g dissolver en H<sub>2</sub>O desionizada.
2. Para preparar 1 L de PBS 10 X, se ajustan 100 ml de las soluciones 1M a pH de 7.4 siguiendo la relación de Henderson-Hasselbach mostrada en la tabla anexa (1):
  - a. 77.4 ml de dibásico + 22.6 ml de monobásico = 100 ml
  - b. Se añaden 800 ml de H<sub>2</sub>O desionizada, y se le disuelven 87.6 g de NaCl.
  - c. Aforar a 1 L.
3. Para confirmar el pH, se toman 10 ml de la solución 10 X y se llevan a 100 ml con agua bidestilada, medir pH en el potenciómetro.
  - a. Nota 1: El pH de la solución 10 X es menor de 7.4 aproximadamente 6.8, sin embargo al diluir a 1 X la solución deberá quedar en 7.4.
  - b. Nota 2: Si el pH queda por debajo del deseado, se repite el paso 2 adicionando más dibásico y reduciendo el monobásico, ejemplo: 80 ml (di) + 20 ml (mono). Mezclar ambos litros y determinar pH de 1 X. Ajustar de esta manera el pH evita usar NaOH o HCl y aumentar la concentración salina.
4. Una vez preparada la solución stock, se filtra a través de una membrana de 1.2 µm y se esteriliza por autoclave.

#### Referencias

1. Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, . 2nd ed. Cold Sping Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3, pág. appendix B21 and B.12.



**Phosphate Buffers****TABLE B.10 Preparation of 0.1 M Potassium Phosphate Buffer at 25°C**

pH	Volume of 1 M $K_2HPO_4$ (ml)	Volume of 1 M $KH_2PO_4$ (ml)
5.8	8.5	91.5
6.0	13.2	86.8
6.2	19.2	80.8
6.4	27.8	72.2
6.6	38.1	61.9
6.8	49.7	50.3
7.0	61.5	38.5
7.2	71.7	28.3
7.4	80.2	19.8
7.6	86.6	13.4
7.8	90.8	9.2
8.0	94.0	6.0

Data from Green (1933).

**TABLE B.11 Preparation of 0.1 M Sodium Phosphate Buffer at 25°C**

pH	Volume of 1 M $Na_2HPO_4$ (ml)	Volume of 1 M $NaH_2PO_4$ (ml)
5.8	7.9	92.1
6.0	12.0	88.0
6.2	17.8	82.2
6.4	25.5	74.5
6.6	35.2	64.8
6.8	46.3	53.7
7.0	57.7	42.3
7.2	68.4	31.6
7.4	77.4	22.6
7.6	84.5	15.5
7.8	89.6	10.4
8.0	93.2	6.8

Data from ISCO (1982).

Dilute the combined 1 M stock solution to 1000 ml with distilled  $H_2O$ . pH is calculated according to the Henderson-Hasselbalch equation:

$$pH = pK' + \log \left[ \frac{(\text{proton acceptor})}{\text{proton donor}} \right]$$

where  $pK' = 6.86$  at  $25^\circ C$ .

**Protocolo alternativo de preparación de PBS**

Phosphate-buffered saline (PBS)

Dissolve 8 g of NaCl, 0.2 g of KCl, 1.44 g of  $Na_2HPO_4$ , and 0.24 g of  $KH_2PO_4$  in 800 ml of distilled  $H_2O$ . Adjust the pH to 7.4 with HCl. Add  $H_2O$  to 1 liter. Dispense the solution into aliquots and sterilize them by autoclaving for 20 minutes at 15 lb/sq. in. on liquid cycle. Store at room temperature.

**Referencias.** Sambrook, J., Fritsch, E.F. y Maniatis, T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor : Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989, Vol. 3, pág. appendix B21 and B.12.



## SDS-PAGE

<b>Mini gel (10 x 8 cm)</b>										
<b>Gel Separador 0.75 mm</b>										
Component	8%		10%		12%		13%		15%	
# geles	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Resolving gel 4X buffer pH 8.8 (ml)	1.25	2.50	1.25	2.50	1.25	2.50	1.25	2.50	1.25	2.50
Water (ml)	2.40	4.80	2.08	4.17	1.75	3.50	1.58	3.17	1.25	2.50
Acrylamide	1.33	2.67	1.67	3.33	2.00	4.00	2.17	4.33	2.50	5.00
10 % APS ( $\mu$ l)	25	50.0	25	50.0	50	100.0	50	100.0	50	100.0
TEMED ( $\mu$ l)	2.5	5.0	2.5	5.0	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	10.0
Vol Total (ml)	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	10.0	5.0	10.0
<b>Gel Separador 1.5 mm</b>										
Component	8%		10%		12%		13%		15%	
# geles	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
Resolving gel 4X buffer pH 8.8 (ml)	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0	2.5	5.0
Water (ml)	4.8	9.6	4.2	8.3	3.5	7.0	3.2	6.3	2.5	5.0
Acrylamide	2.7	5.3	3.3	6.7	4.0	8.0	4.3	8.7	5.0	10.0
10 % APS ( $\mu$ l)	50.0	100.0	50.0	100.0	100.0	200.0	100.0	200.0	100.0	200.0
TEMED ( $\mu$ l)	5.0	10.0	5.0	10.0	10.0	20.0	10.0	20.0	10.0	20.0
Vol Total (ml)	10.0	19.9	10.0	20.0	10.0	20.0	10.0	20.0	10.0	20.0
<b>Gel Concentrador</b>										
Component	3%		4.5%		3%		4.5%			
# geles (grosor mm)	1 (0.75)	2 (0.75)	1 (0.75)	2 (0.75)	2 (1.5)	4 (1.5)	2 (1.5)	4 (1.5)		
Stacking gel 4X buffer pH 6.8 (ml)	0.313	0.625	0.313	0.625	1.25	2.5	1.25	2.5		
Water (ml)	0.813	1.625	0.750	1.5	3.25	6.5	3.0	6.0		
Acrylamide	0.125	0.250	0.188	0.375	0.5	1.0	0.75	1.5		
10 % APS ( $\mu$ l)	25	50	25	50	100.0	200.0	100.0	200.0		
TEMED ( $\mu$ l)	2.5	5	2.5	5	10.0	20.0	10.0	20.0		
Vol Total (ml)	1.25	2.5	1.25	2.5	5.0	10.0	5.0	10.0		



# Protocolo para la purificación de plasminógeno a partir de plasma humano

(Basado en D. G. Deutsch and E. T. Mertz, Science 170, 1095 (1970)

y modificado de acuerdo a los materiales y métodos disponibles en nuestro laboratorio, Enero 2007)

## 1. Preparación de plasma.

- a. Descongelar plasma a temp. amb. (TA)
- b. Diluirlo 1:1 con agua estéril (opcional)
- c. Después de ser descongelado y antes de centrifugar, el plasma puede ser suplementado con los siguientes inhibidores (de acuerdo a Inglés-Cano E., INSERM U460):
  - 2mM EDTA
  - 2mM PMSF
  - 100 KIU de Trasylol/ml
  - 1µM PPACK
  - 4mM Benzamidina
  - 10µM p-nitrophenil-p-guanidinobenzoate (no indispensable)
- d. Centrifugar a alta velocidad por 15 min (20,000 a 27,000 x g a 4°C) para remover material insoluble.
- e. Filtrar para remover el material lipídico que se acumula en la superficie después de centrifugar (usar papel filtro estriado).

## 2. Cromatografía de afinidad.

- a. Equilibrar columna de Lisina-Sefarosa 4B en 20 o 100 mM de buffer fosfato de sodio pH 7.4 suplementado con 2-3 mM EDTA. (**Nota:** La concentración de lisina acoplada es de 4-7 mmoles/ml de gel hidratado. La capacidad de unión para plasminogeno humano es de aproximadamente 0.6 mg/ml de gel hidratado, *amersham pharmacia biotech*).

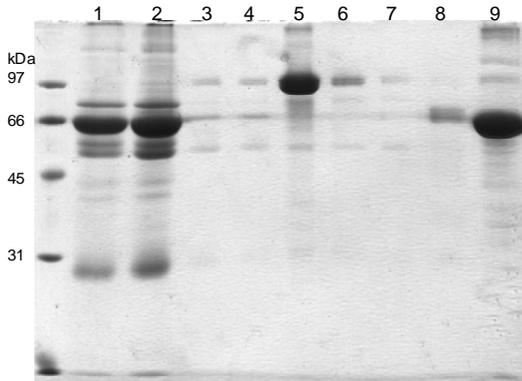
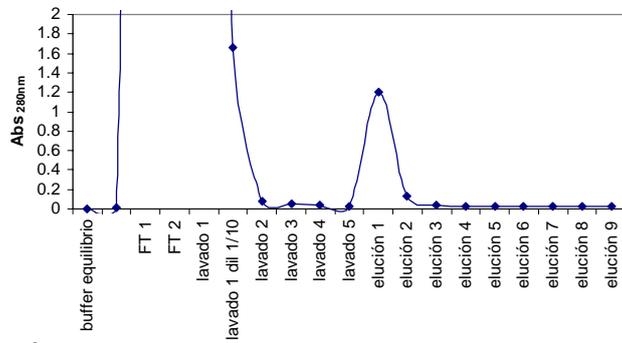
Si se usa 20 mM de fosfato de Na, (de acuerdo a Inglés-Cano E., INSERM U460) adicionar:

