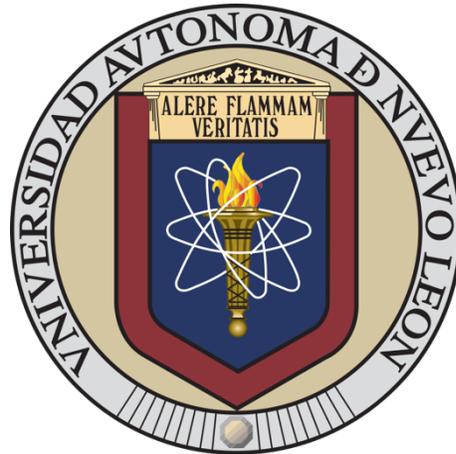


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE MEDICINA



**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL GEN Rv3671c DE *Mycobacterium tuberculosis* Y
EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD SOBRE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR
PROTEASAS (PARs) EN MONOCITOS HUMANOS**

Presentado Por

M.C. GERARDO GARCÍA GONZÁLEZ

**Como requisito parcial para la obtención del Grado de
Doctorado en Ciencias con orientación en Microbiología Médica**

Agosto 2021

**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL GEN Rv3671c DE *Mycobacterium tuberculosis*
Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD SOBRE LOS RECEPTORES ACTIVADOS
POR PROTEASAS (PARs) EN MONOCITOS HUMANOS**

Aprobación de la Tesis:



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Director de Tesis



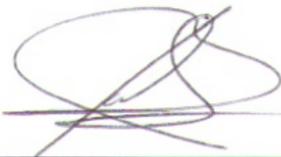
Dr. C. Alejandro Sánchez González

Co-director de Tesis



Dr. C. Gloria María González González

Miembro de la comisión



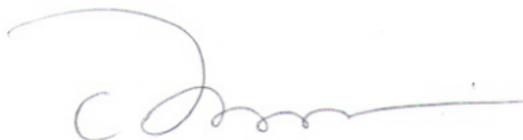
Dr. C. Romel Hernández Bello

Miembro de la comisión



Dr. C. Jorge Ángel I. Ascacio Martínez

Miembro de la comisión



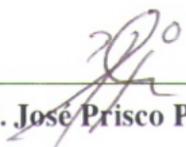
Dr. med. Felipe Arturo Morales Martínez

Subdirector de Estudios de Posgrado

**EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL GEN Rv3671c DE *Mycobacterium tuberculosis*
Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD SOBRE LOS RECEPTORES ACTIVADOS
POR PROTEASAS (PARs) EN MONOCITOS HUMANOS**

Presentado por: M.C. Gerardo García González

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Micobacteriología del centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI) adscrito al Departamento de Microbiología de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Nuevo León, bajo la dirección del Dr. C. José Prisco Palma Nicolás, y fue financiado con recursos otorgados por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología a través del proyecto de la convocatoria de Ciencias Básicas con número de registro 238125.



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Director de Tesis

*Sorprendernos por algo
es el primer paso de la mente hacia el descubrimiento*

Louis Pasteur

(1822-1895)

DEDICATORIA

A ti, por enseñarme lo que no sabía

A ti, por ayudarme cuando lo necesité

A ti, por estar conmigo siempre

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el apoyo económico otorgado para la realización de esta estancia como estudiante de doctorado con el número de becario 582243 (CVU 708895).

~ o ~

Al Dr. José Palma, por seis años de enseñanzas y fructífero trabajo, que hoy me permiten llegar a este punto.

A la Dra. Gloria González, por el apoyo y las enseñanzas que por todo este tiempo han estado incondicionalmente.

A los Dres. Alejandro Sánchez, Jorge Ascacio y Romel Hernández, por la asesoría y la entera disponibilidad siempre que fue requerida durante este proyecto.

~ o ~

Al Departamento de Microbiología y a todos quienes los conforman y conformaron durante mi estadía, por haber sido mi casa y mi familia en esta larga aventura que ahora concluye.

A la QBP Lizeth Pérez, con especial agradecimiento por su siempre disponibilidad y apoyo en mi trabajo experimental, pero sobre todo por su valiosa amistad.

A mis amigos Martín González, Ana Ríos y Orlando Flores, por ser mi apoyo incondicional, por las aventuras vividas y por las largas noches de pláticas que nos unieron como familia.

~ o ~

A mis padres y mis hermanas, por ser mi familia, por siempre estar dispuestos a apoyarme, por ser quienes son y por todo lo que significan para mí. Y a mi tía Elvia, por el cariño y siempre creer en mí.

Al resto de mi familia y amigos, en mi bello Sonora y en mi querido Nuevo León, por sus atentas muestras de cariño y manifestaciones de apoyo que siempre he recibido. A todos, gracias.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
1.1. <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	1
1.1.1. Aspectos generales.....	1
1.1.2. Distribución geográfica de <i>M. tuberculosis</i> y epidemiología.....	2
1.1.3. Fisiología y estructura de <i>M. tuberculosis</i>	4
1.1.4. Factores de virulencia de <i>M. tuberculosis</i> en el proceso de infección.....	5
1.1.5. Respuesta inmune contra <i>M. tuberculosis</i> en la tuberculosis pulmonar.....	7
1.1.5.1. Establecimiento de la respuesta inmune protectora Th1 en la tuberculosis.....	9
1.1.5.2. Estado inmunosupresor frente a la tuberculosis.....	10
1.2. LOS MACRÓFAGOS.....	12
1.2.1. Monopoyesis y maduración del sistema fagocítico-mononuclear.....	12
1.2.2. Polarización de macrófagos y la dicotomía M1/M2.....	14
1.2.3. El comportamiento del macrófago durante el proceso de infección.....	17
1.2.4. El binomio <i>M. tuberculosis</i> -macrófago, el punto clave en el desarrollo de la tuberculosis.....	19
1.3. EL SISTEMA PARs-PROTEASAS.....	20
1.3.1. Características generales de los receptores activados por proteasas (PARs).....	20
1.3.2. Los PARs en la inmunidad y la fisiología leucocitaria.....	23
1.3.3. Participación de los receptores PARs en la fisiopatología de la infección.....	26
1.3.4. Las proteasas de <i>M. tuberculosis</i> y su relevancia en la fisiopatología de la tuberculosis.....	28
ANTECEDENTES.....	29
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	31
JUSTIFICACIÓN.....	33
OBJETIVOS	34
5.1. OBJETIVO GENERAL.....	34
5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
HIPÓTESIS.....	35
MATERIAL Y MÉTODOS	36
7.1. MATERIAL.....	36
7.1.1. Reactivos.....	36
7.1.2. Material biológico.....	37
7.2. MÉTODOS.....	38
7.2.1. Estrategia general de clonación del gen Rv3671c y expresión de la proteína MarP.....	38

7.2.2. Análisis de secuencia del gen Rv3671c de <i>M. tuberculosis</i> y del vector pPICZ α A para el diseño de oligonucleótidos.....	40
7.2.3. Extracción de ADNg de <i>M. tuberculosis</i>	43
7.2.4. Amplificación del gen Rv3671c por PCR.	45
7.2.5. Purificación del producto de PCR.	46
7.2.6. Digestión doble del inserto con <i>Xho</i> -I y <i>Xba</i> -I.	48
7.2.7. Preparación del vector pPICZ α A para clonación.	49
7.2.8. Ligación del inserto Rv3671c en el vector pPICZ α A.	50
7.2.9. Preparación de células electrocompetentes <i>E. coli</i> DH5 α	52
7.2.10. Transformación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c en <i>E. coli</i> DH5 α	53
7.2.11. Purificación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c por el método de lisis alcalina.	55
7.2.12. Evaluación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c mediante ensayos de restricción con las enzimas <i>Eco</i> 91-I, <i>Eco</i> R-I y <i>Xho</i> -I/ <i>Xba</i> -I.	57
7.2.13. Linearización del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c con <i>Sac</i> -I.	60
7.2.14. Preparación de células electrocompetentes de <i>P. pastoris</i> GS115.	61
7.2.15. Transfección de levaduras <i>P. pastoris</i> GS115 con el vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c.	62
7.2.16. Extracción de ADNg de las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115 para su genotipificación por PCR y secuenciación.	62
7.2.17. Fermentación de las cepas recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115 con 1% de MetOH.	66
7.2.18. Diálisis del sobrenadante de cultivo.	67
7.2.19. Determinación de la concentración de proteínas.	68
7.2.20. Precipitación de proteínas totales con MetOH/cloroformo.	69
7.2.21. Determinación de MarP recombinante por SDS-PAGE y <i>western blot</i>	69
7.2.22. Purificación de MarP recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.	72
7.2.23. Desalado de proteínas recombinantes mediante sefadex G-25.	73
7.2.24. Análisis de glicosilaciones en la proteína MarP recombinante expresada en <i>P. pastoris</i>	74
7.2.25. Evaluación de actividad proteolítica de MarP por degradación de albúmina.	75
7.2.26. Demostración de actividad tipo tripsina en MarP por hidrólisis del sustrato BApNA.	75
7.2.27. Purificación de monocitos humanos por inmunomagnetismo.	76
7.2.28. Desarrollo del modelo de polarización de macrófagos M1/M2 en monocitos purificados.	78
7.2.29. Análisis de viabilidad celular en macrófagos estimulados con MarP.	79
7.2.30. Efecto de la proteasa MarP en la diferenciación de macrófagos en la línea celular de monocitos THP-1.	80
7.2.31. Cuantificación de citocinas mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).	81
7.2.32. Participación de los receptores activados por proteasas en la diferenciación de macrófagos estimulados con MarP.	83
7.2.33. Análisis de las vías de señalamiento intracelular implicadas durante la polarización de macrófagos estimulados con MarP.	84
7.2.34. Análisis estadísticos.	85

RESULTADOS	86
8.1. CLONACIÓN DEL GEN Rv3671c EN <i>E. coli</i> DH5 α	86
8.1.1. Amplificación del gen Rv3671c por PCR y preparación para su clonación.	86
8.1.2. Caracterización del vector de clonación/expresión pPICZ α A.....	89
8.1.3. Transformación de vectores recombinante en <i>E. coli</i> DH5 α	90
8.1.4. Purificación de vectores recombinantes por método de Miniprep.	93
8.1.5. Caracterización de vectores recombinantes por ensayos de restricción.	94
8.2. CONSTRUCCIÓN DE CLONAS RECOMBINANTES DE <i>P. pastoris</i> GS115.	98
8.2.1. Transfección de vectores recombinantes en <i>P. pastoris</i> GS115.....	98
8.2.2. Genotipificación de clonas de <i>P. pastoris</i> portadoras del gen Rv3671c.	100
8.2.3. Análisis por secuenciación de clonas de <i>P. pastoris</i> recombinantes.	102
8.3. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MarP RECOMBINANTE.	104
8.3.1. Expresión de la proteína MarP y evaluación del crecimiento de las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> en medio con MetOH.	104
8.3.2. Efecto del pH en la producción de MarP _{Sol} recombinante durante el cultivo de <i>P. pastoris</i>	106
8.3.3. Purificación de MarP recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.	107
8.3.4. Eliminación de imidazol en MarP recombinante purificada con columnas PD-10.	109
8.3.5. Análisis de glicosilación en la proteína recombinante MarP.....	110
8.4. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD <i>IN VITRO</i> DE MarP RECOMBINANTE. ...	112
8.4.1. Digestión de albúmina y evaluación de proteólisis por electroforesis de proteínas.....	112
8.4.2. Evaluación de actividad de proteasa tipo tripsina por hidrólisis de <i>p</i> -nitroanilina.	113
8.5. EFECTO DE MarP EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.....	117
8.5.1. Evaluación del efecto de la proteasa MarP con monocitos humanos purificados.	117
8.5.2. Efecto de la proteasa MarP en monocitos de la línea celular THP-I.	119
8.5.3. Participación de los receptores PARs en la actividad de la proteasa MarP.....	121
8.5.4. Vías de señalamiento implicadas en los macrófagos estimulados con MarP.	123
DISCUSIÓN	125
CONCLUSIÓN	131
PERSPECTIVAS.....	132
REFERENCIAS.....	133

LISTA DE FIGURAS

FIGURA		PÁGINA
Figura 1.1	Esquematación de la pared celular de <i>M. tuberculosis</i> .	5
Figura 1.2	Polarización de macrófagos y la adopción del fenotipo M1/M2.	15
Figura 1.3	Representación esquemática de los receptores PARs.	22
Figura 7.1	Diagrama de flujo de la clonación del gen Rv3671c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y la expresión de la proteína MarP en <i>Pichia pastoris</i> .	39
Figura 7.2	Secuencia del gen Rv3671c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	40
Figura 7.3	Características del plásmido pPICZ α A.	42
Figura 7.4	Representación esquemática de un gel preparativo de agarosa.	46
Figura 7.5	Ligación del gen Rv3671c en el vector pPICZ α A.	51
Figura 7.6	Representación esquemática del respaldo de clonas recombinantes.	55
Figura 7.7	Mapa de los vectores recombinantes pPICZ α A_Rv3671c_var1/3.	57
Figura 7.8	Inserción de la construcción pPICZ α A_Rv3671c en el promotor AOX1 por recombinación homóloga.	65
Figura 7.9	Orden de elementos en el procedimiento de electrotransferencia.	71
Figura 7.10	Separación de CMSP por gradiente de densidad.	77
Figura 8.1	Amplificación del gen Rv3671c en un gradiente de temperaturas.	87
Figura 8.2	Generación de productos de PCR del gen Rv3671c para clonación.	88
Figura 8.3	Digestión del gen Rv3671c con <i>Eco</i> 91-I.	89
Figura 8.4	Identificación de los sitios de restricción <i>Xho</i> -I, <i>Xba</i> -I, <i>Sac</i> -I y <i>Eco</i> R-I en pPICZ α A.	90
Figura 8.5	Clonación del gen Rv3671c en su forma transmembranal y soluble en <i>E. coli</i> DH5 α .	92
Figura 8.6	Purificación de construcciones plasmídicas pPICZ α A_Rv3671c _{TM} .	93

Figura 8.7	Purificación de construcciones plasmídicas pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} .	94
Figura 8.8	Linearización de construcciones pPICZ α A_Rv3671c _{TM} con <i>Eco</i> 91-I.	94
Figura 8.9	Linearización de construcciones pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} con <i>Eco</i> 91-I.	95
Figura 8.10	Reacción de digestión de la construcción pPICZ α A_Rv3671c _{TM} con <i>Eco</i> R-I.	96
Figura 8.11	Reacción de digestión de la construcción pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} con <i>Eco</i> R-I.	96
Figura 8.12	Liberación del inserto Rv3671c _{TM} y Rv3671c _{Sol} y linearización del vector pPICZ α A en la doble digestión con las enzimas de restricción <i>Xho</i> -I y <i>Xba</i> -I.	97
Figura 8.13	Linearización de construcciones pPICZ α A_Rv3671c _{TM} y pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} con <i>Sac</i> -I.	98
Figura 8.14	Transfección de las construcciones pPICZ α A_Rv3671c _{TM} y pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} en <i>P. pastoris</i> GS115.	99
Figura 8.15	Esquematación del alineamiento de los <i>primers</i> AOX1 en el <i>cassette</i> de expresión en las clonas recombinantes de <i>P. pastoris</i> GS115.	100
Figura 8.16	Extracción de ADNg de <i>P. pastoris</i> GS115 transfectadas con las construcciones pPICZ α A_Rv3671c _{TM} y pPICZ α A_Rv3671c _{Sol} .	101
Figura 8.17	Validación por PCR del genotipo AOX1/Rv3671c _{TM} y AOX1/Rv3671c _{Sol} en <i>P. pastoris</i> GS115.	102
Figura 8.18	Amplificación por PCR de los <i>cassettes</i> AOX1/Rv3671c _{TM} y AOX1/Rv3671c _{Sol} en ADNg de <i>P. pastoris</i> GS115.	103
Figura 8.19	Análisis de secuenciación de los <i>cassettes</i> de expresión AOX1/Rv3671c _{TM} y AOX1/Rv3671c _{Sol} .	103
Figura 8.20	Curva de crecimiento de las levaduras productoras de las proteínas MarP _{TM} y MarP _{Sol} .	104
Figura 8.21	SDS-PAGE y <i>western blot</i> de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de <i>P. pastoris</i> productoras de MarP _{TM} y MarP _{Sol} .	105
Figura 8.22	Curva de crecimiento de la cepa productora de MarP _{Sol} en diferentes pH.	106
Figura 8.23	Evaluación de la expresión de MarP _{Sol} en diferentes pH.	107
Figura 8.24	Purificación de MarP _{Sol} por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ .	108

Figura 8.25	Pasos de lavado durante la purificación de MarP _{Sol} por cromatografía de afinidad a Ni ²⁺ .	108
Figura 8.26	Desalado de MarP _{Sol} con columnas PD-10.	109
Figura 8.27	Análisis espectrofotométrico del imidazol en muestras desaladas por columnas PD-10.	110
Figura 8.28	Presencia de glicosilaciones en la proteasa MarP _{Sol} .	111
Figura 8.29	Desglicosilación de la proteasa MarP _{Sol} con PNGasa F.	112
Figura 8.30	Digestión de albúmina por MarP _{Sol} y análisis por SDS-PAGE.	113
Figura 8.31	Hidrólisis de BApNA por tripsina y estandarización del sistema para cuantificación de actividad proteolítica.	114
Figura 8.32	Cuantificación de actividad de MarP _{Sol} en diferentes pH.	116
Figura 8.33	Cuantificación de actividad de MarP _{Sol} desglicosilada.	117
Figura 8.34	Análisis de viabilidad celular en monocitos humanos purificados y estimulados con MarP _{Sol} .	118
Figura 8.35	Cuantificación de citocinas IL-12p40 e IL-4 en monocitos estimulados con MarP _{Sol} .	119
Figura 8.36	Cuantificación de citocinas IL-12p40, IL-4, TNF- α e IL-10 en células THP-1 estimuladas con MarP _{Sol} .	120
Figura 8.37	Efecto de la inhibición del receptor PAR1 en células THP-1 estimuladas con MarP _{Sol} .	122
Figura 8.38	Efecto de la inhibición del receptor PAR2 en células THP-1 estimuladas con MarP _{Sol} .	122
Figura 8.39	Inhibición de señalización intracelular en células THP-1 estimuladas con MarP _{Sol} .	124

LISTA DE TABLAS

TABLA		PÁGINA
Tabla 7.1	Características moleculares de las variantes del gen Rv3671c de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	41
Tabla 7.2	<i>Primers</i> diseñados para la amplificación del gen Rv3671c.	43
Tabla 7.3	Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen Rv3671c.	45
Tabla 7.4	Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen Rv3671c.	45
Tabla 7.5	Proporción de volumen del buffer de solubilización L3.	47
Tabla 7.6	Condiciones de reacción para la digestión del inserto con <i>Xho-I/Xba-I</i> .	48
Tabla 7.7	Condiciones de reacción para la ligación del inserto Rv3671c en el vector pPICZ α A.	51
Tabla 7.8	Controles experimentales en el protocolo de electroporación.	54
Tabla 7.9	Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con <i>Eco91-I</i> .	58
Tabla 7.10	Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con <i>EcoR-I</i> .	59
Tabla 7.11	Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con <i>Xho-I</i> y <i>Xba-I</i> .	59
Tabla 7.12	Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con <i>Sac-I</i> .	60
Tabla 7.13	<i>Primers</i> diseñados para la amplificación del gen AOX1.	64
Tabla 7.14	Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen AOX1 recombinante.	64
Tabla 7.15	Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen AOX1.	64
Tabla 7.16	Diluciones de anticuerpos y rangos de concentración de curva estándar en ensayos de ELISA.	82

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
A ₆₀₀	Absorbancia a 600 nm.
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico.
ADNp	Ácido desoxirribonucleico plasmídico.
ANOVA	Análisis de variancia.
AOX1	Alcohol oxidasa 1.
Arg1	Arginasa 1.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ASB	Albúmina sérica bovina.
β-ME	β-mercaptoetanol.
BAPNA	Nα-Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida.
BC	Buffer de carga.
BCA	Ácido bicinconínico.
BMGY	<i>Buffered glycerol-complex medium.</i>
BMMY	<i>Buffered methanol-complex médium.</i>
BrEt	Bromuro de etidio.
CCL	Ligandos de quimiocinas CC.
CCR	Receptor de quimiocinas CC.
CD14	Receptor de lipopolisacárido.
CD16	Receptor FcγRIII.
CD163	Receptor carroñero.
CD206	Receptor de manosa.
CD4	Glicoproteína co-receptora de TCR.
CD40	Proteína co-estimuladora del MHC.
CD80	Proteína co-estimuladora del MHC.
CD86	Proteína co-estimuladora del MHC.
ClpP	Subunidad proteolítica de proteasa ClpP dependiente de ATP.
cm ²	Centímetros cuadrados.
CMH	Célula madre hematopoyética.
CMSP	Células mononucleares de sangre periférica.
CMTb	Complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
CTAB	Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.
CX3CR1	Receptor 1 de quimiocinas CX3C.

CXCL	Ligandos de quimiocinas CXC.
CYC1	Región de terminación de transcripción de <i>S. cerevisiae</i> .
EDTA	Etilendiaminotetraacético.
ELISA	Ensayo por inmunoadsorción ligado a enzimas.
EM7	Secuencia de promotora de procariotas.
ESX	Sistema de secreción de ESAT6.
EtOH	Etanol.
<i>g</i>	Gravedades.
GM-CSF	Factor estimulante de colonias de granulocitos y monocitos.
GlcNAc	N-acetil glucosamina.
GPCR	Receptor acoplado a proteínas G.
His	Histidina.
HRP	Peroxidasa de rábano picante.
HtrA	Proteasas requisito de alta temperatura A.
IFN- γ	Interferón γ .
IL-	Interleucina.
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible.
IsopOH	Isopropanol.
kb	Kilobase.
kDa	Kilo Dalton.
L	Litro.
LAM	Lipoarabinomanano.
LB	Luria Bertani.
LPS	Lipopolisacárido.
M	Molaridad.
M-CSF	Factor estimulante de colonias de macrófagos.
MAPK	Cinasas activadas por mitógeno.
MarP	Proteasa de resistencia al ácido de <i>Mycobacterium</i> .
MarP _{Sol}	MarP soluble.
MarP _{TM}	MarP transmembranal.
MCP-1	Proteína quimioattractante de monocitos 1.
MDR	Multidrogoresistente.
MetOH	Metanol.
μ g	Microgramo.
μ L	Microlitro.
μ M	Micromolar
mg	Miligramos.
mL	Mililitro.

mM	Milimolar.
MHC-II	Complejo principal de histocompatibilidad II.
MTS	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio.
MycP	Proteasas de serina tipo subtilisina (micosinas).
NCBI	Centro Nacional para la Información Biotecnológica.
NF- κ B	Factor Nuclear κ B.
NLR	Receptores tipo Nod.
ng	Nanogramo.
nm	Nanómetro.
$^{\circ}$ C	Grados centígrados.
OMS	Organización Mundial de la Salud.
<i>p</i> -NA	<i>p</i> -nitroanilina.
PAMPs	Patrones moleculares asociados a patógenos.
PARs	Receptores activados por proteasas.
pb	Pares de bases.
PBS	Buffer de fosfatos salino.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PGM	Progenitor de monocitos y macrófagos.
PIM	Fosfatidilinositol manosido.
PKC	Proteína cinasa C.
PMA	Forbol-12-miristato-13- acetato.
PMC	Progenitor mieloide común.
PMD	Progenitor de macrófagos y células dendríticas.
PMo	Progenitor de monocitos.
PPAR γ	Receptores activados por proliferadores peroxisomales γ .
PRR	Receptores de reconocimiento de patrón.
PVDF	Fluoruro de polivinilideno.
RNS	Especies reactivas de nitrógeno.
ROS	Especies reactivas de oxígeno.
rpm	Revoluciones por minuto.
SDS	Dodecilsulfato sódico.
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis.</i>
SFB	Suero fetal bovino.
SSF	Solución salina fisiológica.
STAT	Transductor de señal y activador de la transcripción.
TCR	Receptor de célula T.
TDM	Trehalosa dimicolato.