  - 0.5 M de NaCl
  - Trasylol 10 KIU/ml
  - 2 mM EDTA
  - 0.01 % azida de Na
- b. Pasar el plasma a través de la columna (300-400 ml de plasma para 50 ml de gel) a 40-75 ml/hr
- c. Lavar la columna con 0.3 M de fosfato de Na pH 7.4 a 175 ml/hr o hasta que la absorbancia a 280nm sea menor a 0.05



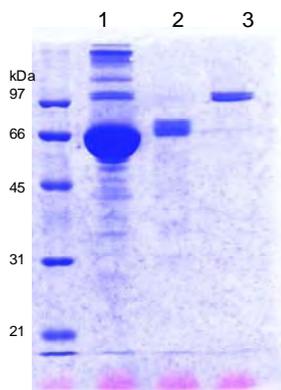


Purificación de Plg a partir de plasma humano

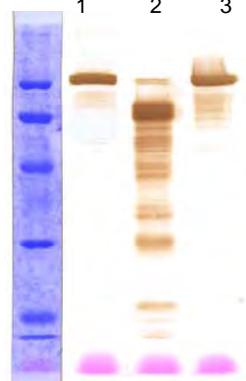


1. FT diluido 1/100
2. Lavado 1 diluido 1/10
3. Lavado 2
4. Lavado 3
5. Elución 1
6. Elución 2
7. Elución 3
8. Plg purificado almacenado 4°C
9. Plg comercial

Plasminógeno purificado

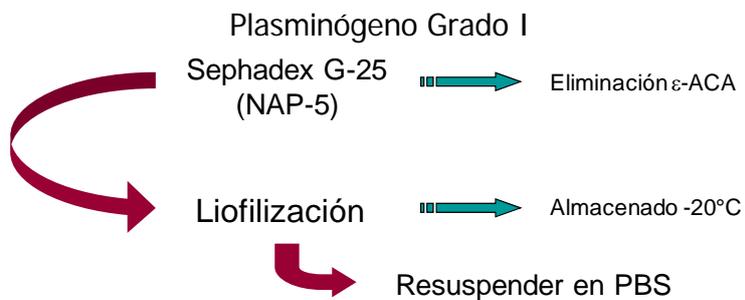


Azul de Coomassie



Anti Plg

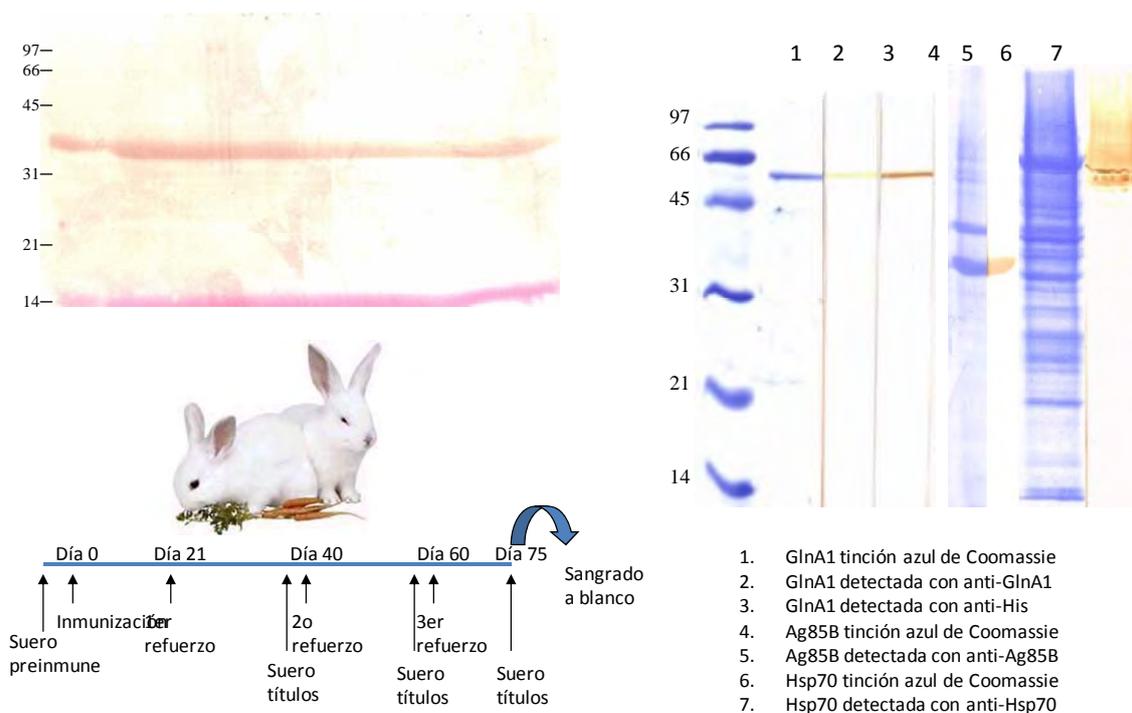
1. Plg comercial
2. Plg purificado almacenado
3. Plg recién purificado



## Producción de anticuerpos policlonales en conejo

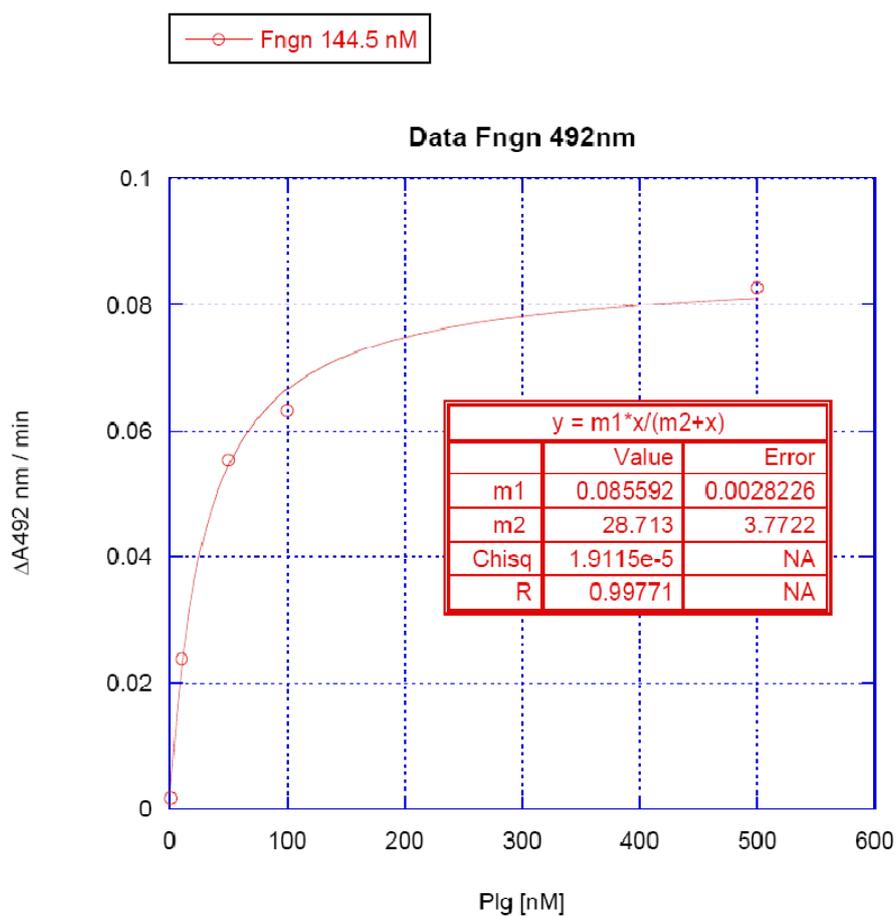
1. Las proteínas recombinantes se separan en geles preparativos SDS-PAGE. Aproximadamente se cargan 100 µg de proteína en todo el pozo. El gel con la proteína se transfiere a una membrana de nitrocelulosa.
2. La membrana se tiñe con Rojo de Ponceu y se destiñe con agua bidestilada.
3. Se corta con una hoja de bisturí la banda correspondiente a la proteína recombinante.
4. Se tritura con el mismo bisturí en fragmentos muy pequeños.
5. Los fragmentos de nitrocelulosa con proteína se disuelven en 1 ml de DMSO.
6. Con una solución amortiguadora de carbonatos se pulveriza la nitrocelulosa, adicionando gota a gota y agitando en vortex. La solución deberá verse como una suspensión con la nitrocelulosa en partículas muy finas.
7. La muestra es centrifugada y resuspendida en PBS estéril.
8. La muestra es mezclada y emulsificada con adyuvante incompleto de Freud, y con esta emulsión se inoculó un conejo vía subcutánea. Se prepararon dos muestras para inmunizar dos conejos por cada proteína recombinante.
9. El esquema de inmunización se siguió como se muestra abajo. A los 15 días aproximadamente después de la inmunización, se tomaba una muestra de sangre para obtener el suero y medir los títulos de anticuerpo generados contra la proteína.

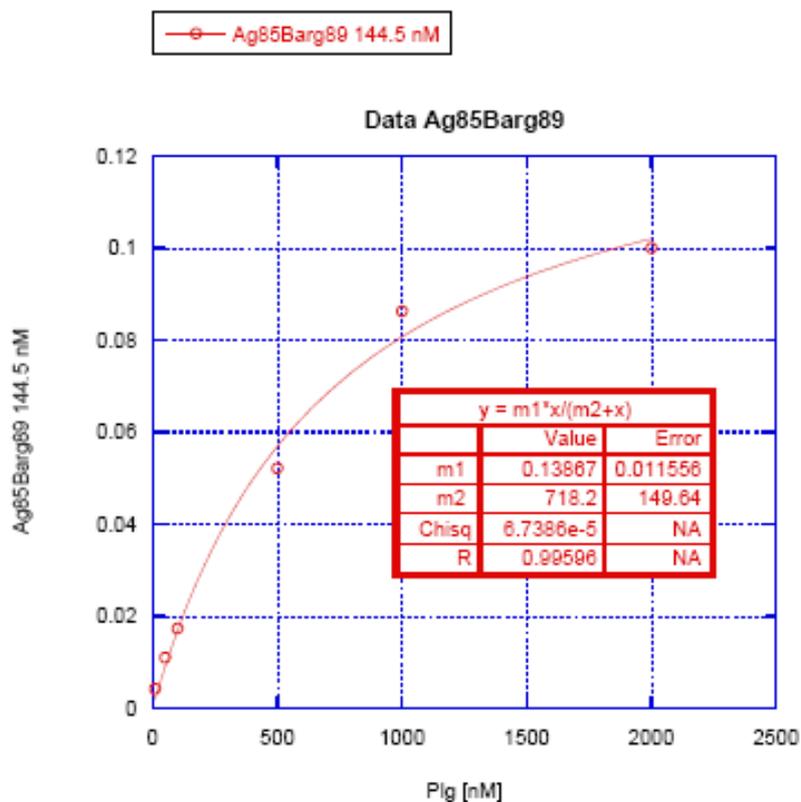
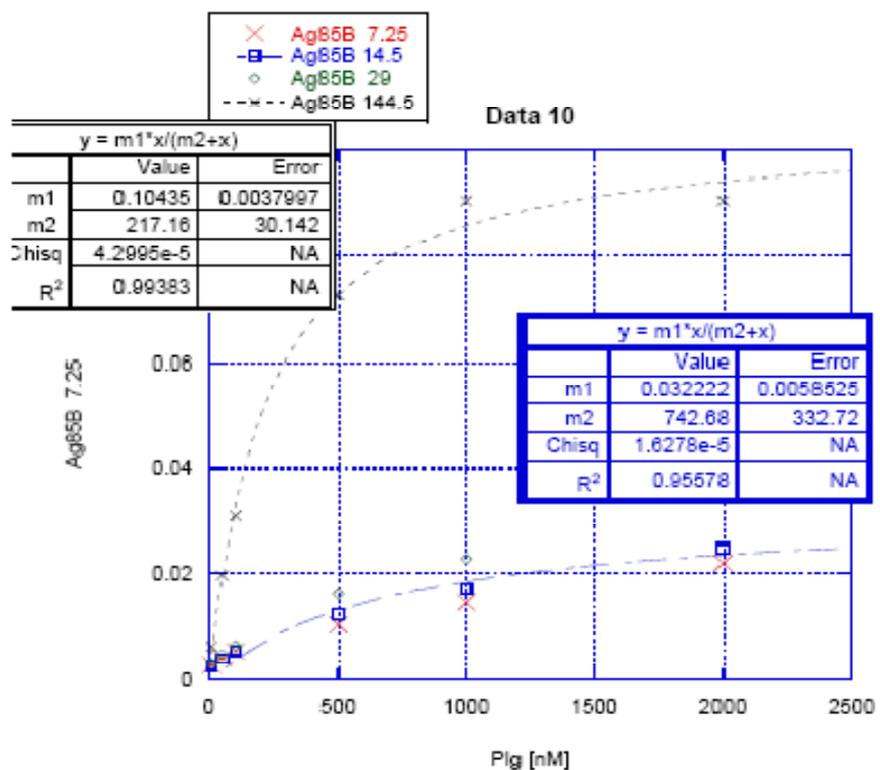
### Producción de anticuerpos policlonales contra las proteínas recombinantes



# Ajuste no lineal con el programa KaleidaGraph para determinar las constantes de unión entre Ag85B y Plg

Curva de saturación con Fibrinógeno





---

# Artículo Publicado



## RESEARCH ARTICLE

# Identification of novel bacterial plasminogen-binding proteins in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis*

Wendy Xolalpa<sup>1</sup>, Antonio J. Vallecillo<sup>1</sup>, Martha Lara<sup>1</sup>, Guillermo Mendoza-Hernandez<sup>2</sup>, Marcelo Comini<sup>3\*</sup>, Ralf Spallek<sup>4</sup>, Mahavir Singh<sup>3, 4</sup> and Clara Espitia<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>2</sup> Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F., México

<sup>3</sup> German Research Center for Biotechnology, Braunschweig, Germany

<sup>4</sup> LIONEX Diagnostics & Therapeutics GmbH, Braunschweig, Germany

Binding and activation of human plasminogen (Plg) to generate the proteolytic enzyme plasmin (Plm) have been associated with the invasive potential of certain bacteria. In this work, proteomic analysis together with ligand blotting assays identified several major Plg-binding spots in *Mycobacterium tuberculosis* soluble extracts (SEs) and culture filtrate proteins. The identity of 15 different proteins was deduced by N-terminal and/or MS and corresponded to DnaK, GroES, GlnA1, Ag85 complex, Mpt51, Mpt64, PrcB, MetK, SahH, Lpd, Icl, Fba, and EF-Tu. Binding of Plg to recombinant *M. tuberculosis* DnaK, GlnA1, and Ag85B was further confirmed by ELISA and ligand blotting assays. The binding was inhibited by  $\epsilon$ -aminocaproic acid, indicating that the interaction involved lysine residues. Plg bound to recombinant mycobacterial proteins was activated to Plm by tissue-type Plg activator. In contrast with recombinant proteins, *M. tuberculosis* SE enhanced several times the Plg activation mediated by the activator. Interestingly, GlnA1 was able to bind the extracellular matrix (ECM) protein fibronectin. Together these results show that *M. tuberculosis* possesses several Plg receptors suggesting that bound Plg to bacteria surface, can be activated to Plm, endowing bacteria with the ability to break down ECM and basal membranes proteins contributing to tissue injury in tuberculosis.

Received: November 7, 2006

Revised: April 27, 2007

Accepted: May 29, 2007

**Keywords:**

2-DE / Ligand blotting / *Mycobacterium tuberculosis* / Plasminogen receptors

**Correspondence:** Dr. Clara Espitia, Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Apartado Postal 70-228 04510, México, D.F., Mexico

**E-mail:** espitia@biomedicas.unam.mx

**Fax:** +52-55-56223369

**Abbreviations:** CF, culture filtrate; ECM, extracellular matrix; Fn, plasminogen; PlgRs, plasminogen receptors; Plm, plasmin; RT, room temperature; SE, soluble extract

## 1 Introduction

Plasmin (Plm), is the major fibrinolytic enzyme formed by the activation of plasminogen (Plg) by the two serine proteases, tissue and urokinase-type Plg activators (tPA and uPA). Plm itself can directly degrade components of the

\* Current address: Centre of Biochemistry, Heidelberg University, Heidelberg, Germany

extracellular matrix (ECM) and basal membrane (BM) such as laminin and fibronectin (Fn) and indirectly is also able to activate matrix metalloproteases (MMPs) [1, 2] and elastase [3]. The binding of Plg to mammalian cells is mediated by their kringle domains, which have affinity for lysine residues [4]. Lysine-dependent binding is also characteristic of Plg capture by certain invasive bacteria including Group A, C, and G streptococci, *Staphylococcus pneumoniae*, *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Haemophilus influenzae*, *Helicobacter pylori*, and *Borrelia burgdorferi* between others [5]. Plg bound to the bacterial surface can be activated to Plm by host activators, turning bacteria into proteolytic organisms with the surface-bound Plm protected against its circulating inhibitor,  $\alpha$ 2-antiplasmin [6–9].

The nature of bacterial plasminogen receptors (PlGRs) described till now is variable, however, it is notorious that many of them are metabolic enzymes of extracellular localization, although they lack a putative signal peptide for secretion to the cell surface [10]. The filamentous surface appendages fimbriae and flagella form a major group of PlGRs in some Gram-negative bacteria, and surface-bound enzyme molecules and the fibrillar M-like protein in Gram-positive bacteria [10–12]. It is worth noticing that some pathogenic bacteria that interact with Plg are also able to bind to ECM and BM proteins; moreover, it has demonstrated that some PlGRs themselves are able to bind to those host proteins [10, 12–15]. Since binding and activation of Plg as well as the interaction of tumor cells with ECM/BM proteins are important mechanisms for metastasis [16], it has been suggested that the same mechanism is employed by invasive bacteria to disseminate and cause tissue damage, a phenomenon called “bacterial metastasis” [17].

In a previous work we demonstrated the existence of PlGRs in the human pathogen *Mycobacterium tuberculosis* [18]. The present study reveals the identity of *M. tuberculosis* Plg-binding proteins, and evaluates the faculty of Plg bound to mycobacterial receptors to be converted into Plm by the action of the mammalian Plg activator tPA.

## 2 Materials and methods

### 2.1 Bacterial strains and culture conditions

The *M. tuberculosis* H37Rv (ATCC no. 27294) reference strain is part of the bacterial culture collection of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, Mexico City. Soluble extract (SE) proteins from *M. tuberculosis* H37Rv were obtained as described elsewhere [18]. Briefly, *M. tuberculosis* H37Rv was cultured on Proskauer and Beck modified as Youman's synthetic medium for 4–6 wk. Bacilli were inactivated by incubation at 37°C by 24 h with 2% of sodium azide, resuspended in PBS buffer (10 mM phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl) and sonicated in an ice bath for 15 min with 1 min pauses between 1 min pulses at 71.25 W of ultrasonic power in a VirSonic sonicator (Virtis™). The sample was cen-

trifuged in a microfuge at 10 000  $\times$  g for 20 min to obtain a supernatant representing the SE. Culture filtrate (CF) proteins were obtained from culture medium after elimination of bacilli by filtration [19]. Proteins from supernatant were precipitated with 0.5 mg/mL of  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , pellet was resuspended in dH<sub>2</sub>O and dialyzed exhaustively against PBS. Both SE and CF proteins were quantified by a modified microplate Lowry assay and stored at –70°C until their use.