TE	Tris – EDTA.
TEF1	Factor de elongación de la transcripción 1.
TGF- β	Factor de crecimiento tumoral β .
TLR	Receptor tipo Toll.
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbencidina.
TMM	Trehalosa monomicolato.
TNF- α	Factor de necrosis tumoral α .
TTBS	Buffer salino – Tris – Tween-20.
U	Unidades de actividad.
UV	Ultravioleta.
V	Voltios.
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana.
XDR	Extremo drogo resistentes.
YPD	Extracto de levadura, peptona y dextrosa.
Zeo	Zeocina.

RESUMEN

M.C. Gerardo García González

Fecha de Graduación: Agosto 2021

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Medicina.

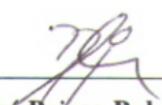
Título del estudio: **EXPRESIÓN RECOMBINANTE DEL GEN Rv3671c DE *Mycobacterium tuberculosis* Y EVALUACIÓN DE SU ACTIVIDAD SOBRE LOS RECEPTORES ACTIVADOS POR PROTEASAS (PARS) EN MONOCITOS HUMANOS**

Número de páginas: 144.

Candidato al Grado de DOCTORADO en CIENCIAS con Orientación en Microbiología Médica.

Área de estudio: **Micobacteriología Médica.**

Las proteasas producidas por microorganismos patógenos son consideradas factores de virulencia importantes para el desarrollo de la patogénesis, en el caso de *Mycobacterium tuberculosis* la proteasa codificada por el gen Rv3671c, MarP, se a asociado con una resistencia a condiciones de estrés, lo que sugiere una capacidad favorecida a tolerar las adversidades en el macrófago como célula hospedera. Por su parte en los monocitos se ha observado como estos pueden diferenciarse a macrófagos después de su estimulación con proteasas, a través de la vía desencadenada por activación de los receptores PARs. **Objetivos:** Conocer el efecto de la proteasa recombinante Rv3671c (MarP) en la diferenciación de macrófagos M1/M2 a través de la activación de los PARs. **Material y Métodos:** La proteasa codificada por el gen Rv3671c se expresó en la levadura *Pichia pastoris* y su actividad enzimática fue verificada. Posteriormente se utilizó para desarrollar un modelo *in vitro* de polarización de macrófagos con monocitos humanos purificados y la línea celular THP-1, estudiando el efecto de los receptores PARs y cuantificando citocinas por ELISA como marcadores de diferenciación. **Resultados:** La proteasa Rv3671c (MarP) provocó la liberación de TNF- α en células THP-1, el cual fue un efecto dependiente de su actividad de proteasa y de la activación de los receptores PAR1/2 a través de las vías de señal NF- κ B, MAPK y PKC **Conclusión:** Los monocitos estimulados con la proteasa de *M. tuberculosis* Rv3671c (MarP) indujeron la liberación del TNF- α a través de la activación de los receptores PAR1/2, lo que sugiere una efecto pro-inflamatorio desencadenado por este factor de virulencia a través de una vía específica de activación.



Dr. C. José Prisco Palma Nicolás

Director de Tesis

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

1.1. *Mycobacterium tuberculosis*.

1.1.1. Aspectos generales.

Desde 1882, el año en el que Robert Koch anuncia sus descubrimientos sobre el agente causal de una de las enfermedades milenarias que habían azotado a la población mundial por tanto tiempo, *Mycobacterium tuberculosis* no ha dejado de ser uno de los microorganismos más investigados, con una relevancia en temas de su propio entendimiento como organismo y sus repercusiones aún actuales en la salud pública mundial.

M. tuberculosis, el agente causal de la tuberculosis pulmonar, es un microorganismo que históricamente ha coexistido con el ser humano desde la antigüedad encontrando evidencia de su existencia en cadáveres que datan del antiguo Egipto, en África, o provenientes de los Andes en la región de Sudamérica¹. Sin embargo, una serie de estudios basados en el análisis de secuencias genómicas repetidas de diferentes aislamientos de *M. tuberculosis* apuntan a que la aparición de este microorganismo data desde aproximadamente 40,000 años, coincidiendo con la migración de la raza humana desde África².

Actualmente se identifican poco más de 100 especies pertenecientes al género *Mycobacterium* con base en la secuencia de la subunidad ribosomal 16S, de las cuales alrededor

de 20 especies se identifican como patógenos humanos, siendo el principal exponente de este grupo *M. tuberculosis*³. Este grupo de micobacterias fuertemente vinculadas con la tuberculosis comprenden el conocido Complejo *Mycobacterium tuberculosis* (CMTb), del cual forman parte también *M. bovis*, *M. canettii*, *M. africanum*, y otras especies asociadas a infecciones en animales como *M. microti*, *M. caprae* y *M. pinnipedii*⁴.

Por otro lado, junto a la amplia distribución que ocupa a este patógeno en el mundo, la relativa y reciente aparición de nuevas cepas con un perfil de fármacoresistencia designadas como “multi drogo resistentes” (MDR) o “extremo drogo resistentes” (XDR), o el creciente número de casos en individuos coinfectados con VIH^{1,2}, mantiene posicionado a *M. tuberculosis* como un agente de importante prioridad por combatir.

1.1.2. Distribución geográfica de *M. tuberculosis* y epidemiología.

La distribución de *M. tuberculosis* en el mundo es un tema cuya complejidad ya no solo se limita a la presencia de este microorganismo en una región en específico, si no a la variabilidad de genética que existe en cada región. Desde los trabajos Filliol *et. al.* basados en espiligotipos, el análisis filogenético en *M. tuberculosis* ha permitido la clasificación de diferentes subgrupos de esta especie, así como la geodistribución que estos grupos presentan en los diferentes continentes^{5,6}. Actualmente, *M. tuberculosis* se agrupa en siete grupos conocidos como linajes, siendo estos el Indo – Océánico (linaje 1), Asiático oriental (linaje 2), Indo – Asiático oriental (linaje 3), Euro – Americano (linaje 4), Africano occidental 1 (linaje 5), Africano occidental 2 (linaje 6), Etiopia (linaje 7)^{7,8}. A su vez, un linaje es dividido en sublinajes, destacando en orden de relevancia epidemiológica el Beijing perteneciente al linaje 2, o el Harlem y LAM que se encuentran en el linaje 4⁷.

A su vez, los siete linajes en los que se clasificó a *M. tuberculosis* se han dividido en los grupos ancestrales, en donde se encuentran los linajes 1, 5 y 6, y distinguidos por la presencia de una región genómica de 2152 pb conocida como TbD1^{8,9}. Por su parte, los linajes 2, 3, 4 y 7 comprenden el grupo de linajes modernos, en los que evolutivamente se perdió la región TbD1 (Δ TbD1)⁹. Las diferencias entre las especies que conforman los respectivos linajes han sido relacionadas además de su distribución geográfica y el predominio en zonas muy particulares del globo, con diferencias en su comportamiento microbiano en aspectos como la transmisibilidad y virulencia, la fisiopatología que se puede desarrollar a nivel pulmonar o extrapulmonar, diferencias en la respuesta inmunológica, e inclusive en la diversidad de fenotipos adquiridos y comportamientos distintos de fármacoresistencia^{10,11}.

Mientras que los linajes modernos son reconocidos por su distribución a nivel mundial y presentar una mejor adaptación al hospedero humano y una mayor virulencia, asociados frecuentemente a brotes epidémicos de tuberculosis^{8,11}. Por el otro lado, existen los linajes ancestrales en los que cepas de *M. tuberculosis* (linaje 1) y *M. tuberculosis* var. *africanum* (linaje 5 y 6) parecen limitados a zonas del oeste y sur de África, encontrando incluso especies con la capacidad de adaptarse a otros animales mamíferos^{8,10}.

En términos generales la tuberculosis en la actualidad continua siendo considerada como un problema de salud pública de impacto global, aunque siendo este más destacable en los países en proceso de desarrollo. La OMS en su reporte del año 2020, menciona la existencia de 10 millones de casos de tuberculosis activos en el mundo durante el año 2019¹². En el mismo año 2019 se menciona el deceso de 1.4 millones de personas a causa de esta enfermedad, en los cuales se incluyen un total de poco más de 200,000 individuos coinfectados con VIH, además de contar con un creciente número de casos de infecciones por micobacterias MDR¹².

1.1.3. Fisiología y estructura de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis, también conocida como bacilo de Koch, es un microorganismo de lento crecimiento con un tiempo de generación de entre 12 – 24 horas, que tradicionalmente se reconoce como una bacteria intracelular facultativa en donde el macrófago es su principal célula hospedera, además de ser un microorganismo aerobio estricto, inmóvil y carente de la formación de esporas como estructuras de resistencia^{13,14}. Es un microorganismo productor de niacinas, ureasas, catalasas y de reducir los nitratos, todos estos, marcadores bioquímicos que favorecen la identificación de diferentes especies del complejo *M. tuberculosis*¹³. Esta bacteria presenta una forma de bacilo alargado, con una medida de aproximadamente entre 0.3 – 0.5 μm , que reacciona como Gram positivo ante la tinción de Gram¹⁵. Sin embargo, es la tinción de ácido alcohol resistencia de Ziehl Neelsen la técnica ideal de coloración del género *Mycobacterium*, considerando que sólo cinco géneros microbianos poseen esta propiedad de resistencia al ácido¹⁴.

Hablar de la estructura con la que se conforma la envoltura de *M. tuberculosis*, más allá del complejo macroestructural que lo conforma, es también mencionarlo como una barrera física que le aporta protección al microorganismo a agentes estresantes como compuestos anti-tuberculosis, detergentes, radiación y otras condiciones ambientales adversas¹³. Actualmente se identifica a *M. tuberculosis* como un organismo con doble envoltura al considerar que su capa externa de lípidos es un análogo a la membrana externa que existe en las bacterias Gram negativas^{16,17}. De tal manera que la estructura de la pared celular comprende una delgada capa de peptidoglicanos ligada covalentemente a la membrana celular interna, pero a su vez enlazada con una matriz de carbohidratos arabinogalactanos, ocupando en conjunto el ahora denominado espacio periplásmico de la célula micobacteriana, para después unirse a la capa lipídica externa

formada por una serie de cadenas hidrocarbonadas de 70 a 90 carbonos llamados ácidos micólicos^{14,18,19}. Adicionalmente, también se encuentran otros componentes que decoran esta envoltura como glucolípidos de la membrana externa tales como la trehalosa monomicolato (TMM), la trehalosa dimicolato (TDM), lípidos fenólicos y glucopeptidolípidos, u otras estructuras como los lipoglicanos lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano o los fosfatidilinositol manosidos (PIMs), muchos de estos componentes con propiedades que aportan a la inmunogenicidad y virulencia de *M. tuberculosis*¹⁹ (**Figura 1.1**).

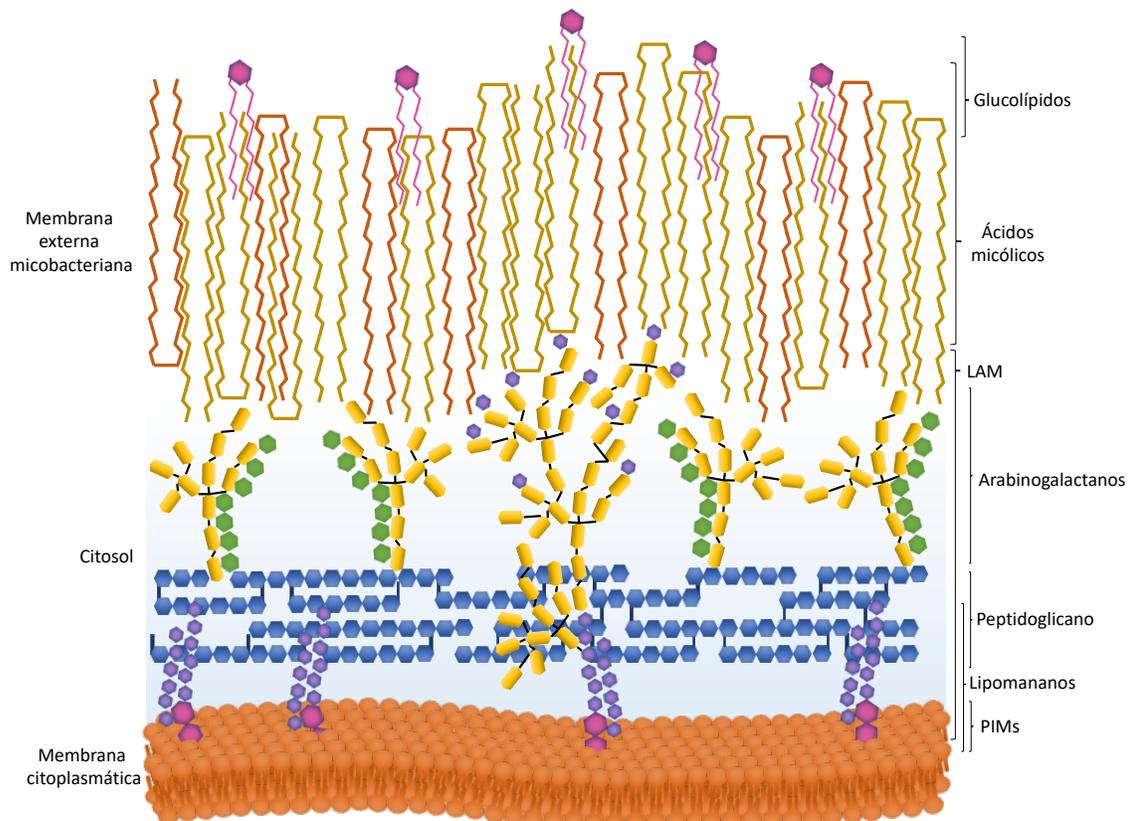


Figura 1.1. Esquemática de la pared celular de *M. tuberculosis*.

1.1.4. Factores de virulencia de *M. tuberculosis* en el proceso de infección.

Más allá de las implicaciones que tiene la pared celular de *M. tuberculosis* en la virulencia frente al hospedero y todos sus mecanismos de defensa, esta es una bacteria cuyo arsenal de estrategias

para enfrentarse a las adversidades microambientales es igualmente complejo. Se ha sugerido que durante el desarrollo evolutivo de *M. tuberculosis*, en donde ha existido una pérdida y una ganancia de material genético que a dado lugar a la actual diversidad de especies, actualmente han dado lugar a la aparición de cepas con determinantes genéticos que permitan la sobrevivencia en medios no necesariamente intracelulares, o por su parte aquellos con diversos y bien definidos factores que contribuyen a la patogenicidad²⁰. Estos determinantes conocidos como factores de virulencia son moléculas típicamente relacionados con favorecer la patogenicidad, como enzimas, proteínas de superficie o mecanismos reguladores, las cuales al eliminarlas reducen las virulencia del microorganismo. Sin embargo, no todos los autores consideran correcta esta definición argumentando que algunos genes esenciales para la sobrevivencia del microorganismo también impedirían el correcto desarrollo en su ausencia sin necesariamente estar involucrados en participar con su espectro virulento²⁰.

A lo largo de la pared celular de *M. tuberculosis* es posible encontrar toda una serie de proteínas y glicoproteínas que le aportan toda una serie de propiedades que le suman a su virulencia, incluyendo proteínas de adhesión, canales que favorecen el intercambio de solutos, o aquellas que interactúan directamente con el hospedero²⁰. Recientemente en el género *Mycobacterium* se a descrito el sistema de secreción tipo 7 o sistema ESX, una familia de sistemas de secreción compuesto por cinco miembros, el cual participa en la exportación de proteínas como el CFP10 o ESAT6 al espacio extracelular, y el que a su vez ha sido considerado como un importante elemento en la fisiopatología de la infección siendo sus principales exponentes los sistemas ESX-1 y ESX-5^{18,20}.

Uno de los microambientes que resultan un reto para *M. tuberculosis* en su intento por adaptarse a un nuevo nicho de replicación es sin duda el interior del macrófago, considerando a

esta célula del sistema inmunológico como el centinela de este microorganismo. Mientras que el macrófago responde con la producción de radicales de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS) que buscan la degradación de las micobacterias, éstas han desarrollado una serie de mecanismos de detoxificación a cargo de enzimas como la hidroperóxido reductasa AhpC, la superóxido dismutasa SodC, la catalasa KatG y la tiorredoxina TpX, lo que las cataloga como importantes factores de virulencia^{21,22}.

Para este trabajo fue de particular interés el estudio de las proteasas como factores de virulencia. En *M. tuberculosis* se han identificado poco más de 100 secuencias genómicas codificantes para diferentes proteasas, las cuales a su vez se ven involucradas en distintos procesos de regulación, metabolismo y patogenicidad²³. Dentro de las proteasas importantes en la fisiología de *M. tuberculosis* se encuentran las proteasas de serina MycP1, relacionadas con el sistema de secreción ESX-1 al participar como un procesador de los sustratos que serán exportados a través del sistema^{20,24}; por su parte las proteasas de la familia HtrA (DegP, PepD y PepA) y ClpP (ClpP1 y ClpP2) son responsables de una función tanto de chaperona, así como de participar en respuesta a condiciones ambientales de estrés degradando proteínas mal plegadas^{20,23,24}; y finalmente se puede mencionar a las metaloproteasas con su capacidad de degradación tisular y su fuerte asociación al montaje de respuestas inmunológicas inflamatorias²⁴.

1.1.5. Respuesta inmune contra *M. tuberculosis* en la tuberculosis pulmonar.

El proceso infeccioso desarrollado por *M. tuberculosis* da inicio con la aspiración de los bacilos presentes en pequeñas partículas de secreción suspendidas en el aire (aerosoles), generadas por otros individuos infectados al toser o estornudar²⁵. La respuesta inmune del hospedero inicia

entonces con la llegada de los bacilos a las vías respiratorias inferiores en donde tendrán su primer contacto con macrófagos alveolares residentes, algunos neutrófilos reclutados al sitio de infección o células dendríticas, conformando esto la primer línea de defensa^{26,27}.

Cómo se mencionó anteriormente, el primocontacto de *M. tuberculosis* se lleva a cabo con los macrófagos residentes, en donde busca la internalización y el establecimiento en un nicho de replicación, posteriormente será un proceso que se repetirá en nuevos macrófagos que sean reclutados al sitio de la infección en un constante enfrentamiento entre la eliminación del patógeno y los mecanismos de evasión de este para sobrevivir²⁸. Por su parte los neutrófilos también son una célula que resultan ideal para la replicación intracelular de *M. tuberculosis*, además de ser junto a los macrófagos importantes unidades en la conformación del granuloma²⁹, también se ha observado una importante producción de IL-10 que balancea los efectos generados por el entorno inflamatorio caracterizado por la presencia de IFN- γ e IL-6³⁰. Por su parte las células dendríticas desarrollan un papel importante en el posterior establecimiento de una respuesta inmunológica específica contra *M. tuberculosis* al ser las células responsables de llevar a cabo la presentación antigénica en los ganglios linfáticos cercanos³¹.

El contacto que *M. tuberculosis* mantiene con las células del sistema inmunológico se realiza a través de una serie de moléculas conocidas como PRRs, las cuales son un conjunto de receptores celulares encargados del reconocimiento de los microorganismos patógenos a través de sus PAMPs, con lo cual se generan eventos de señalamiento intracelular que culminan con la producción de citocinas u otros procesos celulares³². Dentro de los PRRs vinculados al reconocimiento de *M. tuberculosis* se encuentran los TLR, siendo TLR2, TLR4 y TLR9 los principales exponentes al reconocer glucolípidos de la pared celular como el LAM, LM, PIM y otras glucoproteínas, además de secuencias CpG no metiladas por parte de TLR9³³. Otros

receptores importantes son las lectinas tipo C cuyos ligandos frecuentemente son glucoproteínas, glucolípidos o simplemente polímeros de carbohidratos, y en donde se ubican el receptor de manosa (CD206), Dectin-1 y DC-SIGN³², y por otro lado están los receptores intracelulares NLR en los miembros principales asociados a una respuesta anti-tuberculosa son los inflamosomas NLRP1 y NLRP3 que tienen como repercusión de su actividad la secreción de IL-1 β e IL-18³².

Posteriormente, después de la fagocitosis de las micobacterias la respuesta inmunológica del hospedero puede diversificarse en diferentes escenarios, dependiendo de las características particulares tanto del hospedero infectado como de la cepa en cuestión, pudiendo resolver la infección si el patógeno fue efectivamente eliminado o dando pie al desarrollo de una respuesta inmune que logre contener la infección en un periodo de latencia o que evolucione en una forma activa de la enfermedad³⁴.

1.1.5.1. Establecimiento de la respuesta inmune protectora Th1 en la tuberculosis.

Como se explicó previamente, los macrófagos llevan a cabo ese primer reconocimiento de *M. tuberculosis* al llegar este a los alvéolos pulmonares, donde algunos bacilos serán eliminados mediante fagocitosis^{35,36}. Sin embargo, en ese momento distintas señales despertarán una respuesta inmune inicial lo que conlleva a la liberación de algunos mediadores como IL-1 β , TNF- α , IL-6 y algunas quimiocinas por parte del hospedero, y esto se traduce en el reclutamiento de más células al sitio inicial de la infección como neutrófilos, monocitos circulantes y células dendríticas^{26,37,38}.

Particularmente aquellas células dendríticas que lograron fagocitar al bacilo, mediante el gradiente de quimiocinas CCL19 y CCL21 pueden migrar a los ganglios linfáticos regionales

con el propósito de realizar la presentación antigénica a la población de linfocitos T vírgenes^{29,39}. La diversidad antigénica en *M. tuberculosis* es muy amplia, sin embargo su respuesta inmunológica específica se relaciona normalmente con una respuesta pro-inflamatoria, protectora o Th1⁴⁰. Con la llegada de las células dendríticas a los ganglios linfáticos se realizará la presentación de antígeno con las células T a través de los respectivos receptores MHC-II – TCR, lo que por un lado dará lugar a la secreción de IL-12 por parte de la célula presentadora de antígeno⁴¹. Esta serie de eventos son los que dan lugar a la polarización de las células T CD4⁺ al fenotipo Th1, productoras de IFN- γ ^{36,40,42}, lo que posteriormente lleva a la activación de los macrófagos, la expresión de la oxido nítrico sintasa inducible (iNOS), la maduración del fagolisosoma, e inducir la producción de péptidos antimicrobianos^{43–46}.

1.1.5.2. Estado inmunosupresor frente a la tuberculosis. El balance entre la respuesta inflamatoria responsable de los resultados protectores y la homeostasis del organismo es generalmente asociada a una respuesta inmunológica reguladora, en donde la participación de la IL-10 cobra una relevancia importante. La IL-10 es una citocina producida por macrófagos, células dendríticas, neutrófilos y células T y B, la cual se ha vinculado con una limitada respuesta inmune en contra de microorganismos intracelulares⁴⁷. En este sentido, en modelos experimentales de tuberculosis pulmonar, se ha observado como en ratones susceptibles al desarrollo de la enfermedad (CBA/J) existe un incrementado nivel de IL-10 con respecto a los niveles de IFN- γ e IL-12p40, mientras que en los modelos realizados en las cepas resistentes C57BL/6 y BALB/c apenas son detectados los niveles de IL-10⁴⁸. La participación de la IL-10 en el contexto de la tuberculosis se observa a diferentes niveles, incluyendo la inhibición de las funciones del macrófago como la maduración del fagolisosoma o la secreción de citocinas como

el TNF- α , el bloqueo de la polarización de las células T al fenotipo Th1 o la interrupción de la quimiotaxis al interferir con la quimiocina CXCL10^{29,49}. La evidencia en conjunto señala a la IL-10 como una citocina responsable de mantener controlada la respuesta contra *M. tuberculosis* o en otros casos a favorecer el descontrol de la infección, sin embargo, se ha sugerido que esta participación diferencial de la IL-10 puede estar vinculado a su inducción dependiente la cepa infectante en cada caso en particular²⁹.

En contraparte a la respuesta inmune Th1, hay evidencia que apunta a la inducción de una respuesta con carácter anti-inflamatorio del tipo Th2⁵⁰. La respuesta Th2, análogamente a lo que se mencionó anteriormente, también esta asociada a un predominio de la micobacteria sobre el hospedero, y al desarrollo de cuadros graves de tuberculosis, desarrollando inclusive la fibrosis del tejido con posteriores consecuencias⁵¹. La inhibición de la IL-4 en modelos animales de tuberculosis ha demostrado fehacientemente como su presencia está relacionada con una baja calidad de la respuesta protectora y un mal pronostico de la enfermedad⁵². La inducción de una respuesta Th2 no es propia de la naturaleza antigénica de *M. tuberculosis*, sin embargo, le presencia de anticuerpos de clase IgE y la producción de IL-4 *in vitro* ante la exposición de antígenos específicos a células T indica una indiscutible capacidad de respuesta por linfocitos T CD4⁺ Th2^{53,54}. Por otro lado, la asociación entre las modificaciones estructurales como la manosilación del LAM y la presencia de ciertos lípidos en las cepas del sublinaje Beijing, con respecto a los niveles elevados de IL-4, demuestran como la variación entre cepas pueden ser un determinante en el desarrollo de cuadros infecciosos de mayor severidad⁵⁵. Finalmente, los efectos más notorios de una respuesta inmune Th2 implica sin lugar a dudas el secuestro del centinela, el macrófago, contrarrestando su activación clásica dependiente de IFN- γ y sus

mecanismos microbicidas, y en su lugar llevándolos a una diferenciación alternativa por acción de la IL-4 y la IL-13^{56,57}.

1.2. LOS MACRÓFAGOS.

1.2.1. Monopoyesis y maduración del sistema fagocítico-mononuclear.

El sistema fagocítico mononuclear se conforma por los monocitos, los macrófagos y las células dendríticas, las cuales son células fagocíticas especializadas que forman parte esencial del sistema inmune innato, pero también aporta al sistema de defensa adaptativo⁵⁸. Convencionalmente se considera a los monocitos como el punto de partida para dar lugar a macrófagos y células dendríticas, sin embargo actualmente se conoce que existen subpoblaciones con orígenes distintos⁵⁹. Los monocitos tienen su origen en la célula madre hematopoyética (CMH) ubicada en la médula ósea^{60,61}, de donde derivan los intermediarios progenitor mieloide común (PMC), el progenitor de granulocitos y macrófagos (PGM), el progenitor de macrófagos y células dendríticas (PMD) y el progenitor de monocitos (PMo)^{59,62,63}. La monopoyesis continua con la maduración del monoblasto y el promonocito, una serie de estadios inmaduros definidos con base en sus características morfológicas como el tamaño celular superior y el citoplasma mayormente basófilo con respecto al de los monocitos, así como la presencia visible de nucléolos⁶⁴. Todo este proceso de diferenciación celular es principalmente regulado por el factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF)⁶⁵.

Finalmente este proceso concluye con la maduración de los monocitos, células redondeadas con un diámetro entre los 12 – 20 μm , con un citoplasma basófilo ligeramente grisáceo, con un granulado fino y su distintivo núcleo en forma arriñonada⁶⁴. Los monocitos son uno de los cinco tipos de leucocitos circulantes en el torrente sanguíneo, con una presencia en

circulación sanguínea entre el 5 – 10 %⁶⁶, sin embargo, son a su vez una población heterogénea de células encontrando tres diferentes de subpoblaciones con base en la expresión del receptor de LPS, CD14, y el receptor FcγRIII o CD16⁶⁷. En este sentido se encuentran los monocitos clásicos CD14⁺⁺CD16⁻ o fagocíticos, la subpoblación más abundante con hasta un 85% de presencia en circulación, expresan adicionalmente el receptor CCR2, producen altos niveles de ROS y se relacionan con un perfil inflamatorio capaz diferenciarse a macrófagos^{61,66-68}. Por su parte los monocitos no clásicos CD14⁺CD16⁺⁺, asociados a un fenotipo anti-inflamatorio, comprenden a penas el 10% de los monocitos circulantes, con una expresión adicional de CX3CR1 y MHC-II y entre sus funciones principales destaca la migración a diferentes tejidos y su diferenciación en macrófagos residentes con el propósito de compensar la pérdida de células y mantener la homeostasis^{61,67,68}. Adicionalmente, una tercer población de monocitos se describió con un fenotipo CD14⁺⁺CD16⁺, conocido como monocitos intermedios, se asocian a un fenotipo pro-inflamatorio productor de IL-1β y TNF-α, y son reclutados al sitio de infección de una manera dependiente de su receptor CCR5, junto a los monocitos clásicos⁶⁷.

Posteriormente, los monocitos presentes en la circulación sanguínea migran a los diferentes tejidos en donde llevarán a cabo su proceso de diferenciación final hacia el estado de macrófago⁶⁹. Si bien los macrófagos reclutados pueden adoptar fenotipos pro- o anti-inflamatorios, dependiendo de las necesidades del organismo, en los tejidos existe de manera anticipada una base de células fagocíticas pertenecientes al sistema inmune innato llamadas macrófagos residentes de tejido, cuyo origen es independiente del reclutamiento y diferenciación de monocitos circulantes^{61,70}. Durante la hematopoyesis embrionaria las primeras células progenitoras del saco vitelino, darán lugar a la formación de los primeros macrófagos cuyo desarrollo inicialmente será en el cerebro en lo que posteriormente se identificará como

microglía, manteniendo elevadas tasas de proliferación celular⁷¹⁻⁷³. Posteriormente la generación de macrófagos continua en el hígado fetal, de donde vía circulación sanguínea emergerán los monocitos embrionarios para establecerse como células de Kupffer en el hígado⁷⁴, células de Langerhans en la piel⁷⁵, macrófagos alveolares en los pulmones⁷⁶ y macrófagos cardíacos en el corazón⁷⁷. Para las etapas finales del desarrollo embrionario, el bazo y la médula ósea son los últimos sitios donde se permanecen los progenitores hematopoyéticos, hasta la maduración del hueso posterior al nacimiento donde la médula ósea se establece como la fuente hematopoyética definitiva⁶¹. Finalmente, aunque actualmente se sabe que los macrófagos pueden ser reclutados a las diferentes regiones anatómicas previamente mencionadas y compensar la pérdida de macrófagos residentes, también es conocido que en regiones como la dermis, el intestino y el corazón existe un recambio constante de macrófagos que derivan de monocitos, ya en una etapa adulta⁷⁸⁻⁸⁰.

1.2.2. Polarización de macrófagos y la dicotomía M1/M2.

Como se mencionó en el apartado anterior, los monocitos maduros presentes en la circulación sanguínea migrarán eventualmente a los tejidos donde finalizarán su proceso de maduración como macrófagos, con características dependientes de su necesidad⁶⁹. Actualmente los macrófagos son clasificados en dos grupos con base en una serie de características que incluye un perfil distintivo de citocinas producidas, la presencia de marcadores de membrana y la expresión de ciertos factores de transcripción⁸¹. Este proceso de diferenciación se conoce como polarización de macrófagos, y consiste en una serie de estímulos específicos que dan lugar a los macrófagos de activación clásica o M1 y en su contraparte los macrófagos activados de manera alternativa o M2⁸² (**Figura 1.2**)

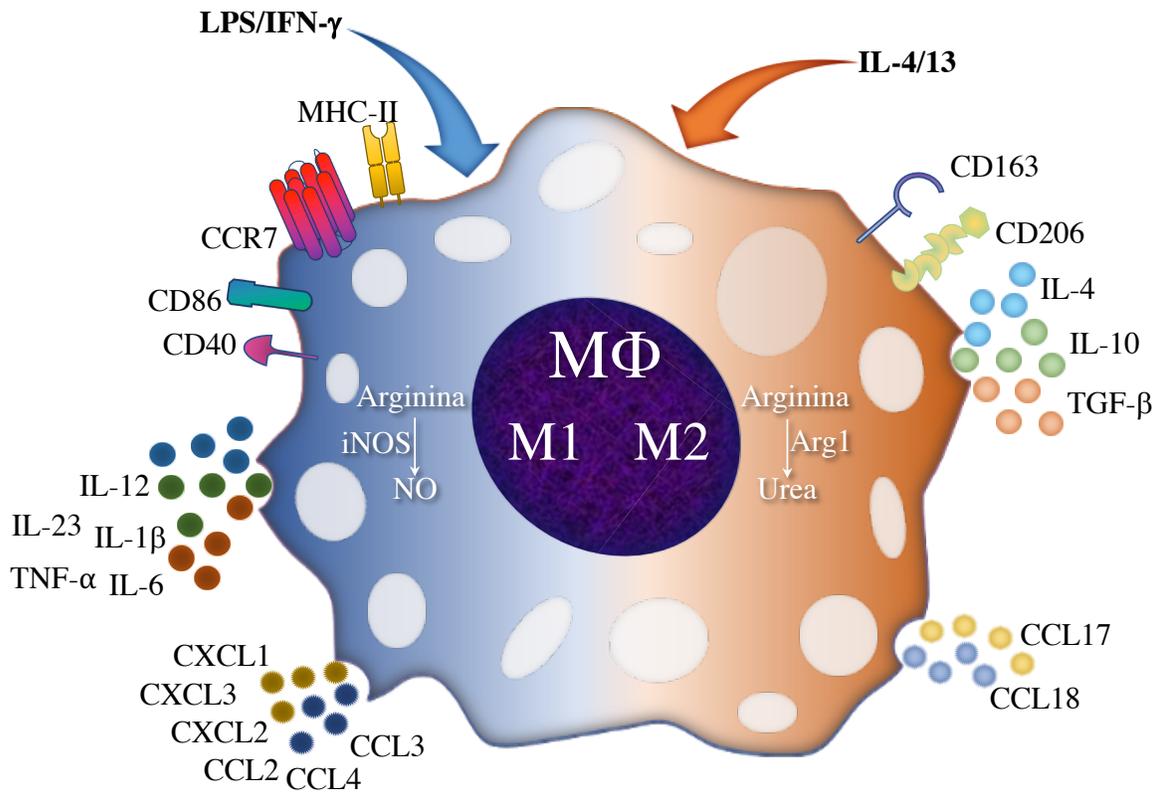


Figura 1.2. Polarización de macrófagos y la adopción del fenotipo M1/M2.

Los macrófagos M1 o macrófagos pro-inflamatorios son aquellos encargados de participar en los procesos infecciosos e inflamatorios, con una capacidad microbicida capaz de eliminar microorganismos invasores e inclusive patógenos intracelulares, asociados a una respuesta anti-tumoral eficaz y fuertemente vinculados con la respuesta inmune específica Th1^{61,83-85}. Los macrófagos M1 se caracterizan por la producción de citocinas inflamatorias como la IL-12, IL-23, IL-1β, IL-6 y TNF-α y las quimiocinas CXCL1, CXCL2, CXCL3, CCL2, CCL3 y CCL4, la expresión membranal de MHC-II, CD86, CD40 y CCR7, la producción de ROS y de RNS, y finalmente la presencia del factor de transcripción STAT1^{61,74,86-88}. Estos macrófagos M1 son generalmente asociados la respuesta inflamatoria, en donde el IFN-γ presente en el microambiente Th1 o el LPS de patógenos invasores son los estímulos clásicos

de activación del macrófago pro-inflamatorio^{86,89}. Sin embargo, se ha pronunciado una diferencia entre los macrófagos de la vía clásica activados con IFN- γ como células con la capacidad de producir IL-12, IL-1 β , TNF- α , con una incrementada expresión de MHC-II, CD80 y CD86, inducir la expresión de la iNOS para producir óxido nítrico (NO), y una capacidad aumentada de fagocitosis. Por su parte la estimulación con LPS, referida como activación innata, se detectan niveles de IL-1 β , IL-6 y TNF- α , pero bajos niveles de IL-12, una baja actividad fagocítica y la presencia del marcador de activación innata Marco. Con base en esto los macrófagos M1 clásicos e innatos han sido subcategorizados en macrófagos M1a y M1b, respectivamente⁹⁰.

Los macrófagos M2 son la contraparte de los macrófagos M1, asociados con un perfil anti-inflamatorios y con participación en procesos de recuperación, regulación y homeostasis, sin embargo también asociados en un microambiente que favorece la progresión tumoral y en aquellos procesos de infección generados en las helmintiasis⁸³⁻⁸⁵. Los macrófagos M2 a grandes rasgos son identificados por producir citocinas anti-inflamatorias como IL-4, IL-10 y TGF- β , expresar el receptor de manosa CD206 y el receptor carroñero CD163 y expresar los factores de transcripción STAT3 y STAT6, además de la arginasa 1 (Arg1), enzima implicada en el catabolismo de la arginina para la síntesis de ornitina y otros compuestos poliaminados^{61,83,84,91}. Los macrófagos M2 comprenden una subpoblación bastante heterogénea, en la que se han descrito varias subpoblaciones dependientes de estímulos, que han mostrado igualmente diferentes fenotipos⁹⁰. Por una parte los macrófagos M2a, son aquellos que se activan de una manera alternativa a los clásicos M1, utilizando como estímulo de diferenciación a las citocinas anti-inflamatorias IL-4 e IL-13, y se caracterizan por una fuerte expresión de la Arg1, expresión del CD163, CD206, DC-SIGN y Dectin-1, y su producción robusta de IL-10 y citocinas

quimioattractantes de eosinófilos, basófilos y células Th2 como CCL13, CCL8 y CCL26⁹²⁻⁹⁴. Por su parte los macrófagos M2b, inducidos por una mezcla entre LPS o IL-1 β en conjunto con complejos inmunes a través del Fc γ R, reducen los niveles de producción de IL-12, y en su lugar aumentan la IL-10 con ligeros valores detectados de TNF- α , y además aportan favorablemente a las células B productoras de anticuerpos⁹⁵⁻⁹⁷. Finalmente los macrófagos M2c, responden al estímulo de la IL-10, TGF- β o los glucocorticoides, desregulando la producción de citocinas anti-inflamatorias, y aumentando la expresión de citocinas anti-inflamatorias como la IL-10 y el receptor CD163⁹⁰.

1.2.3. El comportamiento del macrófago durante el proceso de infección.

Los macrófagos son referidos como células cruciales en el combate de la infección, sin embargo, actualmente se sabe que ante la presencia de agentes invasores y con base en lo descrito en el apartado anterior, estos pueden adoptar diferentes fenotipos cuyos comportamientos pueden ser eficaces o ineficientes para la eliminación de los microorganismos invasores^{98,99}. De manera general, una serie de estudios señala que los macrófagos adoptan en los primeros episodios de la infección un fenotipo inclinado hacia un fenotipo inflamatorio o M1, con base en la expresión de un grupo de 511 genes, llamados “la respuesta común del hospedero”, que incluyen a los genes codificantes para TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, CCL2, CCL2 y CXCL8, entre otros¹⁰⁰. No obstante, en aquellos cuadros clínicos con cronicidad del proceso infeccioso se ha observado que una de las pautas principales de este hecho se debe a la ineficiente respuesta por parte del hospedero, una respuesta que puede ser causada, si bien, por un aminorado mecanismo de respuesta por parte del sistema o por una serie de mecanismos empleados por patógeno invasor que permiten su sobrevivencia¹⁰¹.

Los macrófagos M1 son reconocidos principalmente por ser la subpoblación de macrófagos encargados de la eliminación eficiente de los microorganismos patógenos, incluyendo a los patógenos intracelulares. Estas células principalmente proceden del reclutamiento de monocitos circulantes y su posterior interacción con los estímulos del microambiente del sitio de la infección a través de sus PRRs, entre los que se incluyen algunos PAMPs como LPS, peptidoglicano o ácidos teicoicos, pero además por algunos mediadores inflamatorios como el TNF- α ⁹⁹. Los mecanismos de los macrófagos M1 incluyen la liberación de las quimiocinas CCL2, CXCL8, CXCL9, CXCL10 y CXCL11 para el reclutamiento de células Th1 y polimorfonucleares, la producción de citocinas inflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12 e IL-23⁹⁹. Sin embargo, una respuesta prolongada de este tipo se puede volver contraindicada cuando llega a tener afectaciones sobre el hospedero como se ha visto en cuadros de sepsis causados por *Escherichia coli* y *Streptococcus* sp^{98,102,103}.

A pesar de los mecanismos bien estudiados con los que los macrófagos logran la recuperación del organismo después de una infección, algunos microorganismos desempeñan ciertas funciones que permiten evadir las acciones microbicidas del macrófago⁹⁸. En *Salmonella enterica* serovar Typhimurium, por ejemplo, se describió la capacidad de la proteína SteE para inducir una polarización en los macrófagos hacia un fenotipo tipo M2 dependiente de la activación de STAT3 y la expresión de IL-10, con lo cual logra la posibilidad de mantenerse en un nicho de replicación intracelular. Con base en lo anterior, los macrófagos M2 son considerados como el fenotipo ideal de macrófagos para la invasión parasita de muchos microorganismos, considerando la ausencia de ROS y RNS que impiden su establecimiento, la fuente de glucosa disponible debido al metabolismo energético diferente de la glucólisis y la generación de compuestos poliaminados dependientes de Arg1 que son aprovechados como

nutrientes. Patógenos humanos como *Ehrlichia*, *Chlamidia*, *Coxiella* o *Borrelia* son algunas bacterias que cuya capacidad infectiva en los macrófagos se ha vinculado a la adquisición de un fenotipo de macrófago anti-inflamatorio o M2^{98,99,104,105}.

1.2.4. El binomio *M. tuberculosis*-macrófago, el punto clave en el desarrollo de la tuberculosis.

La primera interacción entre *M. tuberculosis* y los macrófagos ocurre en los pulmones al interactuar con los macrófagos alveolares, un reconocimiento a través de receptores como el CD206, CD163 o algunos receptores del complemento²⁹. Es a través de este reconocimiento que la internalización de los bacilos viene acompañada de una serie de señales que activan procesos antimicrobianos como la fusión del fagolisosoma, y la producción de ROS y NO^{28,99,106}. Este primer contacto entre las micobacterias y los PRRs del hospedero, además de activar los mecanismos mencionados anteriormente también inducen una respuesta inflamatoria innata con la producción de TNF- α , IL-1 β , IL-18, que da lugar al reclutamiento de nuevos monocitos, con su posterior diferenciación a macrófagos pro-inflamatorios de fenotipo M1, y el montaje de la respuesta específica Th1³².

A pesar de que el organismo cuenta con las herramientas suficientes para poder combatir eficazmente la infección causada por *M. tuberculosis* existen varios mecanismos en esta bacteria que le permiten evadir la adversidad en el hospedero y poder establecerse. De tal manera que se ha observado como tanto la proteína Hsp60 vía el reconocimiento por TLR2, como una forma manosilada del LAM a través del reconocimiento por el receptor CD206, inducen la secreción de IL-10 y la expresión del factor de transcripción PPAR γ , ambos clásicos marcadores de un fenotipo M2, proponiéndolos como mecanismos empleados por la micobacteria para inducir la

generación de un nicho permisible para su replicación^{107,108}. ESAT6 es otro factor de virulencia en *M. tuberculosis* con el que se ha descrito la capacidad para inducir un fenotipo de macrófago M2, asociándolo a un elemento importante para el establecimiento de la infección¹⁰⁹. Por su parte, la propia inducción de una respuesta anti-inflamatoria por parte del hospedero puede generar el entorno favorable para diferenciación de los macrófagos hacia el fenotipo M2. La citocina inflamatoria IL-37 que se ha observado con altos niveles séricos en pacientes con tuberculosis activa hasta antes del tratamiento, también se ha asociado al incremento en los niveles de expresión de los genes codificantes para IL-10, TGF- β y Arg1¹¹⁰. De tal manera que la asociación entre el fenotipo pro-inflamatorio y la contención de la diseminación del bacilo con respecto a la propagación de este en un entorno anti-inflamatorio, quedó demostrado al observar que en los granulomas no granulomatosos de pacientes con tuberculosis los macrófagos se identificaban con un fenotipo de macrófago M1, mientras que en aquellos granulomas necrotizantes y no necrotizantes las células correspondientes con macrófagos presentaban el perfil de macrófago M2¹¹⁰.

1.3. EL SISTEMA PARs-PROTEASAS.

1.3.1. Características generales de los receptores activados por proteasas (PARs).

Los receptores activados por proteasas (PARs) conforman una subfamilia de cuatro miembros dentro de los receptores acoplados a proteínas G (GPCR), incluyendo al PAR1, PAR2, PAR3 y PAR4^{111,112}. Los receptores PARs se conforman por siete dominios transmembranales con tres crestas extra- e intracelulares, un dominio amino extracelular con una longitud de 17 – 26 residuos, y un dominio carboxilo intracelular de 13 – 51 aminoácidos¹¹³. Estos receptores son particularmente reconocidos por su singular mecanismo de activación, el cual consiste en el

procesamiento proteolítico de su dominio amino extracelular, para exponer una nueva secuencia amino terminal que funciona como ligando al unirse intermolecularmente con la segunda cresta extracelular¹¹⁴.

Los PARs son diferencialmente expresados en el organismo, sin embargo destaca su expresión en tejido vascular, epitelio intestinal, sistema nervioso y leucocitos, en donde sus implicaciones fisiológicas se han visto como muy importantes^{115,116}. En origen, se describió a la trombina y a la tripsina como las proteasas que presentaban actividad sobre los receptores PARs por lo que se suponía que solo las proteasas de serina tenían la capacidad de actuar sobre estos receptores, sin embargo, actualmente existen reportes de cómo proteasas de cisteína y metaloproteasas de matriz también desempeñan una función sobre los PARs¹¹³.

Como se mencionó previamente, los PARs son activados con el procesamiento proteolítico en su dominio amino terminal. Cada uno de los cuatro receptores cuenta con un sitio de corte descrito como canónico, en el cual se ha descrito la secuencia de procesamiento e interacción así como las vías de señalamiento posteriormente implicadas. En el PAR1 la trombina realiza su escisión en el sitio LDPR⁴¹↓S⁴²FLLRN¹¹⁷, mientras que la tripsina actúa sobre el PAR2 en el sitio SKGR³⁴↓S³⁵LIGKV¹¹⁸. En el caso del PAR3 el sitio que se ha identificado LPIK³⁸↓T³⁹FRGAP corresponde a un sitio que putativamente sería cortado por la trombina, aunque no se ha podido describir una vía de señal relacionada con este corte¹¹⁹. Finalmente, en el caso del PAR4 el sitio PAPR⁴⁷↓G⁴⁸YPGQV se ha identificado por ser procesado tanto por trombina como por tripsina, además de otras proteasas como la catepsina G, plasmina y el factor X de la coagulación^{120,121} (**Figura 1.3**).