### 2.2 2-DE and SDS-PAGE

SE and CF samples were first desalted in Sephadex G25 column (GE healthcare NAP-5 column), proteins were then concentrated by ultrafiltration. SE and CF (90  $\mu$ g of each) were treated with 2-D-clean-up kit (Amersham Biosciences). Protein pellet was resuspended and adjusted to a final volume of 125  $\mu$ L in a reswelling buffer (8 M urea, 2% CHAPS 0.5% of IPG buffer pH 4–7, and 20 mM DTT), and the sample was applied on immobilized pH 4–7 linear gradient strips (7 cm, GE healthcare) for 16 h rehydration at room temperature (RT), following the manufacturer's instructions. Focusing started at 300 V (1 h), was increased to 1000 V (30 min), and finally to 5000 V (2 h) in an Ettan IPG-phor III Electrophoresis Unit (GE healthcare). After focusing, strips were equilibrated for 20 min in sample buffer (2% SDS, 50 mM Tris-HCl pH 8.8, 6 M urea, 30% glycerol, 0.002% bromophenol blue and 0.5% DTT). Strips were then overlaid onto 12% SDS-PAGE and after electrophoresis, proteins were transferred to Immobilon-P PVDF membranes (Millipore, Bedford, MA). Membranes were stained with CBB R-250 or used for ligand blotting assays.

### 2.3 Ligand blotting

Proteins from 2-DE/SDS-PAGE were transferred to PVDF membranes and incubated with 1  $\mu$ g/mL of purified human Plg (Roche) in PBS containing 0.05% Tween-20 (PBS-T) and 3% BSA for 1 h in the presence or absence of 100 mM  $\epsilon$ -aminocaproic acid (EACA; Merck) for 1 h at RT. After incubation, the membranes were rinsed with PBS-T and incubated for 30 min with rabbit anti-Plg polyclonal antibody (Dako) 1:1000. Thereafter, the membranes were incubated for 30 min with Protein A-HRP (Zymed) 1:2000. Reactivity was revealed with 3 mg/mL of 3,3-diaminobenzidine (Sigma) in PBS-T and 30% hydrogen peroxide diluted 1:1000. Control without Plg or anti-Plg was also included.

Two micrograms of *M. tuberculosis* purified recombinants DnaK, GlnA1, Ag85B, and HspX were also resolved by electrophoresis in 12% SDS-PAGE, transferred to membranes and incubated with Plg/anti-Plg (as above) or with 5  $\mu$ g/mL of Fn (Roche) in PBS-T 3% BSA for 1 h and then incubated with rabbit anti-Fn-polyclonal antibody (Dako) 1:1000 in PBS-T 3% BSA. As a control, Fn or antibody was omitted. Reactivity was developed as describe above.

## 2.4 Identification of proteins by N-terminal sequencing by Edman degradation

Following 2-DE/SDS-PAGE and electroblotting, spots from membranes stained with CBB R-250 that corresponded to those reacting with P1g were excised and subjected to N-terminal sequencing [20] which was performed in a gas phase sequencer (PE Applied Biosystems, Weiterstadt, Germany). These procedures were carried out at Analytical Instruments facility of the German Research Center for Biotechnology (GBF) Braunschweig, Germany.

## 2.5 LC/ESI-MS/MS

For protein identification using MS, selected P1g reacting protein spots were carefully excised from Coomassie stained 2-DE and prepared for LC/MS/MS. Shortly, individual protein spots were destained, reduced, carbamidomethylated, digested with trypsin, and extracted from the gel using a standard in-gel digestion procedure [21]. The volume of the extracts was reduced by evaporation in a vacuum centrifuge at RT and then adjusted to 20  $\mu$ L with 1% formic acid.

Peptide mass spectrometric analysis was performed on a 3200 QTRAP System (Applied Biosystems/MDS Sciex, Ontario, Canada), equipped with a nanoelectrospray source and a nanoflow LC system (Agilent 1100 Nano Pump, Waldbronn, Germany). Mass tuning of the hybrid triple quadrupole linear IT spectrometer was done with [Glu1]-fibrinopeptide B. Sample digests were injected on a Zorbax 300SB C18 column (3.5  $\mu$ m, 50  $\times$  0.075 mm<sup>2</sup>, Agilent) equilibrated with 2% ACN, 0.1% formic acid and separated using a linear gradient from 2 to 70% ACN, 0.1% formic acid over an 80 min period, at a flow rate of 300 nL/min. The interface heater for desolvation was held at 150°C. Spray voltage was 2.4 kV. Spectra were acquired in automated mode using information dependent acquisition (IDA). Precursor ions were selected in Q1 using the enhanced MS mode. The scan range for EMS was set at  $m/z$  400–1500 and 4000 amu/s. Selected ions were subjected to an enhanced resolution scan at the low speed of 250 amu/s over a narrow (30 amu) mass range and then to an enhanced product ion scan (MS/MS). The precursor ions were fragmented by collisionally activated dissociation (CAD) in the Q2 collision cell using rolling collision energy. The fragment ions generated were captured and mass analyzed in the Q3 linear IT. Database searching (Swiss-Prot, NCBI nr or MSDB) and protein identification were performed with MASCOT Software (<http://www.matrixscience.com>), with trypsin plus one missed cleavage, carboxyamidomethylation as a fixed modification and methionine oxidation as a variable modification and a mass tolerance of 0.5 Da for the precursor MWs and 0.3 Da on the fragment MWs. The criteria to accept a protein hit as a valid identification were: two or more tryptic peptides matches to the protein sequence and at least one peptide with  $p < 0.05$ .

## 2.6 Cloning, expression, and purification of *M. tuberculosis* glutamine synthetase A1 and antigen 85B as His-tagged proteins.

The *M. tuberculosis* Rv2220 (GlnA1) and Rv1886c (Ag85B) genes were amplified by PCR from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA with the oligonucleotide probes gln-1 Fo: 5'-CCG **CCA TAT GAC** GGA AAA GAC GCC C-3' (NdeI site in bold), gln-1 Rv: 5'-CCG **CGG ATC CTT** AAA CGT CGT AGT ACA G-3' (BamHI site in bold), Rv1886PEF: 5'-GCT **CAT ATG** TTC TCC CGG CCG GGG C-3' (NdeI site in bold), Rv1886PER: 5'-CTG **GAT CCT** TCG GTT GAT CCC GTC AGC-3' (BamHI site in bold). GlnA1 (1451 bp) and Ag85B (889 bp) PCR fragments were cloned into the pET15b vector, and the identity of the inserts was confirmed by restriction analysis and DNA sequencing. *E. coli* strain BL21 (DE3) and C41 were transformed by electroporation with pET15b-GlnA1 and pET15b-Ag85B respectively. Heterologous expression of GlnA1 and Ag85B was induced in logarithmic phase cultures by adding 1 and 0.1 mM of IPTG, respectively. Cells were harvested after 4 h, sonicated and centrifuged at 10 000  $\times$  g for 30 min at 4°C. The pellet was washed twice with 2% Triton X-100 in PBS and inclusion bodies were solubilized in lysis buffer (300 mM NaCl, 10 mM imidazol, 8 M urea, 50 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 8) overnight stirring at 4°C. The supernatant was filtered and loaded into a Ni<sup>++</sup>-NTA superflow (QIAGEN) column, previously equilibrated with lysis buffer, after washing, protein was eluted with a linear gradient of imidazol from 10 to 500 mM in lysis buffer. Eluted fractions were collected and analyzed by 12% SDS-PAGE. Fractions displaying the recombinant proteins were pooled and finally dialyzed in PBS buffer.

## 2.7 Other recombinant proteins

Mycobacterial recombinant DnaK protein was provided by Lionex (Germany) and HspX ( $\alpha$ -crystallin, Rv2031c) His-tagged recombinant protein was donated by G. Barcenas (Facultad de Estudios Superiores, Cuatitlan, UNAM). HspX was used as negative control in every assay.

## 2.8 ELISA P1g attachment assays

Polystyrene microplates (Maxisorp, Nunc) were coated with 5  $\mu$ g of SE proteins and 1  $\mu$ g of recombinant DnaK, GlnA1, Ag85B, and HspX in 100  $\mu$ L of 0.05 M carbonate-bicarbonate buffer pH 9.6 at 37°C overnight. The remaining wells were blocked by incubating with 1% BSA in PBS-T for 1 h at RT, followed by three washes with PBS-T. Wells were incubated at 37°C with 100  $\mu$ L of P1g at 0.5  $\mu$ g/mL in PBS-T 1% BSA. Following the incubation, wells were rinsed three times with PBS-T and incubated for 30 min with 100  $\mu$ L anti-P1g antibody 1:1000 in PBS-T 1% BSA. Thereafter, protein A-HRP conjugate 1:2000 in PBS-T was added and incubated for 30 min. After exhaustive rinse, peroxidase activity was revealed with 150  $\mu$ L of 4  $\mu$ g/mL o-phenylenediamine

(Sigma) in 50 mM of citrate–phosphate buffer pH 5 and hydrogen peroxide. The reaction was stopped with 50  $\mu$ L of 3N HCl and OD<sub>492 nm</sub> was measured with an automatic microtiter plate reader (ThermoLabsystem).