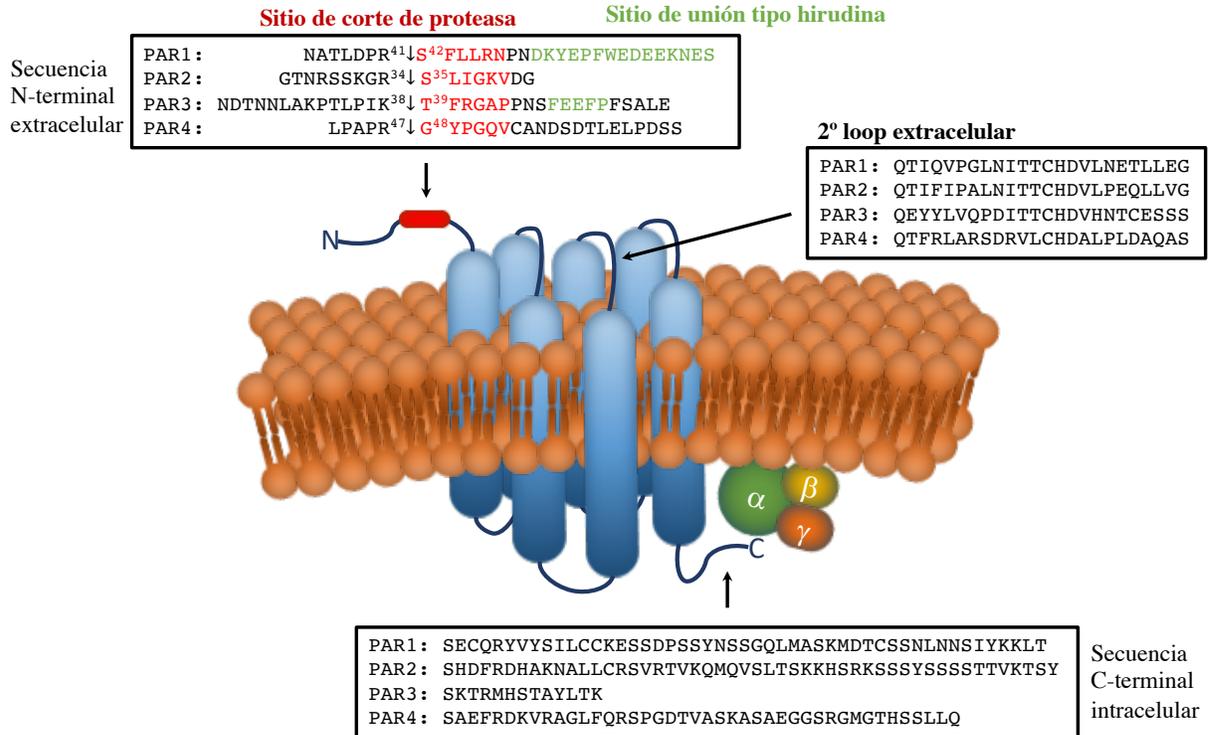


Figura 1.3. Representación esquemática de los receptores PARs.

Adicionalmente, los mecanismos de activación de los PARs también incluyen mecanismos alternativos de activación. En algunos receptores se han descrito los “sitios no canónicos” de activación mostrando que con la activación de proteasas diferentes a trombina o tripsina en PAR1 y PAR2, respectivamente, existen vías de señalamiento diferentes de las conocidas previamente¹²²⁻¹²⁴. Por su parte, los péptidos agonistas son una forma alternativa con la que se ha logrado la activación de los PARs. Estos agonistas actualmente solo se han observado funcionales para la activación del PAR1, PAR2 y PAR4, y corresponden con pequeñas secuencias de 5 – 6 aminoácidos que logran interactuar con el receptor e imitar el efecto biológico, o bien, con modificaciones en la secuencia pueden alterar el mecanismo de activación¹²⁵. Por otro lado, la coactivación de los PARs es un mecanismo descrito para la activación del PAR4, en la cual se ha descrito como la trombina unida a través de un dominio

tipo hirudina al PAR1 y PAR3, modifica su conformación lo que incrementa la afinidad por el receptor PAR4^{126,127}. La transactivación por su parte, es otro mecanismo alternativo de activación en el que un el dominio amino terminal procesado de un primer receptor actúa sobre la cresta extracelular de un segundo receptor¹²⁸. Finalmente, cuando se mencionó la existencia de sitios de corte diferentes de los sitios canónicos, también hay que destacar la existencia de sitios que contribuyen al desarme y por ende, inhibición de la activación de los PARs. Una proteasa que tenga la capacidad de procesamiento río abajo del sitio de activación, puede lograr la pérdida del ligando de activación y con ello interrumpir el posterior señalamiento de activación¹²⁹⁻¹³¹.

1.3.2. Los PARs en la inmunidad y la fisiología leucocitaria.

Los receptores PARs son una familia de receptores con funciones bien descritas en aspectos de coagulación, sistema nervioso y algunas funciones en epitelios, sin embargo, la inmunomodulación llevada a cabo con base en la activación de los receptores PARs es un tema que sigue actualmente en estudio y en donde se han encontrado como es que muchos fenómenos inmunológicos importantes pueden ser llevados a cabo dependientes de proteasas a través del procesamiento de estos receptores^{132,133}. Como se mencionó anteriormente, los receptores PARs son diferencialmente expresados en el organismo, así también las células del sistema inmune mantienen esta expresión cualitativa, con efectos igualmente particulares de la naturaleza de los diferentes tipos de leucocitos¹¹².

La expresión de PARs en neutrófilos se limita a la expresión funcional del PAR2, con variación en sus niveles de expresión entre individuos¹³⁴, mientras que la expresión del PAR1 no fue detectada^{135,136}. La activación del PAR2 en neutrófilos tiene como resultados el

incremento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, la expresión de las integrinas VLA-4 y Mac-1, favorece la producción de las citocinas IL-1 β , IL-6 e IL-8 y la secreción de lactoferrina^{137,138}. Es importante señalar a las proteasas producidas por los polimorfonucleares, la elastasa leucocitaria, la catepsina G y la proteinasa 3 como enzimas proteolíticas con capacidad de activar o desarmar los diferentes receptores PARs¹³³. Por otro lado los eosinófilos expresan un PAR1 que no responde a la estimulación con su agonista, a diferencia de un PAR2 funcional, que incrementa su expresión en individuos alérgicos^{135,136}. La tripsina activa al PAR2 presente en eosinófilos induciendo la producción de anión superóxido y degranulación^{135,136}. Las enzimas producidas por alérgenos (ácaros, hongos, polen) o por células cebadas (triptasa y quimasa) también son activadoras de PAR2 induciendo la secreción de IL-6 e IL-8¹³⁹⁻¹⁴². Mientras que en los basófilos no se detecta la expresión de ningún receptor PAR¹⁴³, en los mastocitos humanos que se localizan en amígdalas, piel y colon se expresa el receptor PAR2, el cual puede ser activado tanto por la tripsina como por el agonista peptídico induciendo la secreción de histamina¹⁴⁴⁻¹⁴⁶. Adicionalmente se ha observado la expresión de mensajero de PAR1, PAR3 y PAR4 en mastocitos humanos, aunque permanece desconocido la implicación que estos pudieran presentar¹⁴⁶. Por su parte la estimulación del PAR2 y PAR4 en la línea celular de mastocitos humanos HMC-1 induce la secreción de TNF- α ¹⁴⁷. La triptasa de mastocitos se ha observado como un importante activador del PAR2 al observar efectos sobre fibroblastos pulmonares, músculo liso, neuronas mesentéricas, queratinocitos, endotelio vascular y células peritubulares de testículo¹³⁴.

Por su parte las células T muestran niveles de expresión de PAR1, PAR2 y PAR3, las cuales al ser tratadas con trombina, tripsina, triptasa o los agonistas peptídicos de PAR1 o PAR2, mostraron niveles aumentados en la secreción de IL-6¹⁴⁸⁻¹⁵¹. Por su parte la estimulación de las

células T en la línea celular Jurkat con trombina, tripsina y los agonistas de PAR1 y PAR2 mostraron niveles incrementados de Ca^{2+} intracelular¹⁴⁸ y la fosforilación de la proteína de unión a GTP, Vav-1, y de la tirosina cinasa ZAP-70 y la proteína adaptadora SLP-76, las cuales son proteínas importantes en la señalización del TCR¹⁴⁹. Por su parte en linfocitos B se ha detectado solo la presencia de PAR4 pero las implicaciones fisiológicas de esto permanecen sin ser descritas¹⁵².

Los monocitos humanos presentan niveles de expresión de los receptores PAR1, PAR2 y PAR3 a nivel de transcrito y de PAR1 y PAR3 a nivel de proteína. La activación del PAR1 induce el incremento de Ca^{2+} intracelular, la sobrerregulación de la quimiocina MCP-1, la producción de IL-6 y estimula la proliferación celular en células U937¹⁵³⁻¹⁵⁸. Los niveles de PAR2 fueron encontradas en monocitos en vesículas intracelulares que se movilizan rápidamente a la superficie celular, dependiendo del estado de activación del monocitos¹⁵⁹. Los macrófagos derivados de monocitos expresan los mismos tres receptores PAR1, PAR2 y PAR3 a nivel de proteína y de ARN mensajero, demostrando que la activación del PAR1 y PAR2 con agonistas peptídicos inducen el incremento de Ca^{2+} intracelular, y la capacidad de inducir la expresión de MCP-1 dependiente de la activación de PAR1, pero no de PAR2¹⁵³. Los niveles de expresión de PARs se ha visto diferencialmente expresado en diferentes tipos de macrófagos residentes, observando al PAR1 y PAR2 en macrófagos alveolares, con mayor expresión del PAR1 en individuos fumadores con respecto a individuos sanos¹⁶⁰ y la presencia del PAR2 en macrófagos vasculares derivados de células espumosas sugiriendo un papel importante en el desarrollo de lesiones arterioescleróticas¹⁶¹. El PAR4, por su parte, aunque no se detectan niveles de este receptor en el sistema monocito-macrófago, se han encontrado expresados en macrófagos hepáticos¹⁶². Si bien las células dendríticas derivadas de monocitos expresan niveles

de transcrito de PAR1, PAR2 y PAR3, estas no muestran los niveles de proteína de estos mismos tres receptores. Sin embargo, en células dendríticas plasmocitoides y mieloides, la trombina mostró inducir la liberación de citocinas MCP-1, IL-10 e IL-12 en un probable mecanismo dependiente de la activación del PAR1¹⁶³.

1.3.3. Participación de los receptores PARs en la fisiopatología de la infección.

La activación de los receptores PARs se lleva a cabo por acción de diferentes tipos de proteasas, de las cuales se identifican como proteasas modelo la trombina y la tripsina, por la actividad específica sobre los receptores PAR1 y PAR2, respectivamente, sin embargo, la diversidad de proteasas que presentan un efecto sobre estos receptores no se limitan a las presentes en el organismo, sino que además muchas enzimas proteolíticas de distintos organismos pueden desempeñar una función^{133,164}. Los receptores PARs pueden ser procesados por diferentes proteasas de microorganismos patógenos y la acción sobre estos puede desencadenar un mecanismo similar al de la inmunidad innata, participando inclusive en conjunto con otros PRRs como los TLRs¹⁶⁵.

Porphyromonas gingivalis es un microorganismo Gram negativo considerado un patógeno importante de la cavidad oral asociado a cuadros de periodontitis crónica y severa¹⁶⁶. En *P. gingivalis* sus proteasas de cisteína son reconocidas desde hace tiempo por actuar sobre los receptores PARs y desempeñar varios aspectos en su virulencia. Las gingipaínas, las proteasas de *P. gingivalis*, comprenden a la gingipaína-R, la RgpA y RgpB que han mostrado una actividad diferencial sobre los receptores PAR1, PAR2 y PAR4^{137,167}. Particularmente la proteasa RgpB a través de la activación del receptor PAR2 expresado en las células KB de epitelio oral, mostró inducir la liberación de IL-6, lo que se asoció al desarrollo del estado

inflamatorio durante la periodontitis, sin embargo, posteriormente se identificó que mediante este mismo mecanismo también se logra la secreción de β -defensinas^{168,169}. Por su parte RgpA, se describió como la proteasa encargada de inducir la formación de trampas extracelulares de neutrófilos (NETs) a través de la activación del PAR2, el cual a pesar de ser unos de los mecanismos microbicidas de los neutrófilos, *P. gingivalis* logra permanecer en este entorno¹⁷⁰. Además también se describió como las gingipainas a través de la activación del PAR2 promueven la migración de microglia a los sitios de infección¹⁷¹.

Otros de los patógenos humanos importantes que utilizan como estrategias en su virulencia la activación de los PARs empleando sus proteasas son *Serratia marcescens* con la activación del PAR2 en células de carcinoma escamoso de pulmón EBC-1 por acción de la serralisina, induciendo la expresión de genes codificantes para las citocinas inflamatorias IL-6 e IL-8¹⁷². Por su parte, la proteasa de choque térmico HtrA de *Helicobacter pylori* también promueve la secreción de IL-8 en células tumorales de epitelio gástrico de una manera dependiente de la activación del PAR2¹⁷³. Así mismo, *Pseudomonas aeruginosa* emplea la proteasa LepA que tiene efecto sobre los receptores PAR1, PAR2 y PAR4, favoreciendo la inducción del factor de transcripción NF- κ B, y promoviendo la producción de IL-8 en igualmente en células EBC-1¹⁷⁴, sin embargo, *P. aeruginosa* también emplea la proteasa LasA para desarmar al receptor PAR2 y evitar el montaje de una respuesta inflamatoria local¹¹⁴.

A pesar de la evidente importancia que presentan los receptores PARs en la fisiología del proceso de infección, no existen a la fecha muchos ejemplos que expliquen los mecanismos y que ocurren en estos sistemas de PARs – proteasas.

1.3.4. Las proteasas de *M. tuberculosis* y su relevancia en la fisiopatología de la tuberculosis.

En *M. tuberculosis* se identifican poco más de 100 proteasas, las cuales se sugiere pueden desempeñar un papel en la virulencia, sin embargo, son pocas las enzimas de esta naturaleza de las que hay evidencia que desempeñan un papel vinculado con el proceso de infección²³. Dentro de las proteasas importantes para la virulencia de *M. tuberculosis* las micosinas son una familia de cinco miembros que comprenden a MycP1 – MycP5, y son proteasas que se han descrito por ser secretadas, o interaccionando en pared celular o en la membrana plasmática¹⁷⁵. Las proteasas MycP se han señalado como las responsables de procesar los sustratos que serán exportados a través del sistema de secreción ESX-1, sin embargo, la micosina MycP3 sencillamente mostró su importancia al verse de manera experimental que en ausencia de este gen se aminora el crecimiento de *M. tuberculosis*¹⁷⁶.

Las proteínas Clp son un grupo de proteasas ampliamente distribuido entre los organismos cuya función es el control de calidad de las proteínas, degradando todas aquellas que se encuentre con mal plegamiento¹⁷⁷. En *M. tuberculosis* se reconocen a las ClpP1 y la ClpP2, las cuales se han descrito como cruciales durante el proceso de infección^{178,179}. A la fecha solo la proteína RseA ha sido identificado como sustrato del complejo ClpP1/2¹⁸⁰.

Por su parte la sobrevivencia a condiciones desfavorables y la adaptación a su entorno, es uno de los principales mecanismos de evasión por parte de *M. tuberculosis*, y uno de los mecanismos empleados por este organismo se base en las proteasas HtrA1, HtrA2 y HtrA3, o también conocidas como DegP, PepD y PepA, respectivamente¹⁸¹. Estas proteasas tienen una triada catalítica conformada por serina – histidina – aspartato, y en su estructura adicionalmente poseen un dominio tipo PDZ lo que facilita su interacción con algunos sustratos¹⁸².

CAPITULO II

ANTECEDENTES

En *Mycobacterium tuberculosis* existe un amplio repertorio de proteasas cuyo papel en la fisiopatología de la tuberculosis aún faltan por ser exploradas. Uno de los mecanismos imprescindibles para el establecimiento del bacilo de Koch es sin duda la manipulación del macrófago como su célula hospedera, induciendo la polarización de macrófagos hacia un fenotipo de carácter anti-inflamatorio, como lo hacen *Salmonella enterica*, *Brucella abortus*, *Trypanosoma cruzi* o *Leishmania major*^{104,183-185}. Uno de los mecanismos planteados para inducir esta activación alternativa de los macrófagos es dependiente de la activación de los receptores PARs, en donde se ha observado que tanto el PAR1 como el PAR2 al ser estimulados con las proteasas modelo trombina, tripsina o triptasa inducen la expresión de los marcadores del fenotipo M2 como son el CD206, CD163, y la liberación de IL-4 e IL-10^{186,187}.

En este sentido, *M. tuberculosis* cuenta con muchas proteasas que podrían desempeñar este papel inmunomodulador en el macrófago dependientes de la activación de los receptores PARs. Particularmente, el gen Rv3671c codifica para la “proteasa resistente al ácido de *Mycobacterium*” o MarP, la cual presenta un dominio catalítico muy parecido al de la tripsina, lo que sugiere un mecanismo de acción similar sobre los receptores PARs¹⁸⁸.

La proteasa codificante por el gen Rv3671c o MarP es una proteasa de serina, que se ubica en la membrana interna de la micobacteria y se compone de cuatro cruces

transmembranales unidos por una secuencia espaciadora al dominio globular en donde se encuentra el sitio activo expuesto hacia el periplasma^{188,189}. MarP ha mostrado ser necesaria para *M. tuberculosis* para sobrevivir a condiciones ambientales de estrés como pH ácido, estrés oxidativo, resistencia a detergentes y antifímicos (eritromicina y rifampicina) e inclusive para sobrevivir intracelularmente en el macrófago activado por IFN- γ ¹⁸⁸⁻¹⁹⁰. La proteasa MarP ha mostrado ser un importante factor de virulencia al resultar necesario para mantener la virulencia de la cepa H37Rv en un modelo murino de infección¹⁹⁰.

CAPITULO III

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde el anuncio de *Mycobacterium tuberculosis* como el agente etiológico de la tuberculosis en 1882, muchos han sido los estudios cuyo propósito han tenido entender su biología y los aspectos fisiopatológicos que la consideran una de las bacterias mas predominantes en el mundo y causante de uno de los problemas de salud pública más antiguos en el mundo. La tuberculosis pulmonar, como la etiología mas frecuente causada por *M. tuberculosis*, es señalada por la OMS como una de las diez principales causas de muerte en el mundo y como el primer lugar dentro de las enfermedades infecciosas. En el último reporte de la OMS se describe la aparición de 10 millones de casos nuevos de tuberculosis a nivel mundial, así como la aparición de nuevos casos de resistencia farmacológica a uno o más antifímicos, lo que dificulta el combate eficaz en contra de esta enfermedad.

Como se mencionó en el párrafo anterior, entender la fisiología de *M. tuberculosis* ha sido sin duda la histórica herramienta que ha permitido empezar a controlar los aspectos patológicos y epidemiológicos de la tuberculosis, por lo que en la búsqueda de nuevos conocimientos que circunden a este microorganismo se han definido algunos elementos que resultan esenciales para su supervivencia, y que a la vez pueden jugar un papel como alternativas a probables estrategias terapéuticas.

Por otro lado, los macrófagos son una estirpe celular cuya diversidad y plasticidad de fenotipos han sorprendido. Dentro de las etiologías de carácter infeccioso, son algunos los ejemplos en los que se describen a estas células como el punto clave para la correcta progresión de una enfermedad infecciosa, siendo a la fecha no del todo conocido como es que algunos microorganismos logran la entrada y permanencia en un nicho que puede resultar favorecedor o no, dependiendo de las circunstancias. Como se ha mencionado previamente, los receptores PARs son una familia de receptores presentes en la superficie de las células del sistema fagocítico-mononuclear, y cuya evidencia señala que su activación conlleva a la diferenciación de un fenotipo de macrófagos anti-inflamatorio, un fenotipo que resulta ser permisible para microorganismos como *M. tuberculosis*.

Con base en lo anterior, en esta tesis se exploró el efecto que tiene en lo particular la proteasa MarP de *M. tuberculosis* durante el proceso de polarización de macrófagos, y considerando que al ser esta población celular un requisito indispensable para el establecimiento y desarrollo del microorganismo, presumiblemente esto revelaría un proceso esencial durante la tuberculosis. De esta manera, la descripción de las funciones de la proteasa MarP durante este proceso de diferenciación celular en los macrófagos a través de la vía específica que implica la activación de los receptores PARs, eventualmente podría traducirse en una alternativa que ayude al combate de esta enfermedad.

CAPITULO IV

JUSTIFICACIÓN

Los macrófagos son descritos como la población celular indispensable para el establecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* en el hospedero humano, sin embargo, recientemente se a puntualizado este fenómeno con mas detalle señalando que son los macrófagos con un carácter anti-inflamatorio aquellos en los que ocurre este proceso de adaptación y replicación. Aunque son distintas las vías que activan la diferenciación de un monocito a su estado de macrófago, y en consiguiente lo lleven a adoptar un fenotipo específico, previamente se ha demostrado que la acción de las proteasas de serina sobre los receptores PARs conllevan a la polarización de macrófagos hacia un fenotipo tipo M2. Por otro lado, dentro del repertorio de proteasas de serina producidas por *M. tuberculosis*, se ha planteado explorar el efecto de la serin proteasa MarP (codificada por el gen Rv3671c) cuyos efectos biológicos demuestran tener un papel importante en la supervivencia del microorganismo en el macrófago, y a su vez la evidencia teórica sugiere que esta enzima pudiera actuar sobre los receptores PARs para promover el proceso de diferenciación celular previamente planteado. En este sentido, el efecto de MarP sobre la polarización de macrófagos a través de la activación de los receptores PARs, generaría información actualmente no disponible sobre un mecanismo de acción alternativo en este factor de virulencia, implicado en el proceso fisiopatológico de la tuberculosis pulmonar.

CAPITULO V

OBJETIVOS

5.1. OBJETIVO GENERAL.

Conocer el fenotipo adquirido por los macrófagos en respuesta a la serin proteasa recombinante Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis*, asociado a la activación de los PARs.

5.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.

1. Expresar el gen Rv3671c de *M. tuberculosis* en el sistema de expresión de *Pichia pastoris*.
2. Demostrar la actividad de serin proteasa Rv3671c recombinante mediante la proteólisis *in vitro* de sustratos específicos.
3. Determinar el efecto de la Rv3671c recombinante sobre la diferenciación de monocitos humanos al fenotipo de macrófagos M1/M2.
4. Describir las vías de señalización implicadas en la polarización a macrófagos M1/M2 por la serin proteasa Rv3671c de *M. tuberculosis*.

CAPITULO VI

HIPÓTESIS

La serin proteasa codificada por el gen Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis* activa a los receptores PARs expresados en monocitos, y polariza su diferenciación a macrófagos del fenotipo M2.

CAPITULO VII

MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. MATERIAL.

7.1.1. Reactivos.

Los reactivos utilizados para la formulación de soluciones de trabajo y los solventes empleados grado biología molecular fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Los reactivos empleados en la elaboración de medios de cultivo microbiológicos y celular se adquirieron de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA) y Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), respectivamente.

Para los procedimientos de biología molecular con ácidos nucleicos, la MyTaq ADN polimerasa, los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) y el $MgCl_2$ se adquirieron de la casa comercial Bioline (Londres, Inglaterra). Los *primers* para PCR (*primers*) fueron adquiridos de Alpha DNA (Montreal, Canadá). La Platinum SuperFi ADN polimerasa, junto a las enzimas de restricción *Xho*-I, *Xba*-I, *Sac*-I, *EcoR*-I y *Eco91*-I y el antibiótico zeocina, son de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA). Por su parte, la ADN ligasa T4 y los sistemas de purificación de ADN *Pure link quick plasmid DNA miniprep kit* y *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit* fueron adquiridos de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA).