Plg binding was expressed as the percentage of the OD<sub>492 nm</sub> of positive control wells that were coated with 1  $\mu$ g of fibrinogen a known Plg-binding protein. In negative controls, Plg was incubated with wells coated with BSA or His-tagged HspX protein which was selected as a negative control, because this protein is very abundant in *M. tuberculosis* SE and it does not interact with Plg. The identity of HspX was confirmed by N-terminal sequence of the 2-DE spot. To assess the participation of lysine residues in Plg binding to *M. tuberculosis* proteins, incubation with Plg was also done in the presence of 100 mM of EACA.

### 2.9 Plm activity chromogenic assay with adsorbed proteins

Five micrograms of SE and 1  $\mu$ g of recombinants DnaK, GlnA1, Ag85B, and HspX were adsorbed to polystyrene microplates in carbonate–bicarbonate buffer pH 9.6 as described above. Wells were washed twice with PBS-T and blocked with PBS-T 1% BSA for 1 h at RT, then 100  $\mu$ L of 0.5  $\mu$ g/mL of Plg was allowed to interact with the proteins by incubation for 1 h at 37°C. Wells were rinsed three times and incubated with 100  $\mu$ L of 0.15  $\mu$ g/mL of tPA (Calbiochem), for 1 h at 37°C, and washed twice. Finally, 200  $\mu$ L of 0.25 mM Chromozym PL (Roche) in 50 mM Tris buffer pH 7.4 was added. OD<sub>405 nm</sub> was measured at 37°C. Negative controls and inhibition was performed as described above.

### 2.10 Plm activity chromogenic assay with proteins in solution

The assay was performed in microtiter plates (Cliniplate Lab-system). SE proteins (2.5 and 5.0  $\mu$ g) or recombinant proteins (1  $\mu$ g) were incubated with 100  $\mu$ L of Plg 12  $\mu$ g/mL for 1 h at 37°C. Then, 15  $\mu$ L of 1.5  $\mu$ g/mL of tPA and 30  $\mu$ L of 1.5 mM Chromozym were added, and the final volume was adjusted to 200  $\mu$ L with 50 mM Tris buffer pH 7.4. Negative control wells with irrelevant proteins, BSA and HspX were included. Omission of tPA and Plg were also used as negative controls. Inhibition was performed with 0–50 mM EACA. The assay was made in triplicate, and activity was detected by measuring OD<sub>405 nm</sub> immediately and then every 10 min, at 37°C.

## 3 Results

### 3.1 Ligand blotting assays of *M. tuberculosis* SEs and CF proteins resolved by 2-DE

*M. tuberculosis* SE and CF proteins previously resolved by 2-DE and blotted were evaluated for binding to Plg. Several Plg reactive spots were detected, in the range of 10–

100 kDa. Three different experiments were carried out with each extract and reactive Plg spots were considered positive only if they were represented in the three assays. In some cases, when several positive spots were present in the same molecular weight position only one number was assigned to all the spots. However, further confirmation will be necessary to define if they are isoforms or different proteins. After this analysis, 57 Plg reactive spots were identified in SE and 22 in CF (Figs. 1B and E). The coordinates of the major Plg-binding spots were matched to protein spots in the CBB stained membrane (Figs. 1A and D), but with clear differences in relative intensity. For instance, spot 57 of SE represents an abundant protein that binds Plg only weakly, whereas spot 39 is nonabundant but showed strong binding (Figs. 1A and B).

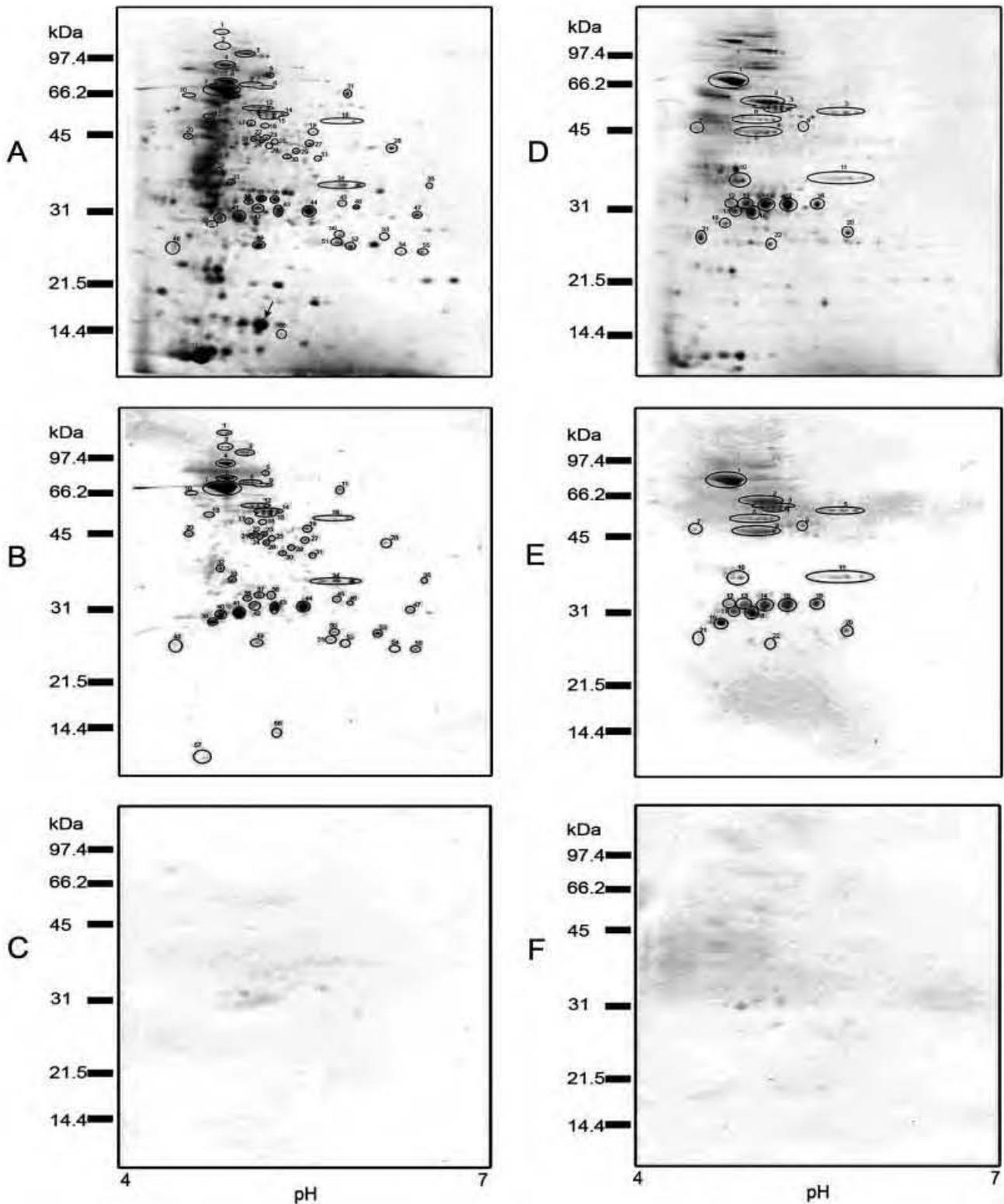
The identity of 15 proteins was revealed by MS and by N-terminal sequence from gels or membranes CBB stained (Tables 1 and 2). Two of them belong to the heat shock protein family; DnaK (Rv0350) and GroES (Rv3418c). The others were proteins with enzymatic activities; GlnA1, the glutamine synthetase A1 (Rv2220), members of Ag85 complex mycolyl transferases and related Mpt51 (Rv0129c, Rv1886c, Rv3804c, and Rv3803c), PrcB, proteasome B subunit (Rv2110c), MetK, an adenosyl methionine synthetase (Rv1392), SahH, S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase (Rv3248c), Lpd, dihydrolipoamide dehydrogenase (Rv0462), Icl, isocitrate lyase (Rv0467), EF-Tu, iron-regulated elongation factor Tu (Rv0685), Fba, fructose-bisphosphate aldolase (Rv0363c), and Mpt64 (Rv1980c) an antigenic protein (Table 1).

By comparisons of SE and CF 2-DE profiles, spots identified by MS or N-terminal in one of the extracts were localized in the other according to pI and molecular mass. All the spots identified in this work have been reported in the *M. tuberculosis* proteomic published work [22–24] and proteomic databases (<http://web.mpiib-berlin.mpg.de/cgi-bin/pdfs/2d-page/extern/index.cgi> and <http://www.ssi.dk/sw14644.asp>). Since N-terminus sequence of ten amino acids obtained for Plg-binding members of Ag85 complex did not allow to differentiate between the proteins, MS of CF spots was carried out. It was possible to identify Ag85A in spots 15 and 16, Ag85B in spot 18, and a mixture of Ag85A, B, and C in spots 13 and 14.

The C-terminal lysine of other PlgRs has been involved in Plg recognition [4], in this respect the interaction of Plg with the *M. tuberculosis* proteins was inhibited by the lysine analogue EACA (Figs. 1C and F), indicating that the binding was mediated by lysine residues. Among the identified *M. tuberculosis* PlgRs, only DnaK, PrcB, GroES, and EF-Tu present the C-terminal residue.