El sistema de purificación de proteínas por afinidad a níquel fue adquirido de Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, EUA), mientras que las columnas PD-10 pertenecen a la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). Para la demostración de la actividad proteolítica se utilizó el sustrato clorhidrato de N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida y el estándar 4-nitroanilina, ambos de la casa comercial Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA). La evaluación glicoproteica se realizó con la enzima PNGasa F de la casa comercial New England BioLabs (Ipswich, MA, EUA).

En lo referente a los ensayos de cultivo celular, la trombina, tripsina y LPS fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), mientras que las citocinas humanas recombinantes IFN- γ e IL-4 se obtuvieron de Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA), los factores de crecimiento GM-CSF y M-CSF de R&D Systems (Minneapolis, MN, EUA), el péptido agonista del PAR1 (SFLLRNPNDKYEPF-NH₂) adquirido en Calbiochem (Merck KGaA; Darmstadt, Alemania), y finalmente el agonista de PAR2 (SLIGKV-NH₂), y los inhibidores de PAR1 (SCH-79797) y PAR2 (FSLRLRY-NH₂) obtenidos de Tocris Bioscience (Bristol, Inglaterra).

En lo que respecta a inmunoensayos, el anticuerpo anti-C-myc y el anticuerpo secundario anti-ratón conjugado con HRP fueron adquiridos de Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EUA), mientras que los sistemas para cuantificación de citocinas por el método de ELISA OptEIA fueron adquiridos de la casa comercial Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, EUA).

7.1.2. Material biológico.

La cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue adquirida de la colección de cultivos del Centro Regional de Control de Enfermedades Infecciosas (CRCEI), de la Facultad de Medicina

de la UANL (Monterrey, N.L., México). Por su parte, las cepas de *Escherichia coli* DH5 α y *Komagataella phaffii* (*Pichia pastoris*) GS115 , así como el vector de clonación/expresión pPICZ α A, fueron adquiridos de la casa comercial Invitrogen (Waltham, MA, EUA).

Para la demostración de la actividad biológica de la proteasa recombinante producida, se purificaron monocitos humanos de sangre periférica de donadores voluntarios sanos empleando el sistema de inmunomagnetismo MACS de la casa comercial Miltenyi Biotec (Bergisch Gladbach, Alemania), así como con el uso de la línea celular de monocitos humanos THP-1.

7.2. MÉTODOS.

7.2.1. Estrategia general de clonación del gen Rv3671c y expresión de la proteína MarP.

Se realizó la extracción de ADNg de *M. tuberculosis* y se amplificó el gen de interés Rv3671c por PCR utilizando los *primers* diseñados para añadir los sitios de restricción *Xho*-I y *Xba*-I al inserto. Los sitios de restricción añadidos fueron digeridos tanto en el inserto como en el vector pPICZ α A, para posteriormente realizar la ligación y la transformación del vector recombinante en la cepa *E. coli* DH5 α , y la selección de las clonas construidas por la ganancia de resistencia al antibiótico zeocina (**Figura 7.1A**).

Los plásmidos recombinantes fueron purificados y linearizados con la enzima de restricción *Sac*-I, cuyo sitio en el vector se encuentra en la región promotora del gen de AOX1. El vector linearizado fue utilizado para transfectar la cepa de levadura *P. pastoris* GS115, en donde este se incorporó al genoma mediante recombinación homóloga. Las clonas de levaduras recombinantes fueron identificadas por su fenotipo de resistencia a la zeocina y el genotipo de sus genes de AOX1 modificados con el inserto, mediante PCR (**Figura 7.1 B**).

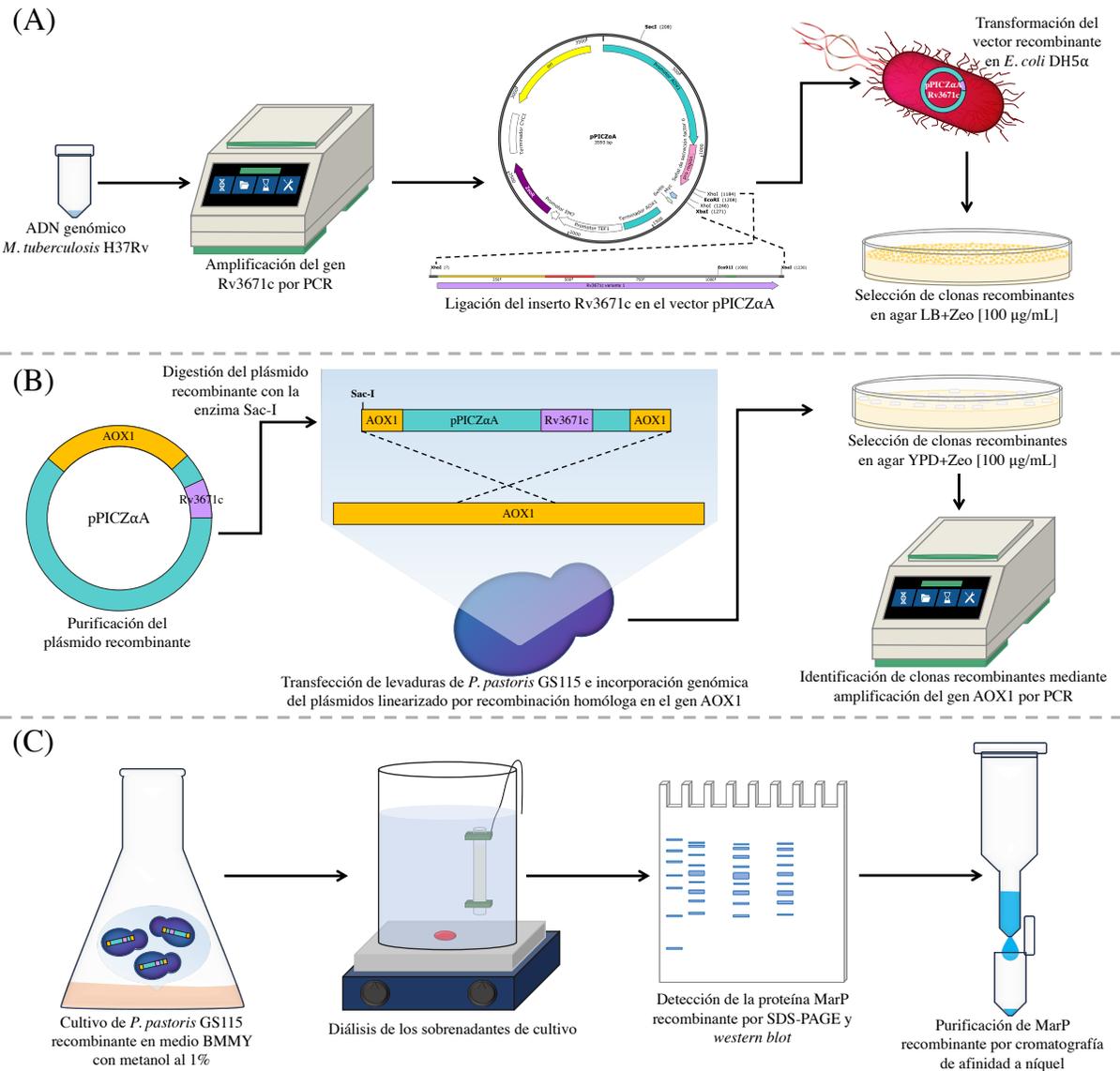


Figura 7.1. Diagrama de flujo de la clonación del gen Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis* y la expresión de la proteína MarP en *Pichia pastoris*. Esquematización de la estrategia general en los protocolos de clonación y expresión de proteína recombinante.

Las clonas recombinantes de *P. pastoris* GS115 fueron cultivadas en medio BMMY y la producción de proteínas fue inducida con MetOH [1%]. Los sobrenadantes de cultivo fueron dializados contra agua bidestilada y empleados para la detección de la proteína MarP recombinante por SDS-PAGE y *western blot*, y su posterior purificación por cromatografía de afinidad a níquel (**Figura 7.1 C**).

7.2.2. Análisis de secuencia del gen Rv3671c de *M. tuberculosis* y del vector pPICZαA para el diseño de oligonucleótidos.

La secuencia del gen Rv3671c de *M. tuberculosis* fue tomada del NCBI con el número de acceso Gene ID: 885176. La secuencia del gen de interés consta de 1194 pb, y se conforma por una secuencia codificantes para cuatro cruces transmembranales (375 pb) unida por una secuencia espaciadora (174 pb) a el dominio globular (645 pb) en donde se encuentra el sitio activo de la proteasa ubicado entre las posiciones 1009 – 1044 pb (**Figura 7.2**).

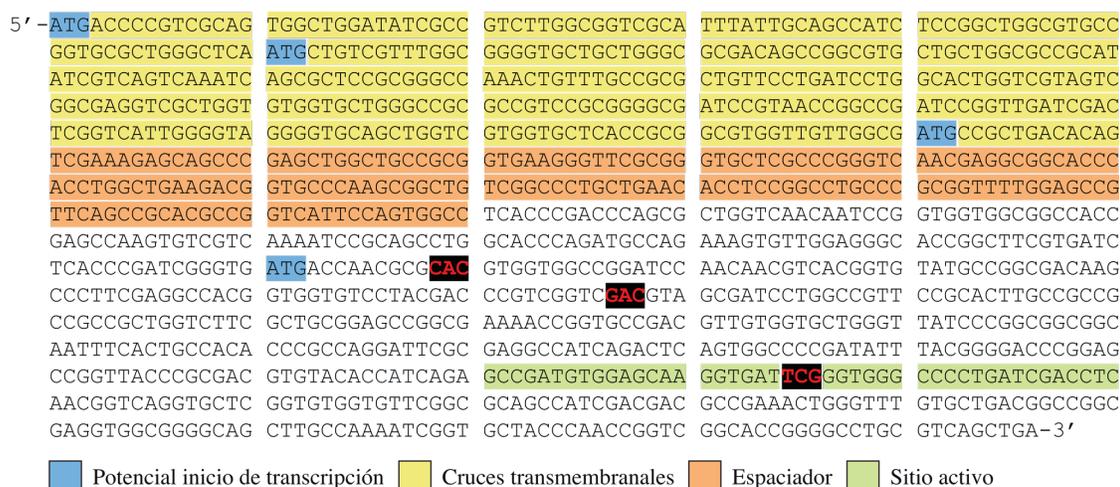


Figura 7.2. Secuencia del gen Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis*. La secuencia del gen Rv3671c de *M. tuberculosis* presenta cuatro codones de ATG en su primer marco de lectura (azul). El gen se constituye por una región transmembranal (amarillo), una secuencia espaciadora (naranja) y su sitio activo cercano a la región -3' (verde). Los nucleótidos que conforman la triada catalítica se presentan en color rojo sobre fondo negro, y corresponden a CAC (Histidina), GAC (Aspartato) y TCG (Serina).

En la secuencia del gen Rv3671c se encuentran cuatro hipotéticos sitios de inicio de la transcripción, identificados como codones de ATG en el mismo marco de lectura (**Figura 7.2**), por lo que se consideró la posibilidad de expresar esta proteína en diferentes variantes. En la **Tabla 7.1** se resumen las características respectivas de las cuatro hipotéticas variantes identificadas en el gen Rv3671c de *M. tuberculosis*.

Con base en esta información la estrategia de clonación comprendió la clonación de las variantes 1 y 3 considerando la obtención de la forma nativa de la proteína con sus dominios de transmembrana y una forma soluble en la que estos no se presentan, las cuales fueron denominadas forma transmembranal (MarP_{TM}) y forma soluble (MarP_{Sol}), respectivamente.

Tabla 7.1. Características moleculares de las variantes del gen Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis*.

Variante	Pares de bases	Aminoácidos	PM proteico	Elementos
Variante 1	1194	397	40.72 kDa	1 ^{1,2,3,4} , 2, 3
Variante 2	1104	367	37.66 kDa	1 ^{2,3,4} , 2, 3
Variante 3	834	277	28.49 kDa	2, 3
Variante 4	504	167	16.88 kDa	3

1, cruces transmembrana. ^{1,2,3,4} indica el cruce transmembranal; 2, espaciador; 3, sitio activo. PM, peso molecular.

El vector empleado en la estrategia de clonación fue el plásmido pPICZ α A, con un tamaño de 3593 pb, y el cual consta de una serie de elementos indispensables para la clonación del gen Rv3671c y la posterior expresión proteica del mismo en el sistema de levaduras (**Figura 7.3**). En el vector pPICZ α A se encuentra un promotor inducible de AOX1 (alcohol oxidasa 1) que dirige la transcripción del inserto en presencia de MetOH; una señal de secreción factor α de *Saccharomyces cerevisiae* que permite la secreción del producto recombinante al espacio extracelular; un epítipo C-myc y una cola de polihistidinas (6 \times His) que se fusionan a la proteína recombinante en su extremo -3' y son necesarias para su identificación por *western blot* y su purificación por cromatografía de afinidad a níquel, respectivamente; una región de terminación de la transcripción (TT) de AOX1 que permite un eficiente procesamiento de la región -3' del ARNm añadiendo una cola de poliadeninas para incrementar su estabilidad; los promotores de procariontes EM7 y de eucariotas TEF1 (factor de elongación de la transcripción 1) que dirigen la transcripción del gen de resistencia a zeocina en *E. coli* y *P. pastoris*, respectivamente; la

región de terminación de transcripción *CYC1* de *S. cerevisiae* que favorece un procesamiento adecuado de la región -3' del transcrito del gen de resistencia a zeocina; finalmente, un origen de replicación pUC que mantiene la replicación del vector en *E. coli*.

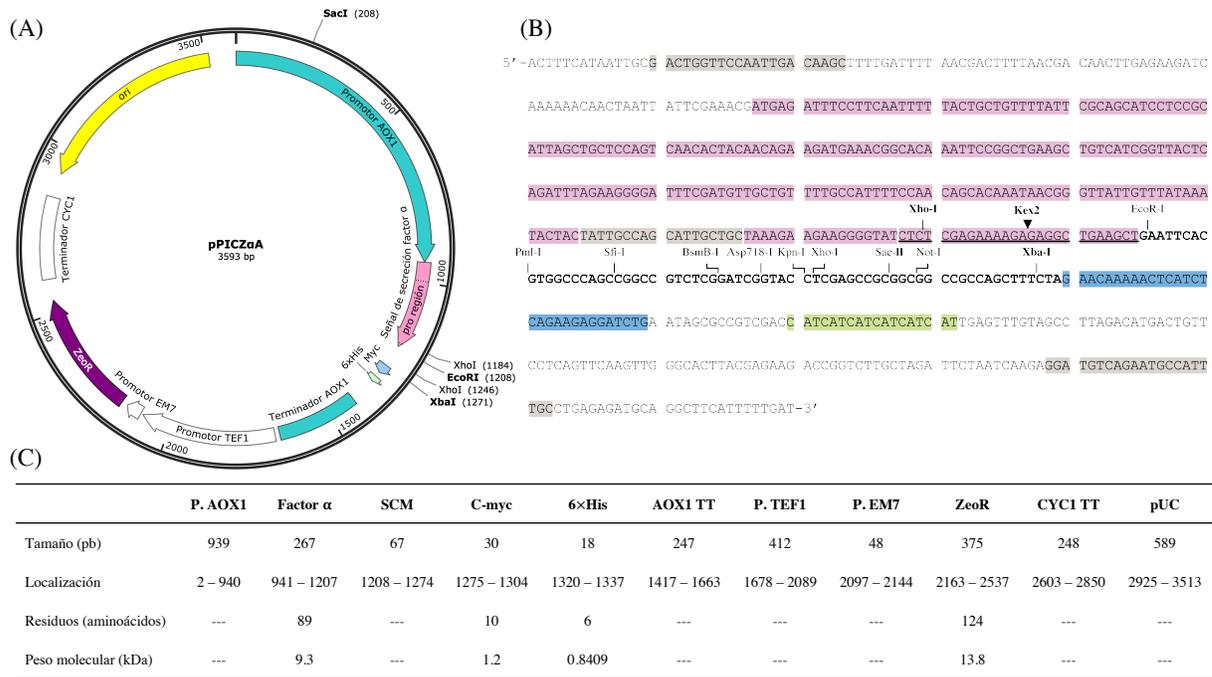


Figura 7.3. Características del plásmido pPICZ α A. (A) Orden de los elementos constituyentes del vector pPICZ α A. (B) Descripción del sitio de clonación múltiple (SCM) del vector PICZ α A. Los sitios *Xho*-I y *Xba*-I resaltados son los sitios elegidos para la clonación. La secuencia donde se ubica el sitio de *Kex2* (subrayado) fue reconstruida en los *primers*. (C) Características moleculares de los elementos que conforman el vector PICZ α A (pb, tamaño en pares de bases; aa, cantidad de aminoácidos del producto codificante; kDa, peso molecular del producto codificante).

En el sitio de clonación múltiple se seleccionaron el primer sitio de *Xho*-I y el sitio *Xba*-I para insertar el producto génico, restaurando el sitio de procesamiento de la proteasa *Kex2* en los *primers* del inserto, con el propósito de que la proteína recombinante conserve su región nativa amino terminal (**Figura 7.3**). Para discriminar entre las construcciones en donde se haya insertado el gen de interés en el primero o segundo sitio de *Xho*-I se utilizó la enzima de

restricción *EcoR*-I, la cual solo podría lograr la linearización del vector en las construcciones generadas a través del segundo sitio *Xho*-I localizado en el vector de expresión.

Con base en todo lo anterior, en la **Tabla 7.2** se muestran los primers diseñados considerados para la amplificación del producto del gen Rv3671c en su forma transmembranal (RvV1-F) y soluble (RvV3-F), añadiendo los elementos indispensables para lograr su clonación en el vector pPICZ α A.

Tabla 7.2. Primers diseñados para la amplificación del gen Rv3671c.

<i>Primer</i>	Secuencia (5' – 3')	Tamaño del producto*
RvV1-F	5' -GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGACCCCGTCGCAGTGGCTG-3'	1238 pb
RvV3-F	5' -GTATCTCTCGAGAAAAGAGAGGCTGAAGCTATGCCGCTGACACAGTCGAAA-3'	878 pb
Rv-R	5' -TGTCTAGAAAGCTGGCGCTGACGCAGGCCCG-3'	---

*El tamaño del producto empleando los *primers* RvV1-F y RvV3-F es utilizando el *primer* Rv-R en el sentido contrario.

En verde se indican los sitios de restricción añadidos en el producto de PCR *Xho*-I (CTCGAG) y *Xba*-I (TCTAGA); en amarillo la región de complementariedad entre del *primer* y la secuencia a amplificar; en la fracción naranja se indica la reconstrucción del sitio proteolítico para Kex2.

Los *primers* diseñados para el gen Rv3671c en su forma transmembranal y su forma soluble estimaron un tamaño de amplificación de 1238 pb y 878 pb, respectivamente. Las características termodinámicas de los primers para conocer las condiciones de amplificación se determinaron mediante el software SnapGene.

7.2.3. Extracción de ADNg de *M. tuberculosis*.

La extracción de ADNg de *M. tuberculosis* se realizó empleando el método de lisis enzimática /CETAB, para lo cual se resuspendió una asada con biomasa de cultivo *M. tuberculosis* H37Rv en 1 mL de SSF. La suspensión bacteriana fue inactivada en baño de agua a 80-100 °C durante

1 hora, para posteriormente centrifugar por 5 minutos a 3,000 rpm. Posteriormente se decantó el sobrenadante y la pastilla de micobacterias se resuspendió en 200 μL de buffer de lisis enzimática (Tris-HCl [20 mM], pH 8.0; EDTA [2 mM]; tritón X-100 [1.2%]) y 30 μL de lisozima [20 mg/mL], para posteriormente ser incubada por 30 minutos a 37°C. El volumen se llevó a 567 μL con buffer TE 1 \times y se agregaron 30 μL de SDS [10%] y 6 μL de proteinasa K [10 mg/mL], se mezclaron y se incubaron por 1 hora a 55 °C. Seguido de ello, se añadieron 100 μL de NaCl [5.0 M], se mezcló bien y se continuó con la adición de 80 μL de CTAB/NaCl (CTAB [10%] en NaCl [0.7 M]), previamente atemperado a 65 °C. Se mezclaron bien todos los elementos y se realizó de nuevo una incubación por 10 minutos a 65 °C.

Se añadió el equivalente de 1 volumen de cloroformo, se mezcló y se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm a 4 °C. Se separó y transfirió la fase acuosa resultante a un tubo nuevo, y se le añadió 1 volumen de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v), se mezcló y se mantuvo a temperatura ambiente hasta hacer evidente la separación de sus fases. Se continuó con una centrifugación por 10 minutos a 13,000

a 4 °C, obteniendo de nuevo una fase acuosa, y la cual fue de nuevo pasada a un tubo limpio, en donde se añadieron 0.6 volúmenes de IsopOH [100%] y el 10% (v/v) de acetato de sodio [3.0 M] (pH 5.3), se mezclaron bien y se realizó la precipitación del material genético a -20 °C, toda la noche.

Retomando el protocolo de extracción de ADNg, después de la precipitación a -20 °C la muestra se centrifugó por 10 minutos a 13,000 rpm. El sobrenadante se descartó y la pastilla se lavó con 1 mL de EtOH [70%] en frío, aplicando centrifugación por 10 minutos a 13,000 rpm y eliminando de nuevo el sobrenadante. Se dejó evaporar el EtOH residual a temperatura ambiente, sin dejar secar la pastilla en exceso. El ADNg se resuspendió en 50 μL de buffer TE

1×, y 2 µL fueron utilizados para su cuantificación y verificación de integridad mediante espectrofotometría en un NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA).

7.2.4. Amplificación del gen Rv3671c por PCR.

Para obtener el inserto para la clonación se realizó la amplificación del gen Rv3671c de *M. tuberculosis* haciendo 6 reacciones de PCR. En la **Tabla 7.3** se muestran los elementos que constituyen la reacción de PCR y en la **Tabla 7.4** las condiciones del termociclador necesarias para la amplificación del producto.

Tabla 7.3. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen Rv3671c.

	1×	[Final]
dNTPs [10 mM]	0.4 µL	[200 µM]
DMSO	1.25 µL	
ADNg	1 µL	
H ₂ O	6.35 µL	
Vol. final	9 µL	
Primer F [10 µM]	1 µL	[0.5 µM]
Primer R [10 µM]	1 µL	[0.5 µM]
Vol. final	2 µL	
H ₂ O	4.8 µL	
SuperFi ADN Pol [2 U/µL]	0.2 µL	[0.02 U/µL]
Buffer 5×	4 µL	1×
Vol. final	9 µL	

Tabla 7.4. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen Rv3671c.

Temperatura	Tiempo
98 °C	30 segundos
98 °C	10 segundos
67 °C	15 segundos
72 °C	20 segundos
72 °C	5 minutos
4 °C	∞
30 ciclos	

La enzima *Platinum SuperFi* fue la ADN polimerasa empleada para realizar la amplificación del inserto, la cual cuenta con la particularidad de generar una síntesis con una menor cantidad de errores durante la amplificación, con respecto a otras enzimas ADN polimerasas.

Las 6 reacciones de PCR se mezclaron para formar un *pool*, 5 μL se emplearon para verificar el amplicón mediante su resolución por electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos), y con 1 μL se cuantificó la concentración de producto obtenido por espectrofotometría.

7.2.5. Purificación del producto de PCR.

Para obtener un producto de PCR limpio y óptimo para el protocolo de clonación, este fue purificado cortando la banda del amplicón después de su resolución electroforética. El *kit* de purificación empleado para la purificación del inserto fue el *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit* y se utilizó siguiendo las instrucciones del fabricante.