### 3.2 Binding of mycobacterial recombinant proteins to Plg and Fn by ligand blotting assays

Genes encoding for *M. tuberculosis* GlnA1 and Ag85B were heterologously expressed and their products purified from *E. coli* as recombinant His-tagged proteins. Binding of Plg to



**Figure 1.** Ligand blotting assay of *M. tuberculosis* SE and CF resolved by 2-DE gel. (A) SE proteins blotted to PVDF membrane stained with CBB. (B) Ligand blotting of SE proteins incubated with Plg and developed with a polyclonal anti-Plg antibody. (C) SE proteins incubated with Plg in presence of EACA. (D) CF membrane stained with CBB. (E) Ligand blotting of CF proteins incubated with Plg, and developed with a polyclonal anti-Plg antibody. (F) CF proteins incubated with Plg in presence of EACA. In circles are only protein spots that did react consistently over three experiments. The arrow in (A) indicates the position of Hsp $\alpha$ , a Plg negative reactive spot.

**Table 1.** Identification of mycobacterial Plg-binding proteins

Spot number <sup>a)</sup>	Identified protein	<i>M. tb.</i> <i>H37Rv</i> gen	Identification method <sup>c)</sup>	N-terminal sequence identification <sup>d)</sup>	Theoretical MW (kDa)	Theoretical pI
SE: 7 CF: 1	DnaK (Heat shock protein 70)	<i>Rv0350</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> ARAVGIDLGTTNSV <sup>15</sup>	66.8	4.6
SE: 12 CF: 2	GlnA1 (Glutamine synthetase A1)	<i>Rv2220</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> TEKTPDDVFK <sup>11</sup>	53.5	4.8
SE: 14 and 15 CF: 3 and 4	SahH (S-Adenosyl-L-homocysteine hydrolase)	<i>Rv3248c</i>	N-term, MS	<sup>11</sup> XLTPDVR <sup>17</sup>	54.3	4.8
SE: <u>16</u> <sup>b)</sup> CF: 5	Lpd (Dihydrolipoamide dehydrogenase)	<i>Rv0462</i>	MS		49.2	5.7
CF: 6	Icl (Isocitrate lyase)	<i>Rv0467</i>	MS		47.1	4.8
CF: 8	EF-Tu (Iron-regulated elongation factor TU)	<i>Rv0685</i>	MS		43.6	5.1
SE: 17	MetK (Methionine adenosyltransferase)	<i>Rv1392</i>	N-term	<sup>2</sup> XEKGRFLTXXEV <sup>13</sup>	43.0	4.7
SE: <u>34</u> <sup>b)</sup> CF: 11	Fba (Fructose-bisphosphate aldolase)	<i>Rv0363c</i>	MS		36.5	5.6
SE: 40,41,42, 43, and 44 CF: 13,14,15, 16, and 18	Antigen 85 complex (Mycolyl transferases, Fn-binding proteins, Ag85A, Ag85B, and Ag85C)	<i>Rv3804c</i> <i>Rv1886c</i> <i>Rv0129c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> FSRPGPLPVEY <sup>11</sup>	35.7 34.6 36.7	6.5 5.7 6.3
SE: 50 CF: 20	Mpt51 (Related Ag85 complex protein, mycolyl transferase, Fn-binding protein D)	<i>Rv3803c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> APYENLMVPS <sup>11</sup>	31.1	6.6
SE: 39 CF: <u>19</u> <sup>b)</sup>	PrcB (Proteosome beta subunit)	<i>Rv2110c</i>	N-term	<sup>58</sup> TTIVALKYPG <sup>67</sup>	30.3	4.4
SE: 48 CF: 21	Mpt64 (Immunogenic protein)	<i>Rv1980c</i>	N-term, MS	<sup>2</sup> APKTYCEELK <sup>11</sup>	24.8	4.6
SE: 57	GroES (10 KDa Chaperonin)	<i>Rv3418c</i>	N-term	<sup>2</sup> AKVNIKPLED <sup>11</sup>	10.8	4.3

a) Spot numbers correspond to those indicated in Fig. 1.

b) Underlined spot numbers correspond to those which their identity was deduced by comparison of pI and MW and spots positions in either CF or SE.

c) Identity of SE proteins was obtained by N-terminal sequence while identity of CF proteins was obtained by MS.

d) The number indicates the residues position.

recombinant putative PlgRs was tested by ligand affinity blot in the presence or absence of EACA. As shown in Fig. 2B, the recombinant proteins bound specifically to Plg, whereas the negative control, the mycobacterial His-tagged recombinant HspX protein, did not bind to Plg. To test whether the proteins were able to interact with Fn, as described for some bacterial PlgRs [10, 25], ligand affinity blot was carried out with *M. tuberculosis* recombinant PlgRs. As shown in Fig. 2C, in addition to Ag85 complex, GlnA1 was also able to bind Fn.

Binding of Plg to *M. tuberculosis* recombinant PlgRs and SE was also tested by ELISA. The SE proteins and all the recombinant proteins exhibited concentration-dependent Plg attachment (not shown). In this test, GlnA1 displayed a 42–37% higher Plg-binding capacity than SE and DnaK/Ag85B. In the presence of EACA, binding of Plg to recombinant proteins was abolished to background levels, SE showed residual reactivity due crossreaction of the anti-Plg antibody with SE components (Fig. 3).

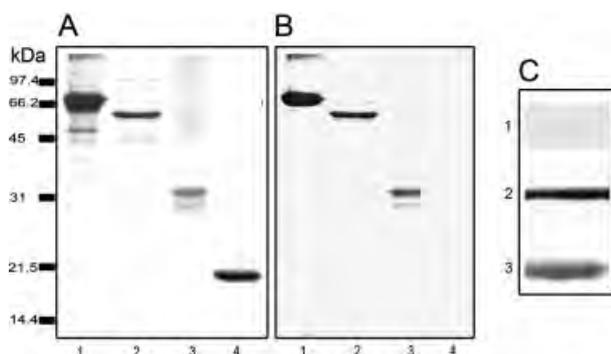
### 3.3 Plg activation assays

Plg bound to mycobacterial proteins was susceptible to be activated to Plm in the presence of tPA, while EACA completely abrogated this activation by inhibiting Plg binding to PlgRs as shown in Fig. 4. The Plm activity obtained with the different proteins was as follow: GlnA1 >> Ag85 > DnaK > SE, which suggests that the interaction of Plg with mycobacterial proteins and its activation is affected by the nature of the molecules involved.

In order to evaluate the ability of SE and recombinant proteins to enhance tPA-catalyzed Plg activation, assays were carried out in solution. The SE bound Plg caused a six-fold enhancement of Plm formation by tPA, compared to the activation seen in buffer alone. In contrast, no differences were observed with the recombinant proteins (data not shown). Enhancement of tPA-Plg activation by SE was inhibited with 50 mM EACA to background level (Fig. 5).

**Table 2.** Identification of *M. tuberculosis* CF proteins by LC/ESI-MS/MS

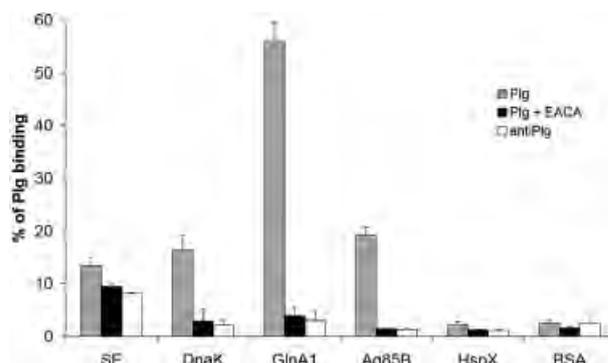
Spot no.	Protein name	NCBI accession no.	MW (kDa)	No. of matched peptides	MOWSE score	Sequence coverage (%)
1	DnaK	gi/15607491	66.790	30	757	28
2	GlnA1	gi/3261568	53.707	17	300	14
3	SahH	gi/2072715	54.461	5	178	11
4	SahH	gi/2072715	54.461	3	68	6
5	Lpd	gi/13879985	49.437	4	201	11
6	Icl	gi/12084151	47.227	3	130	10
8	EF-Tu	gi/15607825	43.566	2	45	7
11	Fba	gi/2094844	36.750	2	162	10
13	Ag85A	gi/15610940	35.835	10	452	36
13	Ag85B	gi/13096367	30.814	8	313	39
13	Ag85C	gi/9955250	31.233	8	269	25
14	Ag85A	gi/15610940	35.835	11	413	24
14	Ag85B	gi/13096367	30.814	5	205	20
14	Ag85C	gi/9955250	31.233	2	86	7
15	Ag85A	gi/15610940	35.835	23	566	39
16	Ag85A	gi/15610940	35.835	16	443	35
18	Ag85B	gi/13096367	30.814	14	346	41
20	Mpt51	gi/15843425	32.182	3	154	23
21	Mpt64	gi/15609117	24.839	26	541	36



**Figure 2.** Ligand blotting assay of mycobacterial recombinant proteins. (A) CBB stained membrane, (B) Recombinant proteins incubated with Plg and developed with a polyclonal anti-Plg antibody. Lane 1, DnaK; lane 2, GlnA1; lane 3, Ag85B; lane 4, HspX protein as negative control. (C) Recombinant proteins were incubated with Fn and developed with a polyclonal anti-Fn antibody. Lane 1, DnaK; lane 2, GlnA1; lane 3, Ag85B.

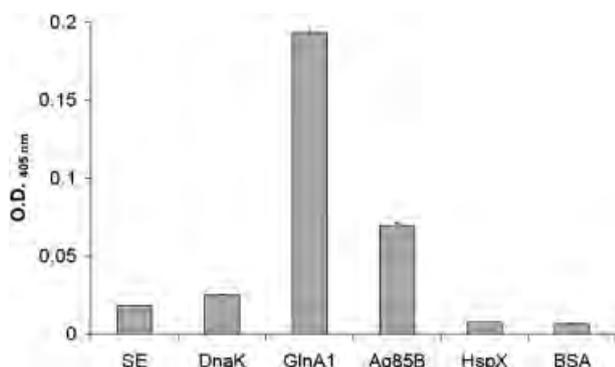
#### 4 Discussion

Our results provided evidence that *M. tuberculosis* possesses a large number of proteins that function as PlgRs and like many of the identified bacterial PlgR, those found in *M. tuberculosis* are also classical housekeeping enzymes. It is noteworthy that some PlgRs have been found extracellularly in spite, they lack typical signature sequences for their transport to the cell surface. Although, the extracellular function of these proteins remains a mystery, it has been proposed that once on the surface, they can interact with host

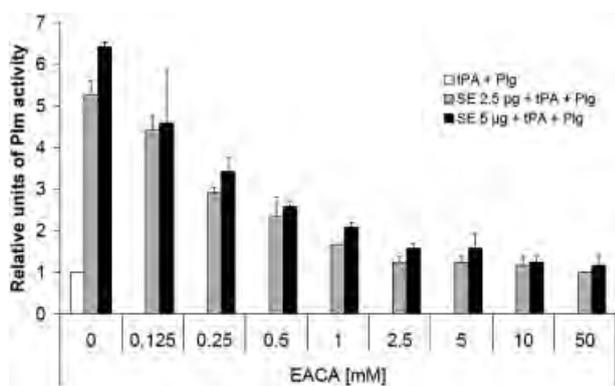


**Figure 3.** Binding of Plg to *M. tuberculosis* SE and recombinant proteins by ELISA. 5  $\mu$ g of SE and 1  $\mu$ g of each recombinant protein were adsorbed to ELISA plates. Wells were incubated with Plg and then with an anti-Plg antibody. Plg binding is expressed as the percentage of the OD<sub>492 nm</sub> of positive control wells, which were coated with 1  $\mu$ g of fibrinogen. Negative control wells were coated with BSA and with the mycobacterial recombinant protein HspX. Proteins incubated with Plg and with an anti-Plg antibody (gray bars), proteins incubated with Plg and with an anti-Plg antibody in presence of EACA (solid bars) and proteins incubated with anti-Plg antibody only (open bars).

components, such as Fn and Plg, or directly with the host cells, to trigger signal transduction and thereby enable the pathogens to colonize, persist, and invade the host [10]. Increase evidence shows that bacterial PlgRs immobilize Plg on the cell surface favoring its activation to Plm and turning bacteria into proteolytic organisms [5, 10, 26–28]. Adhesion to ECM proteins and activation of Plg and other latent proteases are important in tumor cell invasion through tissue



**Figure 4.** Plm activity associated to *M. tuberculosis* proteins. Plg was allowed to bind to immobilized mycobacterial proteins and then converted to Plm by tPA. Plm activity was measured by the degradation of a chromogenic substrate for Plg and measured at OD<sub>405 nm</sub>. Proteins incubated with Plg in presence of EACA were totally negative.



**Figure 5.** Enhanced tPA-mediated Plg activation. Plg was converted to Plm by tPA in the presence of 2.5 µg (gray bars) and 5 µg (solid bars) of mycobacterial SE proteins in a solution assay. Enhanced tPA-catalyzed Plg conversion to Plm with SE proteins was inhibited by the lysine analogue, EACA. Plm activity was measured by the degradation of a chromogenic substrate. Measurements were taken at 1 h and OD<sub>405 nm</sub> data of Plm activity were normalized with tPA-catalyzed Plg activation alone. Plg activation by tPA alone as a control was included (open bar).

barrier [16]. *In vitro* evidence has been presented in favor of the hypothesis that the presence of both ECM and Plg-binding proteins enabling the pathogens to colonize and invade the host tissue. This process has been termed “bacterial metastasis” in an analogy to the behavior described for metastatic tumor cells [17].

In Gram-positive bacteria, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (Gap) and  $\alpha$ -enolase have been identified as PlgRs on the surface of group A streptococci [29]. In Gram-negative bacteria, aspartase in *H. influenzae* [30] and the filamentous surface appendages fimbriae and flagella in *E. coli* and *S. typhimurium* form a major group of PlgRs [11, 31], however, a new PlgR proteins PgbA and PgbB of unknown function were identified in *H. pylori* by screening of a phage

display library with Plg [13]. In the present work, several *M. tuberculosis* CF and SE proteins with the capacity to bind Plg were identified using a similar technique that led to the discovery of Plg-binding proteins in the fungal pathogen *Candida albicans* [32]. Surprisingly, none of the mycobacterial PlgRs identified in this work corresponded to those described for other bacteria, however, most of them share the property of being metabolic proteins and extracellularly localized, although they lack signal sequences for exportation. Such as the case of the mycobacterial PlgRs; GlnA1, DnaK, SahH, GroEL, PrcB, Lpd, Icl Fba, and EF-Tu. The extracellular localization of these proteins has been shown previously by *M. tuberculosis* proteome analysis, all of them have been found in short-term cultures filtrates [22, 23]. Furthermore, proteomic analysis of subcellular proteins from cell wall, cytosol, and membrane revealed that some of the proteins could also be found in cell wall and membrane compartments [33]. Among the mycobacterial PlgRs here identified is GlnA1, an essential protein of *M. tuberculosis* that plays a role in nitrogen metabolism [34]. Its enzymatic activity, detected in CF of pathogenic but not of non-pathogenic mycobacteria, has been associated with virulence [35, 36]. Interestingly, we found that GlnA1 was also able to bind Fn, a feature so far not described in spite of evidence indicating the presence of Fn-binding molecules in the range of 57–60 kDa the GlnA1 molecular mass [19, 37]. The property to bind ECM has also been attributed to other PlgRs as Gap and fimbriae, which bind Fn and laminin, respectively [10, 11, 15]. In this study, the well-characterized mycobacterial Fn-binding proteins that belong to the Ag85 complex (Ag85A, Ag85B, and Ag85C mycolyl transferases) and the related Mpt51 antigen were also found to be PlgRs. The members of the Ag85 complex are predominantly secreted proteins involved in cell envelope biogenesis of mycobacteria catalyzing the transfer of the fatty acids [38]. Their interaction with the immune system in the infectious process has been broadly studied, and members of the Ag85 complex proteins have been considered as vaccine candidates due to their protective role against tuberculosis in animal models [39]. Other proteins identified as PlgRs in this work were members of the heat shock protein family, the chaperone DnaK and GroES [40]. DnaK is a predominant protein in mycobacterial CF and it is known as an immunodominant antigen for both the humoral and the cell-mediated immune response in humans and infected animals [41]. The GroES chaperonin of *M. tuberculosis* is strongly implicated as an important virulence factor during infection; the protein is secreted into the host cellular space and has a potent bone-reabsorbing activity by promoting the recruitment of osteoclasts. This is believed to account for the pathological features of spinal tuberculosis, one of the more severe diseases associated with mycobacterial infection [42].

Additionally, we found a group of enzymes Rv2110c, Rv1392, Rv3248c, Rv0462, Rv0467, Rv0363, and Rv0865, which were able to react with Plg by ligand blot. Rv2110c, proteasome subunit B that serves as a defense against

nitrosative stress [43]. Rv1392, *S*-adenosylmethionine synthetase, catalyses the formation of *S*-adenosylmethionine from methionine and ATP. Rv3248c, adenosyl-L-homocysteine, a hydrolase involved in the degradation of the compound which inhibits methylation reactions. Rv0462, dihydrolipoamide dehydrogenase catalyses the NAD(+)-dependent oxidation of the dihydrolipoyl cofactors that are covalently attached to the acyltransferase components of the pyruvate dehydrogenase. Rv0467, isocitrate lyase an enzyme of the glyoxylate cycle essential for the metabolism of fatty acids which together with Icl2 (Rv1915/6) are required for growth, survival, and virulence of *M. tuberculosis* in macrophages and mice [44]. Rv0363c, fructose biphosphate aldolase, an enzyme of the glycolytic pathway that was found to be increased only in culture filtrates of early microaerophilic cultures [24]. Rv0685, elongation factor Tu, a GTPase, which promotes the binding of aminoacyl-tRNA to ribosomes. This protein, up-regulated in high-iron-concentration is a major cell wall protein of *Mycobacterium leprae* [28] and together with fructose biphosphate aldolase has been also found to be a Plg-binding protein in *C. albicans* [32]. In addition, EF-Tu and pyruvate dehydrogenase E1  $\beta$  subunit were cell surface localized in *Mycoplasma pneumoniae* showing Fn-binding activities [45]. Finally, the Rv1980c, Mpt64 a protein of unknown function but with a relevant immunological activity [46], was also found to bind to Plg. This protein together with Ag85 complex and related Mpt51 were the only PlgRs identified in this work that possess a signal peptide to be exported.