La purificación del inserto inicia con la resolución de este en un gel preparativo de agarosa al 1% que este libre de BrEt, empleando 100 V durante 90 minutos para una adecuada separación. El gel debe cargarse, en orden, con una “reacción guía” (5 μL del *pool* de PCR + 0.1 μL de BrEt) para ubicar la altura a la que se encuentra resuelto el amplicón, 3 μL de marcador de peso molecular (*Direct Load Wide Range DNA Marker*, Sigma Aldrich), dejar un espacio vacío, formar un solo pozo con los siguientes tres espacios para añadir la muestra ($\sim 110 \mu\text{L}$ + 18 μL de BC 6 \times), dejar un segundo espacio vacío, y finalmente añadir de nuevo 3 μL de marcador de peso molecular en el último pozo (**Figura 7.4 A**).

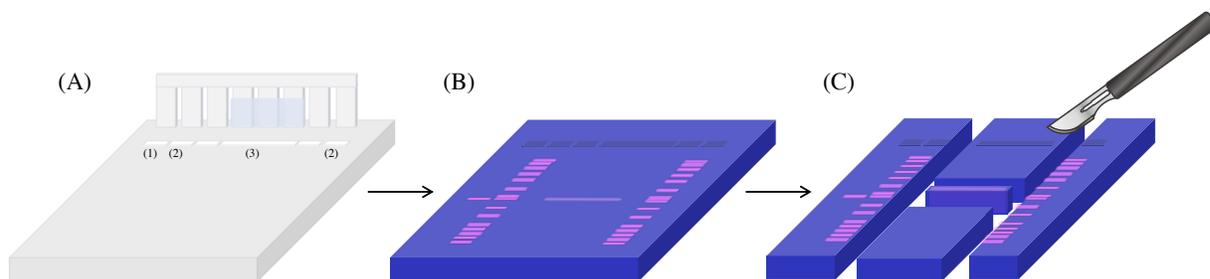


Figura 7.4. Representación esquemática de un gel preparativo de agarosa. (A) El gel preparativo es utilizado con la finalidad de obtener un solo bloque de agarosa con el amplicón para su posterior purificación, por lo que se carga: (1) reacción guía; (2) marcador de peso molecular; (3) Muestra. (B) El gel debe ser libre de BrEt por lo que la observación de la muestra será débilmente observada, en comparación con la reacción guía. (C) Tomando la reacción guía como referencia, el bloque de agarosa correspondiente a la muestra en cortado con un bisturí exponiéndolo lo menos posible a la luz UV y retirando la mayor cantidad de agarosa posible.

Después de la electroforesis y una vez que se ubicó la altura a la que se encontró el amplicón en la reacción guía (**Figura 7.4 B**), con ayuda de un bisturí se cortó el bloque de agarosa correspondiente a la muestra, retirando lo más posible de agarosa sin ADN (**Figura 7.4 C**). El bloque fue dispuesto en un tubo eppendorff de 2 mL, previamente pesado, para ser entonces pesado de nueva cuenta y calculando la diferencia de pesos saber la cantidad de agarosa que fue cortada. El bloque de agarosa se disolvió empleando el buffer de solubilización (L3) proporcionado por el *kit*, siguiendo las indicaciones de la **Tabla 7.5**.

Tabla 7.5. Proporción de volumen del buffer de solubilización L3.

Gel	Tubo	Volumen de buffer L3
< 2%	2 mL de propileno	3:1
> 2%	5 mL de propileno	6:1

Dependiendo del porcentaje de agarosa utilizado en la preparación del gel empleado en la purificación del producto de PCR, el volumen de buffer de solubilización requerido será 3 o 6 veces más el peso del bloque de agarosa (g/v).

El tubo contenedor del bloque de agarosa con buffer de solubilización fue incubado en un termoblock Accublot (Labnet; Woodbridge, NJ, EUA) a 50 °C por 10 minutos, invirtiendo el tubo en lapsos de 3 minutos. Después de lograr la completa disolución del bloque de agarosa, el tubo se incubó por 5 minutos adicionales. Se preparó la columna de purificación, colocando una columna dentro de un tubo de lavado, y a esta se le añadió todo el volumen del gel disuelto, para continuar con una centrifugación a 12,000 g por 1 minuto. Se descartó el sobrenadante del tubo de lavado y se colocó la columna de nuevo en el tubo. Se añadieron 500 µL del buffer de

lavado (W1) con EtOH a la columna y se centrifugó de nuevo el tubo a 12,000 g por 1 minuto, se decantó el sobrenadante, y de nuevo se realizó una centrifugación con la columna vacía a 14,000 g por 2 minutos para retirar los excesos del buffer de lavado de la columna. Posteriormente, la columna se colocó en un tubo nuevo (tubo colector) y se añadieron 30 µL de agua libre de nucleasas, estéril y a temperatura ambiente, en el centro del filtro de la columna y se dejó reposar por 2 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, el tubo fue centrifugado a 12,000 g por 1 minutos, se retiró la columna de purificación y del tubo con el producto purificado se tomaron 3 µL para evidenciar su integridad en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos) y 1 µL para su cuantificar la concentración.

7.2.6. Digestión doble del inserto con *Xho-I* y *Xba-I*.

Se realizó la digestión del inserto, utilizando en simultaneo las enzimas de restricción *Xho-I* y *Xba-I*, preparando las reacciones como se muestra en la **Tabla 7.6** y aplicando un *spin* para concentrar todo el volumen en el fondo de un tubo eppendorff de 200 µL. Las enzimas de restricción deberán estar siempre en exceso en las reacciones de digestión, considerando que 1 unidad de enzima de restricción es suficiente para digerir 1 µg de ADN.

Tabla 7.6. Condiciones de reacción para la digestión del inserto con *Xho-I/Xba-I*.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer Anza 10×	4 µL	1×
ADN (inserto)	Volumen necesario	
<i>Xho-I</i> [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
<i>Xba-I</i> [10 U/µL]	1 µL	10 [U/Rxn]
Volumen final	40 µL	

El volumen final de la reacción de digestión dependerá de la concentración de ADN obtenida después de la purificación, por lo que la cantidad de enzimas dependerá de igual manera, considerando siempre que estén en exceso con respecto a la cantidad de ADN en la reacción.

Las reacciones de digestión fueron entonces incubadas a 37 °C por 1 hora en el termociclador T100 (BioRad; Hercules, CA, EUA). Posterior a ello, se les aplicó un *spin* y se almacenaron a 4 °C hasta su uso en la clonación.

7.2.7. Preparación del vector pPICZ α A para clonación.

El vector pPICZ α A utilizado para la clonación del gen Rv3671c fue extraído de *E. coli* DH5 α utilizando el *kit* comercial *Pure link quick plasmid DNA miniprep kit*, fue posteriormente digerido con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Xba*-I y finalmente se purificó el plásmido linearizado empleando el método del sistema *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit*, para descartar aquellas moléculas de ADN circularizado que no se hubiesen digerido y que no fuesen a interferir como falsos positivos después de la transformación.

Para la obtención del vector pPICZ α A se sedimentaron las células de un cultivo de 4 mL de caldo LB de la cepa de *E. coli* DH5 α portadora del plásmido (el caldo fue inoculado 16 horas antes e incubado a 37 °C con 200 rpm de agitación) con 14,000 rpm por 5 minutos utilizando una centrifuga refrigerada 5418R (Eppendorff; Hamburgo, Alemania). Se continuó con la remoción del sobrenadante, la resuspensión de la pastilla de células con 250 μ L de buffer de resuspensión (R3) con RNasa, la adición de 250 μ L de buffer de lisis (L7) y la mezcla de todo lo anterior por inversión con una incubación a temperatura ambiente por 5 minutos. Posteriormente al tubo se le añadieron 350 μ L de buffer de precipitación (N4), se homogenizó la muestra por pipeteo y el lisado se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos. El sobrenadante resultante se cargó en la columna de purificación sobre un tubo colector de 2 mL y se centrifugó ahora a 12,000 g por 1 minuto. Se retiró el sobrenadante y se añadieron posteriormente 700 μ L

de buffer de lavado (W9) con EtOH a la columna, para ser de nuevo centrifugada a 12,000 g por 1 minutos, y repetir el paso de centrifugación una vez más para eliminar los restos de buffer de lavado. Por último, la columna se coloca en un tubo colector nuevo, se le agregan 30 μL de agua libre de nucleasas estéril y a temperatura ambiente justo en el centro del filtro, se deja reposar por 2 minutos a temperatura ambiente y finalmente se centrifuga a 12,000 g por 2 minutos, obteniendo el plásmido purificado. 3 μL del plásmido purificado fueron utilizados para verificar su integridad en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos) y 1 μL para cuantificar su concentración por NanoDrop 2000.

Con base en los resultados de concentración de ADNp, se realizará la digestión de este con las enzimas *Xho*-I y *Xba*-I, siguiendo el protocolo descrito en el paso 7.2.6. El producto de la digestión fue entonces resuelto en un gel preparativo de agarosa sin BrEt al 1% a 100 V por 90 minutos. Seguidamente, se cortó el bloque de agarosa correspondiente al vector linearizado con un tamaño de ~ 3.6 kb y se purificó utilizando el método del *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit*, como se describe en el paso 7.2.5. Una vez que se cuenta con el vector linearizado en los sitios de restricción *Xho*-I y *Xba*-I y este fue purificado, 1 μL es utilizado para realizar la cuantificación por espectrofotometría y 3 μL para verificar su integridad durante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

7.2.8. Ligación del inserto Rv3671c en el vector pPICZ α A.

Para la construcción del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c (en su forma transmembranal y soluble) se utilizaron el vector y el inserto digeridos por las enzimas *Xho*-I y *Xba*-I, los cuales al generar cortes cohesivos favorecen que la posición del inserto se realice en una sola dirección (Figura 7.5).

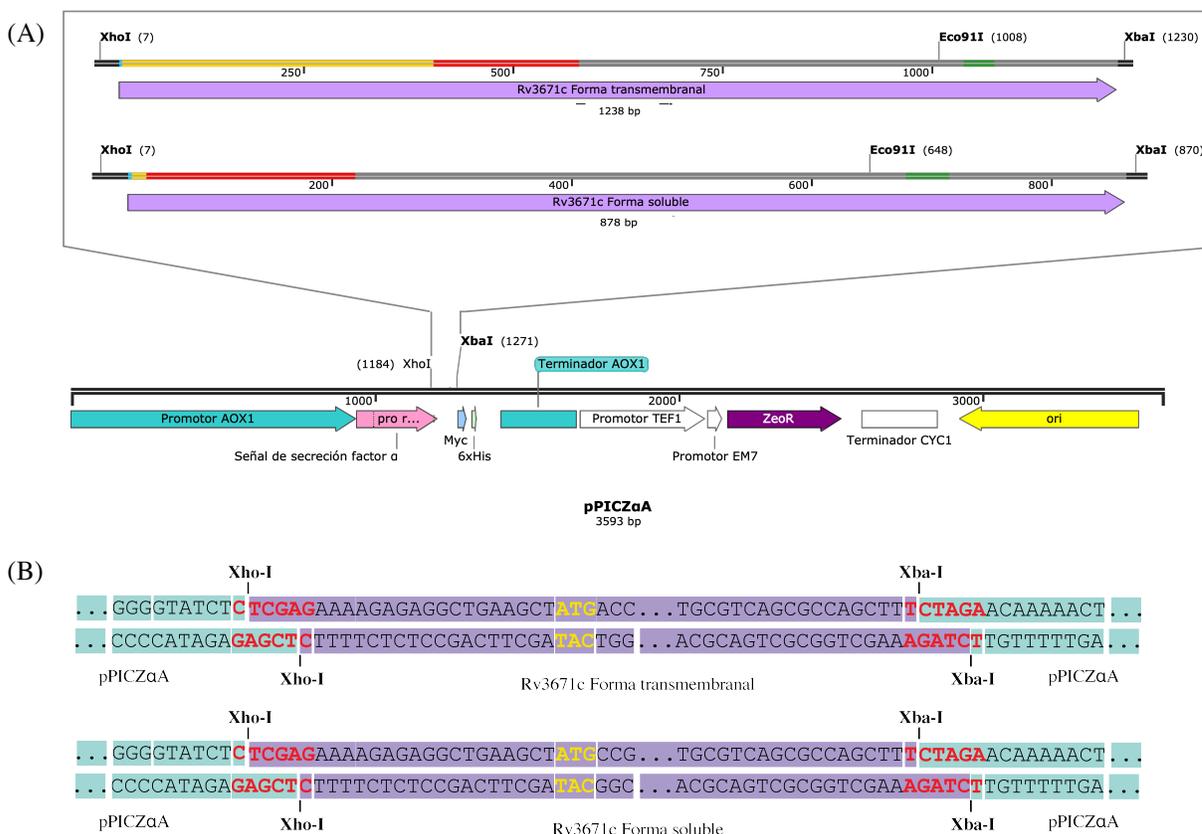


Figura 7.5. Ligación del gen Rv3671c en el vector pPICZ α A. (A) Ubicación de las secuencias del gen Rv3671c forma transmembrana y soluble en el vector pPICZ α A entre los sitios *Xho*-I y *Xba*-I. (B) Representación de la ligación entre el inserto y el vector en los sitios digeridos con las enzimas de restricción *Xho*-I (CTCGAG) y *Xba*-I (TCTAGA).

La enzima ADN ligasa T4 fue utilizada para catalizar la reacción de síntesis de los enlaces entre el inserto y el plásmido linearizado, siguiendo las condiciones de reacción indicadas en la **Tabla 7.7**.

Tabla 7.7. Condiciones de reacción para la ligación del inserto Rv3671c en el vector pPICZ α A.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer de ligación 10×	3 μ L	1×
ADN (vector)	Volumen necesario	[100 ng/rxn]
ADN (inserto)	Volumen necesario	[100 ng/rxn]
ADN ligasa T4	1 μ L	[1 U/Rxn]
Volumen final	30 μ L	

Las reacciones de ligación se prepararon manteniendo una relación molar vector:inserto 1:3 y 1:6 (v/v), partiendo siempre de 100 ng de vector linearizado. Posteriormente, las reacciones de ligación fueron incubadas a 16 °C en termociclador por 16 horas. Concluida la incubación, las reacciones se reservaron hasta su uso a -20 °C.

7.2.9. Preparación de células electrocompetentes *E. coli* DH5 α .

La captación de material genético exógeno en las células procariotas recibe el nombre de transformación cuando este fluye a través de la membrana, en células que de manera natural o artificial han sido condicionadas para dicho proceso. La electroporación es una de las formas de preparación de células bacterianas para la captación ADNp en protocolos de clonación, el cual consiste en generar una serie de poros en la membrana celular bacteriana empleando pulsos eléctricos que permitan la entrada del material genético y el establecimiento de este en el citosol.

Para la preparación de células electrocompetentes en el protocolo de clonación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c, se inició con la inoculación de una asada de cultivo sólido de la cepa de *E. coli* DH5 α en un tubo con 4 mL de caldo LB, el cual fue incubado a 37 °C, 200 rpm de agitación, por 24 horas. Posteriormente 2 mL del caldo previamente crecido fueron inoculados en un matraz (Erlenmeyer de 250 mL) con 100 mL de caldo LB, e incubar a 37 °C, 200 rpm de agitación, por un periodo de entre 2 – 4 horas, hasta alcanzar la fase logarítmica ($A_{600} = 0.4 - 0.6$). Una vez concluido el proceso de incubación, el cultivo se dividió en dos partes iguales en tubos falcon de 50 mL, y se mantuvieron a 4 °C por 15 minutos. Se continuó con una centrifugación a 4,000 g por 10 minutos para empaquetar las células, y después con una serie de lavados a las mismas, utilizando 50 y 20 mL de agua mQ estéril y fría y 20 mL de una

solución de agua/glicerol (9:1, v/v) estéril y fría, centrifugando en cada paso a 4,000 g por 10 minutos. Después del último lavado, las células se resuspendieron en 1 mL de la solución de agua/glicerol (9:1, v/v) aplicando pipeteo ligero. Finalmente, las células fueron almacenadas en alícuotas de 80 μ L a -70 °C, y hasta su uso.

7.2.10. Transformación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c en *E. coli* DH5 α .

Para realizar la electroporación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c, el producto de la reacción de ligación realizada en el paso **7.2.8**, fue precipitada mezclándola con 5 volúmenes de IsopOH [100%] a -20 °C por 16 horas. La reacción de ligación fue posteriormente concentrada por centrifugación a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, para después lavar el botón de ADN ligado con EtOH [70%] y centrifugación a 14,000 rpm por 20 minutos. Una vez culminado el paso anterior, se descartó el sobrenadante de EtOH y la pastilla de ADN se dejó secar a temperatura ambiente, para entonces ser resuspendida en 5 μ L de agua libre de nucleasas estéril. Una vez que se contaba con los elementos para el protocolo de transformación, 2.5 μ L del producto de ligación fueron mezclados en una alícuota de células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α con pipeteo ligero, para entonces cargar todo el volumen de células en una celda de electroporación de 0.2 cm y ser posteriormente pulsadas con 1,800 V en un electroporador 2510 (Eppendorff; Hamburgo, Alemania).

De un tubo con 1 mL de caldo LB se tomaron 100 μ L para añadir a la celda de electroporación y recuperar el mayor volumen posible de las células electroporadas, regresándolas de nuevo al tubo con caldo LB. El tubo con las células en medio LB fue entonces incubado a 37 °C, 200 rpm, por 2 horas para permitir la recuperación de las células electroporadas. Posteriormente, el volumen completo de células en recuperación fue depositado

en un tubo eppendorff de 1.5 mL y las células fueron empaquetadas por centrifugación a 6,000 rpm por 5 minutos. Las células fueron resuspendidas en 100 μ L de caldo LB fresco, y todo el volumen fue utilizado para plaquear las placas de agar LB+Zeo (zeocina) [100 μ g/mL], utilizando una varilla de vidrio para realizar la extensión del inóculo sobre toda la superficie del medio. Se utilizaron una serie de controles experimentales que funcionaron como respaldo del resultado obtenido del protocolo de transformación y los cuales se resumen en la **Tabla 7.8**.

Tabla 7.8. Controles experimentales en el protocolo de electroporación.

Tratamiento	Producto a electroporar
Reacción de ligación	Vector recombinante
Control de digestión	Vector digerido
Control de electroporación	Vector silvestre circularizado
Control de ligación	Vector silvestre digerido y ligado
Control de antibiótico	Agua
Control de viabilidad*	Agua

*El control de viabilidad fue plaqueado en placas de agar LB sin zeocina.

La zeocina es un antibiótico glicopeptídico perteneciente al grupo de la bleomicina, el cual posee un amplio espectro de eliminación (bacterias, hongos) cuya función es desestabilizar la estructura del ADN, características por las que es empleado como marcador de selección en vectores de clonación y expresión. Las células electrocompetentes que lograron captar el vector recombinante, ganaron la propiedad de resistencia a la zeocina, por lo que las clonas obtenidas en las placas de cultivo serán portadoras del plásmido. Después del plaqueo de las células recuperadas en las placas de agar LB+Zeo, estas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas o hasta la aparición de colonias.

7.2.11. Purificación del vector recombinante pPICZαA_Rv3671c por el método de lisis alcalina.

Después de la incubación de las placas de agar LB inoculadas con las células de *E. coli* DH5α transformadas con el producto de la reacción de ligación, y observar la presencia de colonias, estas fueron respaldadas en una nueva placa de agar LB+Zeo [100 µg/mL] inoculando cada colonia de manera independiente en un tubo con 4 mL de caldo LB+Zeo [100 µg/mL] y posteriormente en una placa de agar LB+Zeo [100 µg/mL], previamente cuadriculada (**Figura 7.6**). Los tubos y las placas fueron incubadas a 37 °C por 24 horas (los tubos fueron puestos en agitación a 200 rpm).

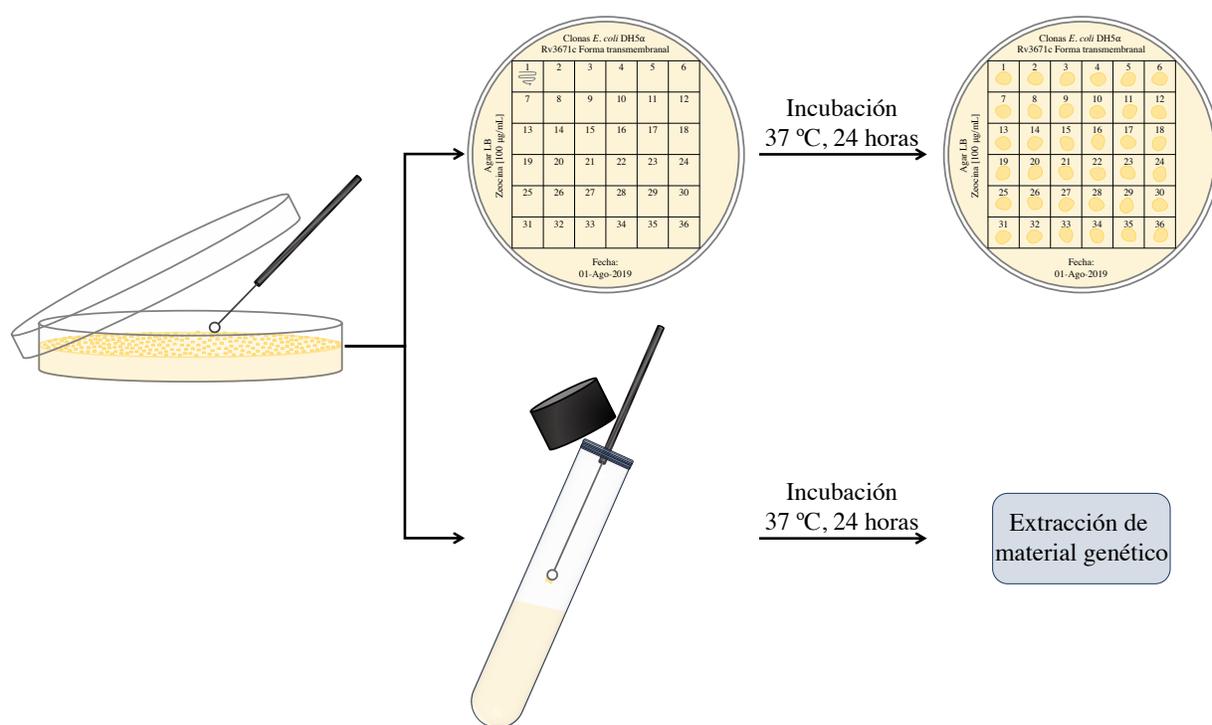


Figura 7.6. Representación esquemática del respaldo de clones recombinantes. La cantidad deseada de clones obtenidas después de la transformación serán respaldadas en una nueva placa con el mismo medio de cultivo de origen, identificando individualmente cada clona. En este protocolo, cada clona recolectada fue depositada en la placa de respaldo y posteriormente inoculada en un tubo con caldo, con la misma asada. Las clones de *E. coli* DH5α son inoculadas en medio LB+Zeo [100 µg/mL] y las de *P. pastoris* GS115 en medio YPD+Zeo [100 µg/mL].