The DnaK, GroES, PrcB, and EF-Tu proteins have a C-terminal lysine residue, which could mediate Plg interaction. Extensive analysis of the *M. tuberculosis* genome reveals that there are at least 80 proteins with C-terminal lysine (data not shown). The other mycobacterial PlgR do not have a C-terminal lysine, which suggest that internal lysines are involved in Plg binding, since their interaction with Plg is inhibited with a lysine analogue. In fact the removal of C-terminal lysine in  $\alpha$ -enolase, for example, partially diminished binding of Plg suggesting that multiple lysine residues in the molecule could be involved in the interaction with Plg [47].

In this work, three mycobacterial recombinant PlgRs were tested in Plg activation assays (DnaK, GlnA1, and Ag85B). All of them showed the ability to immobilize Plg, allowing its activation to Plm mediated by tPA. The highest Plm activity was obtained with GlnA1, which correlates with the highest capacity of this protein to bind to Plg. In contrast to the recombinant mycobacterial PlgRs, it was found that SE was also able to enhance the tPA catalyzed Plm formation, as described for some bacterial PlgRs-like flagella [31]. This property has also been described for fibrin, during fibrinolysis, Plg activation occurs through tPA binding to fibrin followed by the addition of Plg to form a ternary complex. Subsequent proteolytic cleavage of fibrin by Plm creates additional lysine-binding sites, thereby enhancing fibrinolysis by increasing Plg accumulation [4, 48]. Being the SE a complex

mixture of proteins, it is possible that one or more unknown proteins interact with tPA/Plg in the similar way as fibrin, the generated Plm could create additional lysine-binding sites by the cleavage of other mycobacterial proteins.

Inhibition with EACA was observed in all the assayed conditions, suggesting that the interaction mechanism between mycobacterial PlgRs and Plg involves the lysine-binding kringle domains of the last.

The major finding of the present study was the identification of novel *M. tuberculosis* proteins with adhesiveness properties to Plg that result in the formation of Plm. On the other hand, our data confirm the observation that a single bacterial species can express different types of PlgRs [5, 10], this diversity could complicate the analysis of the functions and possible virulence association of PlgRs. The contribution to virulence of our present findings still needs to be assessed *in vivo* as well as the role PlgRs could be playing in many aspects of the diseases pathology such as enhance bacterial invasiveness, dissemination, and contribution to inflammation and tissue damage.

*We thank Isabel Perez Montfort who corrected the English version of the manuscript and Cristina Parada for technical assistance. This work was supported by grants from CONACyT (G36923-M, 33580-M), DGPA (IN221599) Universidad Nacional Autonoma de México.*

## 5 References

- [1] Lijnen, H. R., *Biochemistry (Mosc)* 2002, 67, 92–98.
- [2] Syrovets, T., Simmet, T., *Cell. Mol. Life Sci.* 2004, 61, 873–885.
- [3] Chapman, H. A., Jr., Stone, O. L., *Biochem. J.* 1984, 222, 721–728.
- [4] Plow, E. F., Herren, T., Redlitz, A., Miles, L. A., Hoover-Plow, J. L., *FASEB J.* 1995, 9, 939–945.
- [5] Lahteenmaki, K., Kuusela, P., Korhonen, T. K., *FEMS Microbiol. Rev.* 2001, 25, 531–552.
- [6] Fuchs, H., Wallich, R., Simon, M. M., Kramer, M. D., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 12594–12598.
- [7] Korhonen, T. K., Lahteenmaki, K., Kukkonen, M., Pouttu, R. et al., *Adv. Exp. Med. Biol.* 1997, 412, 185–192.
- [8] Kuusela, P., Ullberg, M., Saksela, O., Kronvall, G., *Infect. Immun.* 1992, 60, 196–201.
- [9] Lottenberg, R., Minning-Wenz, D., Boyle, M. D., *Trends Microbiol.* 1994, 2, 20–24.
- [10] Pancholi, V., Chhatwal, G. S., *Int. J. Med. Microbiol.* 2003, 293, 391–401.
- [11] Kukkonen, M., Saarela, S., Lahteenmaki, K., Hynonen, U. et al., *Infect. Immun.* 1998, 66, 4965–4970.
- [12] Berge, A., Sjobring, U., *J. Biol. Chem.* 1993, 268, 25417–25424.
- [13] Jonsson, K., Guo, B. P., Monstein, H. J., Mekalanos, J. J., Kronvall, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004, 101, 1852–1857.

- [14] Kukkonen, M., Raunio, T., Virkola, R., Lahteenmaki, K. *et al.*, *Mol. Microbiol.* 1993, 7, 229–237.
- [15] Seifert, K. N., McArthur, W. P., Bleiweis, A. S., Brady, L. J., *Can. J. Microbiol.* 2003, 49, 350–356.
- [16] Andreassen, P. A., Egelund, R., Petersen, H. H., *Cell. Mol. Life Sci.* 2000, 57, 25–40.
- [17] Lahteenmaki, K., Edelman, S., Korhonen, T. K., *Trends Microbiol.* 2005, 13, 79–85.
- [18] Monroy, V., Amador, A., Ruiz, B., Espinoza-Cueto, P. *et al.*, *Infect. Immunol.* 2000, 68, 4327–4330.
- [19] Espitia, C., Scitutto, E., Bottasso, O., Gonzalez-Amaro, R. *et al.*, *Clin. Exp. Immunol.* 1992, 87, 362–367.
- [20] Edman, P., Begg, G., *Eur. J. Biochem.* 1967, 1, 80–91.
- [21] Kinter, M., Sherman, N. E., in: Desiderio, D. M., Nibbering, N. M. (Eds.), *Protein Sequencing and Identification Using Tandem Mass Spectrometry*, John Wiley-Interscience, Inc., New York 2000, pp. 147–165.
- [22] Mattow, J., Schaible, U. E., Schmidt, F., Hagens, K. *et al.*, *Electrophoresis* 2003, 24, 3405–3420.
- [23] Rosenkrands, I., King, A., Weldingh, K., Moniatte, M. *et al.*, *Electrophoresis* 2000, 21, 3740–3756.
- [24] Rosenkrands, I., Slayden, R. A., Crawford, J., Aagaard, C. *et al.*, *J. Bacteriol.* 2002, 184, 3485–3491.
- [25] Pancholi, V., Fischetti, V. A., *J. Exp. Med.* 1992, 176, 415–426.
- [26] Korhonen, T. K., Virkola, R., Lahteenmaki, K., Bjorkman, Y. *et al.*, *FEMS Microbiol. Lett.* 1992, 79, 307–312.
- [27] Lahteenmaki, K., Kuusela, P., Korhonen, T. K., *Methods* 2000, 21, 125–132.
- [28] Marques, M. A., Chitale, S., Brennan, P. J., Pessolani, M. C., *Infect. Immun.* 1998, 66, 2625–2631.
- [29] Pancholi, V., Fischetti, V. A., *J. Biol. Chem.* 1998, 273, 14503–14515.
- [30] Sjostrom, I., Grondahl, H., Falk, G., Kronvall, G., Ullberg, M., *Biochim. Biophys. Acta* 1997, 1324, 182–190.
- [31] Lahteenmaki, K., Westerlund, B., Kuusela, P., Korhonen, T. K., *FEMS Microbiol. Lett.* 1993, 106, 309–314.
- [32] Crowe, J. D., Sievwright, I. K., Auld, G. C., Moore, N. R. *et al.*, *Mol. Microbiol.* 2003, 47, 1637–1651.
- [33] Mawuenyega, K. G., Forst, C. V., Dobos, K. M., Belisle, J. T. *et al.*, *Mol. Biol. Cell* 2005, 16, 396–404.
- [34] Sassetti, C. M., Rubin, E. J., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003, 100, 12989–12994.
- [35] Harth, G., Clemens, D. L., Horwitz, M. A., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994, 91, 9342–9346.
- [36] Raynaud, C., Etienne, G., Peyron, P., Laneelle, M. A., Daffe, M., *Microbiology* 1998, 144, 577–587.
- [37] Abou-Zeid, C., Ratliff, T. L., Wiker, H. G., Harboe, M. *et al.*, *Infect. Immun.* 1988, 56, 3046–3051.
- [38] Belisle, J. T., Vissa, V. D., Sievert, T., Takayama, K. *et al.*, *Science* 1997, 276, 1420–1422.
- [39] Horwitz, M. A., Lee, B. W., Dillon, B. J., Harth, G., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995, 92, 1530–1534.
- [40] Young, D. B., Garbe, T. R., *Infect. Immun.* 1991, 59, 3086–3093.
- [41] Bartow, R. A., McMurray, D. N., *Tuber. Lung Dis.* 1997, 78, 185–193.
- [42] Meghji, S., White, P. A., Nair, S. P., Reddi, K. *et al.*, *J. Exp. Med.* 1997, 186, 1241–1246.
- [43] Darwin, K. H., Ehrst, S., Gutierrez-Ramos, J. C., Weich, N., Nathan, C. F., *Science* 2003, 302, 1963–1966.
- [44] Muñoz-Elias, E. J., McKinney, J. D., *Nat. Med.* 2005, 11, 638–644.
- [45] Dallo, S. F., Lazzell, A. L., Chavoya, A., Reddy, S. P., Baseman, J. B., *Infect. Immun.* 1996, 64, 2595–2601.
- [46] Andersen, A. B., Ljungqvist, L., Haslov, K., Bentzon, M. W., *Scand. J. Immunol.* 1991, 34, 365–372.
- [47] Derbise, A., Song, Y. P., Parikh, S., Fischetti, V. A., Pancholi, V., *Infect. Immun.* 2004, 72, 94–105.
- [48] Mosesson, M. W., *J. Thromb. Haemost.* 2005, 3, 1894–1904.