De los tubos con el cultivo de las presuntivas clonas recombinantes, se tomaron 2 mL y se pasaron a un tubo eppendorff de 2 mL para empaquetar las células por centrifugación (6,000 rpm por 5 minutos) y continuar con el método de extracción de ADNp basado en la lisis de las células en condiciones alcalinas. El pellet fue resuspendido en 100 μ L de la solución I (glucosa [50 mM]; Tris-HCl [25 mM], pH 8.0; EDTA [10 mM], pH 8.0) fría, para entonces agitarse con un vórtex Genie 2 G560 (Scientific Industries; Bohemia, NY, EUA) por 1 minuto y posteriormente incubarse a 4 °C por 5 minutos. Seguidamente, se adicionaron 200 μ L de la solución II (NaOH [0.2 N]; SDS [1%]) recién preparada, se mezcló rápidamente por inversión cubriendo toda la superficie del tubo y entonces se incubó a 4 °C por 5 minutos. Finalmente se añadieron 150 μ L de la solución III (acetato de amonio [7.5 M]) fría, se mezcló por inversión y se incubó de nuevo a 4 °C por 5 minutos. A continuación el tubo se centrifugó a 14,000 rpm por 10 minutos, y se llevaron 500 μ L de sobrenadante a un tubo nuevo de 2 mL y se realizó una extracción con fenol-cloroformo-alcohol isoamílico (25:24:1) en una relación 1:1 (v/v), para después mezclar en vórtex por 30 segundos y centrifugar a 14,000 rpm por 10 minutos. Transferir 400 μ L de la fase acuosa a un tubo eppendorff de 1.5 mL y precipitar el ADNp obtenido agregando 2.5 volúmenes (1 mL) de EtOH (100%) frío, e incubar a -20 °C toda la noche.

Una vez concluida la precipitación, el tubo fue centrifugado a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se decantó el sobrenadante y la pastilla de ADNp se lavó con 500 μ L de EtOH [70%], sin resuspender la pastilla, y fue de nuevo centrifugado a 12,000 rpm por 10 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante, la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar los residuos de EtOH y finalmente se resuspendió en 50 μ L de agua estéril con RNasa (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA). 1 μ L del plásmido purificado fue empleado para

determinar su concentración, 3 μ L del mismo se utilizó para determinar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos), y el resto fue almacenado a -20 °C. Los plásmidos obtenidos de las clonas presuntamente recombinantes, fueron designados como CnV1/3, donde “Cn” representa la clona de *E. coli* DH5 α de la cual se extrajo el plásmido, y “V1/3” la variante de la secuencia del gen Rv3671c que se encuentra en el vector.

7.2.12. Evaluación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c mediante ensayos de restricción con las enzimas *Eco*91-I, *Eco*R-I y *Xho*-I/*Xba*-I.

Para evidenciar la formación del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c tanto de la forma transmembrana como de la forma soluble, el ADNp de las clonas en estudio fue expuesto a diferentes enzimas de restricción con la finalidad de realizar una caracterización que distinga a los vectores recombinante con respecto a los vectores vacíos. En la **Figura 7.7** se representan los mapas de los vectores recombinantes construidos, portadores de las variantes 1 y 3 del gen Rv3671c.

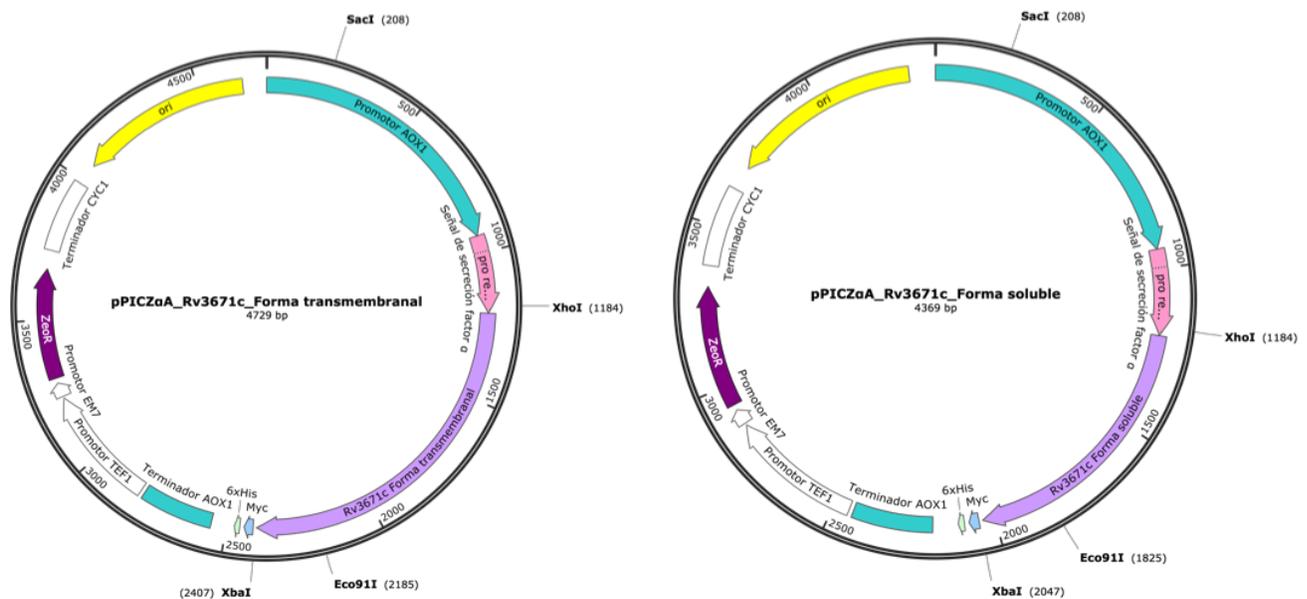


Figura 7.7. Mapa de los vectores recombinantes pPICZ α A_Rv3671c_var1/3. Esquematación de los vectores recombinantes construidos con la ligación del inserto Rv3671c (forma transmembrana y soluble) al plásmido pPICZ α A. En ambos vectores se encuentran los sitios de restricción *Xho*-I, *Xba*-I, *Sac*-I, *Eco91*-I y se pierde el sitio *EcoR*-I.

La primer manera de distinguir a los vectores recombinantes de los vectores silvestres fue demostrando la presencia del inserto, con base en la ganancia del sitio de restricción *Eco91*-I (*BstE*-II) en el nuevo plásmido (**Tabla 7.9**). El sitio de restricción *Eco91*-I es un sitio único en el inserto, próximo a su región -3', que no aparece en el vector silvestre.

Tabla 7.9. Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con *Eco91*-I.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer Anza 10×	2 μ L	1×
ADNp [1 μ g]	Volumen necesario	50 [ng/ μ L]
<i>Eco91</i> -I [10 U/ μ L]	1 μ L	10 [U/Rxn]
Volumen final	20 μ L	

La reacción de digestión fue incubada a 37 °C por 20 minutos en termociclador. Posteriormente el producto de la digestión fue resuelto en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos), en donde se apreció el tamaño del vector recombinante linearizado, de 4.7 kb y 4.3 kb para las variantes 1 y 3, respectivamente.

El sitio *EcoR*-I es uno de los sitios de restricción ubicado en el sitio de clonación múltiple del vector silvestre, posicionado entre el primer sitio de *Xho*-I y el sitio de *Xba*-I, pero antes del segundo *Xho*-I. En la **Tabla 7.10** se muestran las condiciones de reacción para la reacción de digestión con *EcoR*-I.

Tabla 7.10. Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con *EcoR*-I.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer Anza 10×	2 µL	1×
ADNp [1 µg]	Volumen necesario	50 [ng/µL]
<i>EcoR</i> -I [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
Volumen final	20 µL	

La reacción de digestión fue incubada en termociclador a 37 °C por 20 minutos, y posteriormente resuelta en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos). La linearización del plásmido recombinante con *EcoR*-I significó un resultado falso-positivo o que el inserto se localizó, erróneamente, en el segundo sitio de *Xho*-I alterando la región 5'– de la construcción. Empleando las enzimas de restricción *Xho*-I y *Xba*-I simultáneamente en el vector recombinante (**Tabla 7.11**) es posible deshacer los enlaces sintetizados por la ADN Ligasa T4, liberando el inserto de la forma transmembrana (1238 pb) o de la forma soluble (878 pb), y linearizando el vector pPICZαA (3.6 kb).

Tabla 7.11. Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con *Xho*-I y *Xba*-I.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer Anza 10×	2 µL	1×
ADNp [1 µg]	Volumen necesario	50 [ng/µL]
<i>Xho</i> -I [20 U/µL]	1 µL	20 [U/Rxn]
<i>Xba</i> -I [10 U/ µL]	1 µL	10 [U/Rxn]
Volumen final	20 µL	

Al igual que en las reacciones anteriores, para la liberación del inserto, las reacciones se incubaron a 37 °C por 20 minutos, y el posteriormente se revelaron mediante una electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

7.2.13. Linearización del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c con *Sac*-I.

Con base en la evidencia de los ensayos de restricción se seleccionaron las clonas portadoras de los vectores recombinantes, los cuales fueron entonces preparados para su transfección en la levadura metilotrófica *P. pastoris* GS115. Para este evento de modificación genética, el vector recombinante fue linearizado con la enzima de restricción *Sac*-I (**Tabla 7.12**), realizando la escisión plasmídica en el promotor de AOX1, de manera que el vector recombinante se incorpore al ADNg de la levadura durante un evento de recombinación homóloga.

Tabla 7.12. Condiciones de reacción para la digestión del vector recombinante con *Sac*-I.

	1×	[Final]
H ₂ O libre de nucleasas	Volumen necesario	
Buffer Anza 10×	5 μ L	1×
ADNp [10 μ g]	Volumen necesario	500 [ng/ μ L]
<i>Sac</i> -I [20 U/ μ L]	1 μ L	20 [U/Rxn]
Volumen final	50 μ L	

La reacción de digestión fue incubada a 37 °C por 1 hora en termociclador, y continuó con un periodo de 30 minutos a 65 °C para la inactivación enzimática de *Sac*-I. 5 μ L de la reacción de digestión fueron visualizados en un gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos) para evidenciar la linearización del plásmido, mientras que el resto de la reacción fue precipitado añadiendo 0.1 volumen de acetato de sodio [3 M] (~4.5 μ L, v/v) y 2.5 volúmenes de EtOH [100%] (~112.5 μ L, v/v), con una incubación de 16 horas a -20 °C. Posterior a la precipitación, el tubo fue centrifugado a 14,000 rpm por 30 minutos a 4 °C, se descartó el sobrenadante, y la pastilla de ADN se lavó con 200 μ L de EtOH [100%] frío centrifugando a 14,000 rpm por 20 minutos a 4 °C. A la pastilla de ADN se le retiró el sobrenadante y se dejó secar a temperatura ambiente para eliminar los residuos de EtOH. Por último, la pastilla fue resuspendida en 10 μ L

de agua libre de nucleasas estéril, y almacenada a -20 °C hasta su uso en el protocolo de transfección.

7.2.14. Preparación de células electrocompetentes de *P. pastoris* GS115.

Al igual que las células de *E. coli* DH5 α , las células de *P. pastoris* GS115 fueron preparadas la captación del material genético por electroporación, en un procedimiento ahora llamado transfección. La transfección es el procedimiento de incorporación de material genético exógeno en células eucariotas.

Para la preparación de levaduras electrocompetentes se inició con la inoculación de una asada de cultivo de *P. pastoris* GS115 en un tubo con 4 mL de caldo YPD, incubado a 30 °C, 200 rpm, por 24 horas. Posteriormente, 500 μ L del cultivo se inocularon en un matraz Erlenmeyer de 250 mL con 100 mL de caldo YPD, y se incubó en agitación (200 rpm) a 30 °C hasta haber alcanzado la fase logarítmica ($A_{600} = 1.3 - 1.5$) en un periodo de tiempo aproximado de 18 horas.

Después del crecimiento, el cultivo de levaduras fue dividido en dos partes iguales en tubos falcón de 50 mL e incubados a 4 °C por 15 minutos, para después continuar con el empaquetamiento de las células a 1,500 g por 5 minutos, a 4 °C. Se eliminó el sobrenadante y las levaduras se lavaron con 50 mL de agua mQ estéril y fría, se centrifugó a 1,500 g por 5 minutos, a 4 °C. Se continuó con otro lavado igual, pero con 20 mL de agua mQ, y posteriormente uno más con 20 mL de sorbitol [1 M] estéril y frío, con las mismas condiciones de centrifugación. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 1 mL de la solución de sorbitol [1 M]. Las células fueron utilizadas en el proceso de transfección ese mismo día.

7.2.15. Transfección de levaduras *P. pastoris* GS115 con el vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c.

El vector recombinante digerido fue transfectado en *P. pastoris* GS115 mediante electroporación. 5 μ L del plásmido digerido fueron resuspendidos en una alícuota de levaduras electrocompetentes, homogenizadas con pipeteo suave, y posteriormente fueron transferidas a una celda de electroporación de 0.4 cm y pulsadas con 1,500 V en un electroporador 2510. Las células pulsadas fueron entonces recuperadas con 100 μ L de sorbitol [1 M] frío, depositadas en un tubo falcón de 15 mL con 900 μ L de la misma solución de sorbitol, e incubadas a 30 °C por una hora y sin agitación. A continuación, se les añadió 1 mL de caldo YPD fresco a las levaduras, y se incubaron a 30 °C por 3 horas a 180 rpm para favorecer su recuperación. Las células fueron posteriormente concentradas por centrifugación a 1,500 g por 5 minutos y a 4 °C, para ser luego resuspendidas en 500 μ L de YPD fresco. Volúmenes de 200 μ L y 100 μ L de levaduras electroporadas fueron utilizados para inocular placas de agar YPD+Zeo [100 μ g/mL]. Además de los tratamientos problemas, también se añadieron los controles de viabilidad y de antibiótico, como en el protocolo de transformación de *E. coli* DH5 α (**Tabla 7.8**). Las placas fueron incubadas a 30 °C hasta la aparición de colonias en un periodo de tiempo de 48 – 72 horas.

7.2.16. Extracción de ADNg de las clonas recombinantes de *P. pastoris* GS115 para su genotipificación por PCR y secuenciación.

Las clonas de *P. pastoris* GS115 recombinantes fueron respaldadas en placas de agar YPD+Zeo [100 μ g/mL] (**Figura 7.6**) e inoculando además cada clona en tubos con 4 mL de caldo YPD+Zeo [100 μ g/mL], para después ser incubados a 30 °C por 24 y 48 horas (agitación a 200 rpm) en tubos y placas, respectivamente. Cada clona obtenida después del protocolo de

transfección, fueron denominadas Cn.mV1/3, donde “n” indica la clona de *E. coli* DH5 α recombinante de procedencia, “m” la clona de *P. pastoris* GS115 recombinante seleccionada y “V1/3” la variante del gen Rv3671c presente en la clona.

Del cultivo líquido de las clonas de *P. pastoris* GS115 seleccionadas se tomaron 2 mL para la extracción de su ADNg mediante el método de TSNT (tritón X-100, SDS, NaCl, Tris-HCl). Las células fueron empaquetadas por centrifugación a 13,000 rpm por 1 minuto y entonces el botón celular fue resuspendido con 200 μ L del buffer TSNT (tritón X-100 [2%]; SDS [1%]; NaCl [100 mM]; Tris-HCl [10 mM]; EDTA [1 mM]) y homogenizado con vórtex por 30 segundos. Posteriormente se añadieron 200 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1, v/v/v) y se mezclaron en vórtex por 5 minutos con agitación vigorosa, para después adicionar 300 μ L de buffer TE 1 \times , se mezclaron por 30 segundos en vórtex y se centrifugaron a 13,000 rpm por 7 minutos. 400 μ L de la fase acuosa se transfirieron a un tubo eppendorff de 1.5 mL y se mezclaron con 2.5 volúmenes (1 mL) de EtOH [100%] frío para precipitar el material genético a -70 °C. 16 horas posteriores al inicio de la precipitación, el tubo fue centrifugado a 14,000 rpm por 30 minutos y 4 °C para concentrar el ADNg obtenido, después la pastilla resultante fue lavada con 500 μ L de EtOH [70%] frío y centrifugación a 14,000 rpm por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante y la pastilla se dejó secar a temperatura ambiente. Una vez eliminados los remanentes de EtOH, la pastilla fue resuspendida en 50 μ L de agua libre de nucleasas estéril, con RNasa. El producto genómico obtenido fue cuantificado en un NanoDrop 2000 y su integridad se verificó en una electroforesis en gel de agarosa al 1% (100 V, 40 minutos).

Para poner en evidencia la construcción de las clonas recombinantes de *P. pastoris* GS115 se amplificó el gen de la AOX1 por PCR, empleando los primers AOX1-F, AOX-1-R y Factor α diseñados para la caracterización del plásmido pPICZ α A (**Tabla 7.13**).

Tabla 7.13. Primers diseñados para la amplificación del gen AOX1.

<i>Primer</i>	<i>Secuencia (5' – 3')</i>
AOX1-F	5' –GACTGGTTCCAATTGACAAGC–3'
AOX1-R	5' –GCAAATGGCATTCTGACATCC–3'
Factor α	5' –TACTATTGCCAGCATTGCTGC–3'

El gen de AOX en *P. pastoris* GS115 codifica para la alcohol oxidasa, una enzima encargada de catalizar la descomposición del MetOH en formaldehído y peróxido de hidrógeno. Existen dos variantes del gen AOX, de las cuales el gen AOX1 es transcrito en mayor medida con respecto a la variante AOX2. Las condiciones de PCR para la síntesis de los genes de AOX1 se muestran en la **Tabla 7.14** y las condiciones de amplificación en la **Tabla 7.15**.

Tabla 7.14. Condiciones de reacción de PCR para la síntesis del gen AOX1 recombinante.

	1×	[Final]
Buffer 5×	5 μ L	1×
ADNg	0.5 μ L	
H ₂ O	7.5 μ L	
Vol. final	13 μL	
Primer F [10 μ M]	1 μ L	[0.4 μ M]
Primer R [10 μ M]	1 μ L	[0.4 μ M]
Vol. final	2 μL	
H ₂ O	9.75 μ L	
MyTaq ADN Pol [5 U/ μ L]	0.25 μ L	[0.05 U/ μ L]
Vol. final	10 μL	

Tabla 7.15. Condiciones de reacción de PCR para la amplificación del gen AOX1.

Temperatura	Tiempo
95 °C	1 minuto
95 °C	15 segundos
59 °C	15 segundos
72 °C	10 segundos
72 °C	3 minutos
4 °C	∞
30 ciclos	

Los productos obtenidos fueron resueltos en una electroforesis en un gel de agarosa al 1% (100V, 90 minutos). En la cepa silvestre de *P. pastoris* GS115, al amplificar el gen de AOX1 con los *primers* mencionados en la **Tabla 7.13** se obtiene un producto de PCR con un tamaño de 2.2 kb, sin embargo, con la transfección del vector recombinante pPICZ α A_Rv3671c y la inserción al gen AOX1 cromosómico por recombinación homóloga, aparece una segunda banda que presentó un tamaño de 1,725 pb y 1,365 pb para las variantes 1 y 3, respectivamente (**Figura 7.8**).

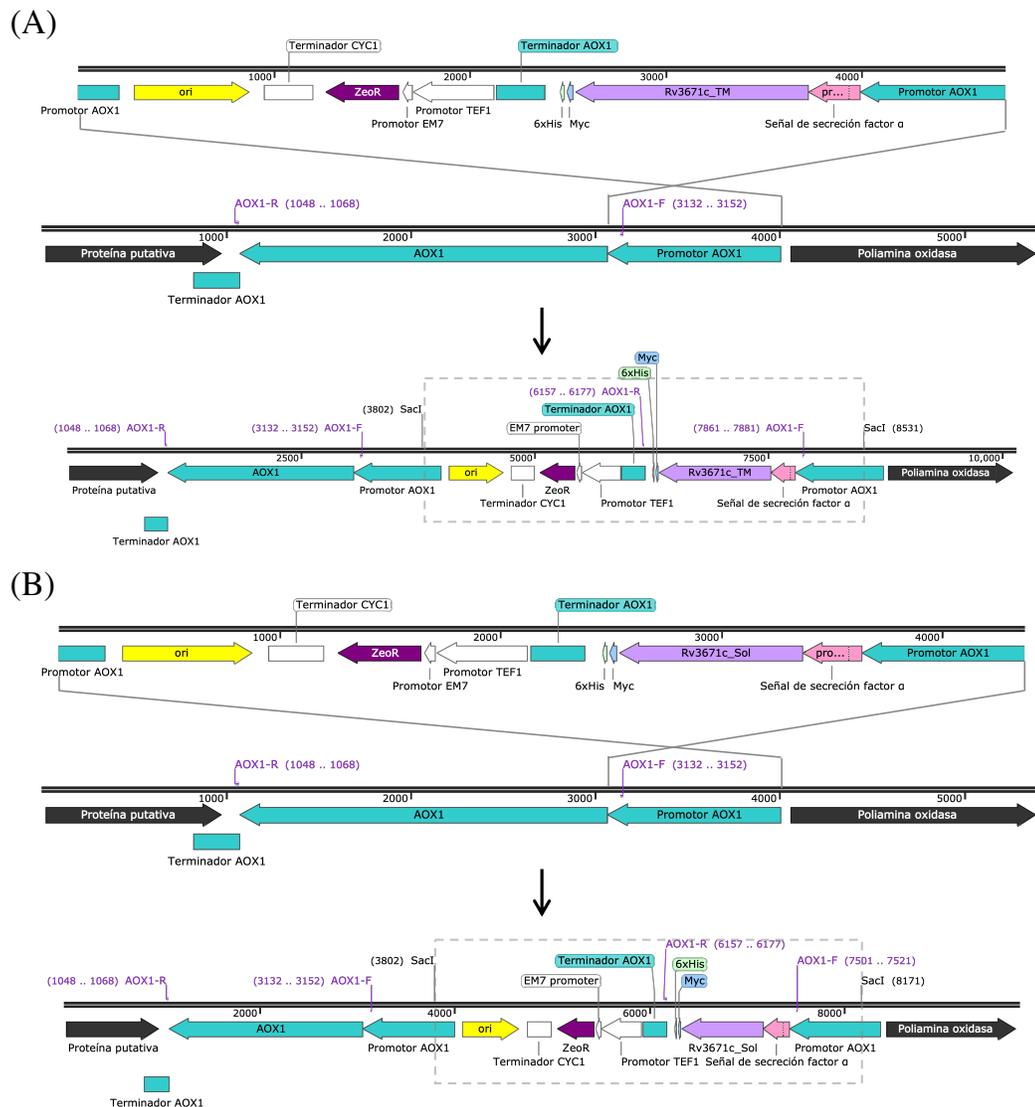


Figura 7.8. Inserción de la construcción pPICZ α A_Rv3671c en el promotor AOX1 por recombinación homóloga. Las construcciones (A) pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y (B) pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} son linearizadas con la enzima *Sac*-I y entonces son insertados en el promotor genómico de *P. pastoris* GS115 mediante recombinación homóloga, añadiendo todo el *cassette* de expresión de la proteína recombinante.

Las condiciones de PCR anteriormente descritas fueron utilizadas para la amplificación del producto empleando los *primers* Factor α (Tabla 7.13) y Rv-R (Tabla 7.2), de la cual se obtuvieron los amplicones de 1272 pb y 912 pb, para las variantes 1 y 3 respectivamente. Realizando seis reacciones de cada una variante, estas fueron purificadas utilizando el *Pure link quick gel extraction and PCR purification combo kit*, y realizando el protocolo descrito en el paso 7.2.5, el producto obtenido fue resuspendido en 30 μ L de agua libre de nucleasas estéril. Para verificar que los *cassettes* de expresión se encontraran en fase de lectura en el genoma de *P. pastoris* GS115, el producto amplificado anteriormente fue enviado a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México, para su secuenciación y posterior análisis de las secuencias construidas.

7.2.17. Fermentación de las cepas recombinantes de *P. pastoris* GS115 con 1% de MetOH.

De las clonas evaluadas y analizadas previamente, se seleccionaron aquellas que presentaron el genotipo portador del gen Rv3671c en su forma transmembrana y soluble. Para inducir la producción de proteínas recombinantes, se inoculó una asada de cultivo sólido en tubos falcon de 15 mL con 5 mL de caldo YPD+Zeo [100 μ g/mL] y se incubaron a 30 °C con una agitación de 230 rpm de agitación. Después de 24 horas de incubación los cultivos presentaron una densidad óptica de $A_{600} = 0.5 - 0.7$, y entonces las células fueron concentradas por centrifugación a 5,000 g por 5 minutos y posteriormente resuspendidas en 100 μ L de caldo YPD fresco. Se emplearon 10 μ L de células resuspendidas para inocular cada tubo falcon de 50 mL con 5 mL

de medio BMGY, y este fue posteriormente incubado a 30 °C con 230 rpm de agitación durante un periodo de 48 horas, para permitir el desarrollo de una cantidad considerable de biomasa. Una vez que se transcurrido el periodo de incubación del cultivo en medio BMGY, se verificó su densidad óptica de entre $A_{600} = 2 - 6$, para posteriormente empaquetar las células y realizar un lavado de las pastillas de levaduras con 4 mL de medio BMMY empleando centrifugación de 5,000 g por 5 minutos, esto con la finalidad de retirar los restos de glicerol que pudiesen encontrarse. Las pastillas de levaduras fueron resuspendidas en 500 μL de medio BMMY, y entonces se inoculó un matraz Erlenmeyer de 250 mL que contenía 25 mL de medio de inducción de proteínas BMMY con 750 μL de células para alcanzar una densidad óptica cercana a $A_{600} = 1.0$. El cultivo en el matraz fue incubado por 5 días a una temperatura de 30 °C con agitación de 230 rpm, y su crecimiento fue monitoreado realizando una lectura de la densidad óptica del cultivo a una longitud de onda de 600 nm. Para mantener la inducción de proteínas, cada 24 horas se añadieron 250 μL de MetOH [100%] al cultivo, para alcanzar una concentración final de MetOH al 1%.

Al finalizar el periodo de incubación de la fermentación, los cultivos fueron transferidos a tubos falcon de 50 mL y fueron centrifugados a 5,000 g por 5 minutos para obtener el sobrenadante, y estos ser finalmente reservados a 4 °C, hasta su utilización.

7.2.18. Diálisis del sobrenadante de cultivo.

Para retirar sales presentes en el medio, péptidos contaminantes pequeños y otros solutos, el sobrenadante obtenido previamente fue dializado por 24 horas contra agua bidestilada, empleando membranas de diálisis de 12 – 14 kDa (Spectrum; New Brunswick, NJ, EUA). La diálisis se llevó a cabo a 4 °C manteniendo una agitación constante, realizando un cambio de

agua después de las primeras 12 horas. El sobrenadante dializado obtenido fue reservado y se mantuvo a 4 °C.

7.2.19. Determinación de la concentración de proteínas.

Para determinar la concentración de proteínas después del protocolo de fermentación, se utilizó el método de cuantificación de proteínas de Pierce, el cual se fundamenta en la reducción del ión Cu^{2+} al Cu^{1+} por acción de las proteínas cuando estas se encuentran en medio alcalino, y la posterior quelación del Cu^{1+} por dos moléculas de BCA, formando un complejo hidrosoluble de color púrpura cuya absorbancia se detecta a 562 nm, y el cual es directamente proporcional a la cantidad de proteínas presentes en la muestra¹⁹¹.

Para determinar la concentración de proteínas en la muestra de interés, se construyó una curva de calibración utilizando albúmina sérica bovina (ASB), como proteína estándar, en un rango de concentración de 15.6 a 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ debido al rango lineal del método (20 a 2,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Posteriormente, para preparar el reactivo de trabajo se realizó una solución mezclando 50 partes de la solución A con 1 de la solución B (50:1 v/v, A:B). A continuación, en una placa de 96 pozos (Corning; Corning, NY, EUA) se depositaron 25 μL de cada muestra, estándares y blanco de reactivo, por duplicado, y se mezclaron con 200 μL del reactivo de trabajo. La placa se agitó por 30 segundos y entonces se incubó a 37 °C por un periodo de 30 minutos, para después realizar las lecturas de absorbancia en el lector de microplacas iMark (BioRad; Hercules, CA, EUA) a una longitud de onda de 595 nm. Los resultados de concentración fueron calculados empleando la ecuación de la recta obtenida a partir de los datos de absorbancia de la curva estándar.

7.2.20. Precipitación de proteínas totales con MetOH/cloroformo.

Con base en la información proporcionada en la cuantificación de proteínas, ~3.5 mg de proteína de los dializados (4 mL) fueron transferidos a un tubo falcon de 15 mL, se precipitaron añadiendo 1.5 volúmenes de MetOH [100%] y 1 volumen de cloroformo, y se mezclaron por inversión. El tubo fue centrifugado a 12,000 rpm por 90 segundos a temperatura ambiente. Después de la centrifugación se descartó la fase orgánica de la capa superior sin alterar la interface de proteínas, agregando posteriormente un volumen de MetOH [100%]. El volumen total de proteínas resuspendidas fueron concentradas en tubos de 1.5 mL por centrifugación a 14,000 rpm por 3 minutos y a 4 °C. La pastilla de proteína se dejó secar a temperatura ambiente, sin dejarla secar en exceso, entonces se resuspendió en 80 µL de buffer Laemmli [2×] y 8 µL de β-ME [10×] y posteriormente las muestras se calentaron a 95 – 100 °C por 5 minutos en termoblock. Las muestras fueron almacenadas a -20 °C hasta su empleo.

7.2.21. Determinación de MarP recombinante por SDS-PAGE y *western blot*.

Para evidenciar la presencia de la proteína de interés en el sobrenadante obtenido de cultivo de las levaduras, se realizó la técnica de electroforesis en gel de poliacrilamida con duodecil sulfato sódico (SDS-APGE) cuya demostración de la proteína de interés se basa en la separación de proteínas con base en el peso molecular de las mismas, además de hacer uso del inmunomarcaje por *western blot* con base en la presencia del antígeno C-myc con el cual que fue construida.

Para este ensayo, 10 µL de proteína fueron cargados en un gel de poliacrilamida [15%], con 3 µL de marcador de peso molecular, y fueron resueltos a 150 V por 2 horas y en frío. Se utilizó como control negativo las proteínas de sobrenadante de cultivo de la cepa silvestre de *P. pastoris* GS115. Una vez concluida la electroforesis el gel fue retirado y sumergido en buffer

de tinción con azul de Coomassie (azul de Coomassie R250 [0.5%]; MetOH:ácido acético:agua 50:10:40, v/v/v) y mantenido en agitación por 1 hora, para posteriormente retirar el exceso de colorante con la solución de desteñido (MetOH:ácido acético:agua 40:10:50, v/v/v) en agitación por una hora o hasta obtener el contraste deseado.

Dentro del perfil de bandas observado en la electroforesis de proteínas, debería encontrarse la banda correspondiente a la proteína recombinante, por lo que se realizó un inmunomarcaje utilizando la técnica de *western blot*. Empleando un gel análogo al del SDS-PAGE para su tinción con azul de Coomassie, este fue equilibrado en agitación por 30 minutos en buffer de transferencia para cámara semiseca (Tris-HCl [25 mM], pH 8.3; glicina [192 mM]; MetOH [20%]), junto con una membrana de PVDF y de cuatro almohadillas de papel filtro, todo en una medida de 5.5×8.5 cm. Con el gel, la membrana de PVDF y las almohadillas de papel filtro se armó un “sándwich” para la electrotransferencia de las proteínas del gel a la membrana, como se muestra en la **Figura 7.9**. La transferencia de proteínas se realizó en un *Trans-Blot* SD para transferencia semi-seca (Bio-Rad; Hercules, CA, EUA) empleando 20 V por 30 minutos.

La transferencia de las proteínas fue verificada revisando la presencia del marcador de peso molecular en la membrana de PVDF, la cual fue posteriormente equilibrada en buffer TTBS (Tris-HCl [20 mM], pH 7.5; NaCl [500 mM]; Tween-20 [0.1%]) en agitación por 20 minutos, y después incubada en agitación por 30 minutos en buffer de bloqueo (leche [5%]/TTBS, g/v). La membrana fue entonces expuesta al anticuerpo primario anti-C-myc en una dilución 1:3,000 (v/v), manteniendo la agitación toda la noche a temperatura ambiente.

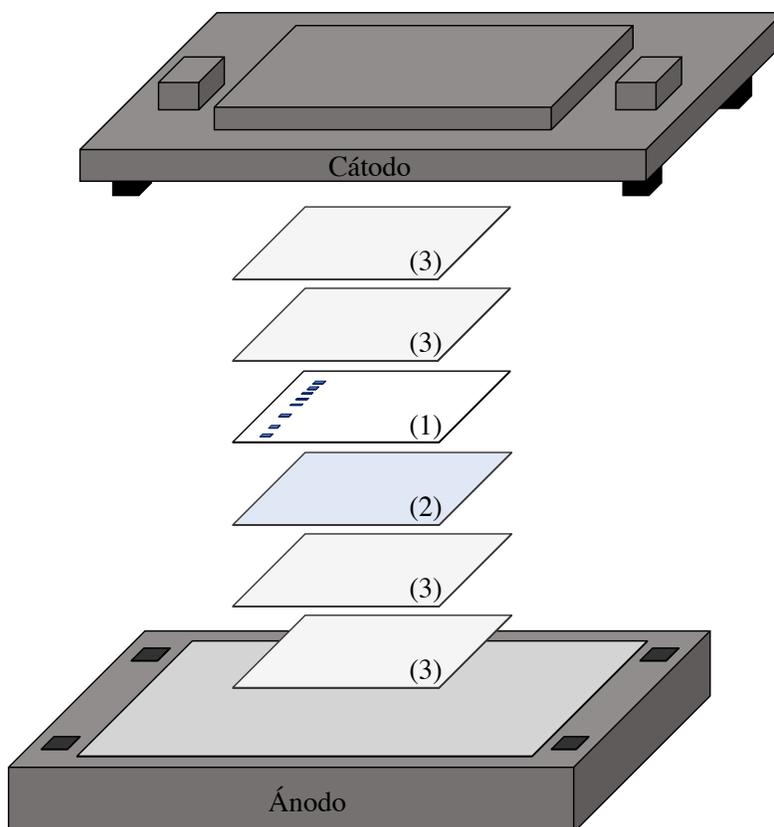


Figura 7.9. Orden de elementos en el procedimiento de electrotransferencia. El procedimiento de electrotransferencia de proteínas, de un gel de poliacrilamida a una membrana de PVDF, se realizó colocando el gel de poliacrilamida (1) sobre la membrana de PVDF (2) y estos a su vez entre dos pares de almohadillas de papel filtro (3). El “sándwich” formado se coloca entre el cátodo y el ánodo del equipo de electrotransferencia, y se procede a la transferencia con un voltaje de 20 V por 40 minutos.

Después de la incubación con el anticuerpo primario, se realizaron cuatro lavados a la membrana con TTBS en agitación por 5 minutos cada uno, para continuar con una incubación de 2 horas en presencia del anticuerpo secundario anti-ratón, conjugado con HRP, en una dilución 1:5,000 (v/v), y finalmente lavada cinco veces más como se describió anteriormente. Para evidenciar en que punto de la membrana se encuentra la proteína de interés marcada con el complejo de anticuerpos anti-C-myc/anti-ratón/enzima HRP, se utilizó el sustrato quimioluminiscente luminol, el cual al entrar en contacto con la peroxidasa se oxida y resulta en una emisión de luz. La membrana se expuso al sustrato luminol (*SuperSignal West Dura Extended Duration Substrate*; Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) cubriendo toda

la membrana por 1 minuto, para posteriormente colocarla en el *cassette* de revelado entre dos hojas de papel acetato. El revelado de la señal fue realizada en un cuarto oscuro, y con el apoyo de una luz roja, películas radiográficas (X-OMAT LS Film; Carestream; Rochester, NY, EUA) se expusieron sobre la membrana en un periodo de tiempo de entre 30 segundos a 2 minutos, para después ser sumergidas en solución de revelado, retirar el exceso en agua, continuar con la solución de fijado (Carestream; Rochester, NY, EUA) y finalmente disponer de las películas de nuevo en agua. Una vez que se concluyó el procedimiento las películas fueron analizadas y se compararon con los geles teñidos con azul de Coomassie para evidenciar el peso molecular al que correspondió la señal detectada en el *western blot*.

7.2.22. Purificación de MarP recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.

Las clonas que fueron seleccionadas como productoras de MarP recombinante en el ensayo de *western blot* fueron llevadas a proceso de fermentación para la purificación de la proteína en cuestión. El método de purificación de proteínas por cromatografía de afinidad a níquel se basa en la elusión del sobrenadante de cultivo (fase móvil) a través de una resina revestida con iones de níquel (fase estacionaria) en donde estos últimos interaccionaron con la región rica en residuos de histidina, acoplada a la proteína recombinante (6×His), favoreciendo la retención de la proteína de interés y permitiendo la elusión del resto de los componentes del sobrenadante.

Para llevar a cabo el proceso de purificación, 2 mL de resina de níquel ProBond (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) fueron divididos en partes iguales en dos tubos falcon de 50 mL y centrifugados a 800 g por 1 minuto para separar el sobrenadante de la resina. Todos los pasos de sedimentación de la resina fueron por centrifugación. Cada mililitro de la resina fue lavada con 6 mL de agua destilada estéril, resuspendiendo la resina y sedimentándola

para retirar el agua. Se continuó con dos lavados adicionales ahora con buffer de interacción para condiciones nativas (NaH_2PO_4 [50 mM], pH 8.0; NaCl [500 mM]), homogenizando la resina y retirando el buffer después de la sedimentación.

Una vez equilibrada la resina con el buffer de interacción para condiciones nativas, el sobrenadante dializado correspondiente a la fermentación de 100 mL de cultivo, fue separado en dos fracciones de 50 mL para su interacción con la resina en cada tubo. Los tubos fueron incubados en agitación y en frío por 3 horas, para permitir la mayor retención de proteína posible. Posteriormente, los tubos fueron centrifugados (800 g, 1 min) y los sobrenadantes resguardados. La resina fue entonces colocada en una columna de polipropileno vacía (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA), para continuar con una serie de cinco lavados con 8 mL de buffer de lavado (imidazol [20 mM], pH 8.0) y finalmente la liberación de la proteína con 9 mL del buffer de elusión (imidazol [500 mM], pH 8.0). Durante la elusión, los 9 mL de muestra purificada fueron obtenidos en fracciones independientes de 1.5 mL.

De cada fracción de muestra purificada se tomaron 100 μL para analizar por *western blot* (paso 7.2.21) la tasa de elusión de la proteína recombinante.

7.2.23. Desalado de proteínas recombinantes mediante sefadex G-25.

Para retirar los solutos (imidazol y NaCl) de la muestra purificada en el protocolo de afinidad a níquel, se utilizó el método de desalado de proteínas con sefadex G-25, la cual consiste de una resina de filtración en gel compuesta de microperlas porosas en las que los compuestos menores a 5 kDa serán retenidos.

El protocolo de limpieza de la proteína recombinante se realizó con columnas PD-10 con sefadex G-25 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA), la cual fue dispuesta en un tubo

colector (tubo falcon de 50 mL) y en la que 2.8 mL de muestra (la suma de las primeras dos fracciones) fueron cargados para posteriormente centrifugar a 1,000 g por 2 minutos. Previo a la elusión en la columna PD-10, a la muestra se le añadieron 56 µg de ASB (concentración final de [20 µg/mL]) para que funcionara como rastreador durante la electroforesis de proteínas. Se realizaron dos eluciones posteriores empleando 2.8 mL de PBS [1×] como fase móvil y colectándolos en tubos independientes.

Una vez que se contó con las muestras desaladas, se realizó una cuantificación de proteínas por el método de BCA como se describió en el paso **7.2.19** y un análisis por SDS-PAGE y *western blot* para evidenciar la presencia de proteínas en este punto. Finalmente, para corroborar la eliminación del imidazol, se realizaron lecturas de absorbancia a una longitud de onda de 230 nm en el NanoDrop 2000, construyendo una curva de calibración de imidazol de 0.062 M a 1 M. Se utilizaron 2 µL de la muestra desalada, los lavados con PBS [1×], los estándares y el buffer de elusión empleado en el protocolo de purificación por afinidad a níquel, y las lecturas se realizaron por triplicado.

7.2.24. Análisis de glicosilaciones en la proteína MarP recombinante expresada en *P. pastoris*.

P. pastoris es una levadura en la cual el proceso post-traducciona l de glicosilación de proteínas se lleva a cabo añadiendo cadenas cortas de manosa en residuos de arginina (N-glicosilaciones). Para llevar a cabo este análisis, se utilizó la péptido N-glicosidasa F (PNGasa F), la cual es una endoglicosidasa que cataliza la remoción de oligosacáridos entre la asparagina y la GlcNAc, en glicoproteínas ricas en residuos de manosa u oligosacáridos híbridos.

Para el protocolo de desglicosilación con la PNGasa F, 1 μg de proteína MarP_{Sol} purificada fue mezclada con 1 μL del buffer de desnaturalización glicoproteica (10 \times) y agua, e incubado a 100 $^{\circ}\text{C}$ por 10 minutos. La reacción continuó con una breve incubación en hielo por 3 minutos, y posteriormente añadiendo 2 μL del glycobuffer (10 \times), 2 μL de NP-40 (10%), 1 μL de PNGasa F, y un volumen de agua suficiente para llevar la reacción a un volumen final de 20 μL . Las reacciones se incubaron por periodos de tiempo de 15, 45 y 90 minutos a 37 $^{\circ}\text{C}$. Los resultados de la glicosilación se evaluaron con el cambio en el peso molecular de la proteína recombinante, mediante su análisis por *western blot*, como se describe en el paso **7.2.21**.

7.2.25. Evaluación de actividad proteolítica de MarP por degradación de albúmina.

Para medir la actividad de proteasa de MarP_{Sol} frente a la degradación de un sustrato, 250 ng de ASB se mezclaron con MarP_{Sol} en las concentraciones de 5 y 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, en un buffer de reacción que contiene Tris-HCl 0.1 M, pH 7.0. Las reacciones de degradación fueron incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 16 horas, y posteriormente mezcladas con 10 μL de Buffer de Laemmli y hervidas por 5 minutos. Las muestras fueron posteriormente cargadas en un gel de poliacrilamida al 15%, siguiendo las condiciones del SDS-PAGE descritas en el paso **7.2.21**. Se utilizó como control positivo de degradación de albúmina la tripsina pancreática a una concentración de 0.1 mg/mL .

7.2.26. Demostración de actividad tipo tripsina en MarP por hidrólisis del sustrato BApNA.

La especificidad de la actividad de la proteasa en MarP_{Sol} fue evaluada empleando el sustrato Clorhidrato de N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (BApNA), el cual es un sustrato cromogénico en el que una proteasa con actividad tipo tripsina puede liberar el cromóforo *p*-

nitroanilina al escindir su enlace con la arginina, y el que a su vez puede ser detectado mediante análisis colorimétricos.

La reacción de proteólisis se llevo a cabo disponiendo de [5 μ M] (v/v) del sustrato BApNA en 140 μ L de buffer de reacción Tris-HCl 0.1 M pH 7.0 y 8.0, y a su vez incorporando a la proteasa MarP_{sol} en una concentración de 30 μ g/mL (v/v), haciendo un volumen final de reacción de 200 μ L. La reacción se llevó a cabo en placas *nunc* de 96 pozos (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA) y a 37 °C. Para monitorear la degradación del sustrato, se realizaron lecturas espectrofotométricas a 415 nm en el lector de placas iMark durante dos horas en intervalos de 5 minutos. Para poder definir las actividades de actividad proporcionadas por las lecturas de absorbancia de MarP_{sol}, estas fueron interpoladas en una curva de calibración empleando la tripsina como referente.

7.2.27. Purificación de monocitos humanos por inmunomagnetismo.

El efecto biológico que se planteó estudiar con la proteasa MarP de *M. tuberculosis* fue el efecto que esta podría ejercer sobre las células monocíticas en su proceso de diferenciación a macrófagos. Para esto, monocitos humanos fueron purificados de sangre periférica con un sistema de inmunomagnetismo empleando perlas metálicas acopladas con el anticuerpo anti-CD14. Para llevar a cabo el procedimiento de purificación de monocitos, 28 mL de sangre venosa fueron separados mediante gradiente de densidad con histopaque-1077 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA) haciendo cuatro tubos con 14 mL de volumen en una relación 1:1 (v/v) histopaque:sangre. Los tubos fueron centrifugados a 800 g por 25 minutos, con una aceleración de 9.0 y desaceleración de 3.0, obteniendo una serie de fases como se muestra en la **Figura 7.10**.

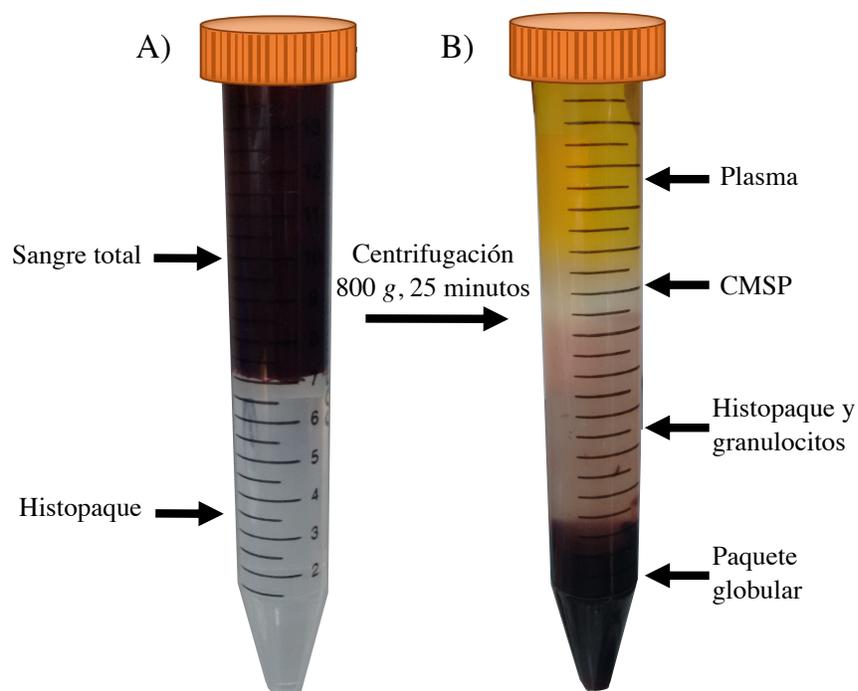


Figura 7.10. Separación de CMSP por gradiente de densidad. (A) El gradiente de densidad para la separación de CMSP se preparó colocando 7 mL de sangre venosa sobre 7 mL de Histopaque-1077. (B) Después de la centrifugación se observaron las fases en orden decreciente plasma, CMSP, Histopaque y granulocitos y el paquete globular.

Con el uso de una micropipeta, se retiró la primer fracción en las muestras de sangre centrifugadas, la cual corresponde al plasma sanguíneo y entonces se colectó la fracción correspondiente a las células mononucleares de sangre periférica (CMSP), correspondiendo con la segunda fase (**Figura 7.10**). Las cuatro fracciones de CMSP se reservaron en un tubo falcon de 15 mL para ser lavadas con buffer PBS 1× estéril, centrifugando a 300 g por 10 minutos con una aceleración y desaceleración de 9.0. Las células CMSP fueron resuspendidas en 1 mL de buffer PBS y estas se contaron en cámara de Neubauer, haciendo una dilución 1:100 (v/v) de las células con azul tripano. La viabilidad mínima requerida para los ensayos fue del 95%. Para la preparación de muestras para el protocolo de inmunomagnetismo, la suspensión celular se ajustó a una concentración de 4×10^7 CMSP/mL en un volumen final de 80 μ L, de los cuales 40 μ L corresponde a las perlas metálicas conjugadas con el anticuerpo anti-CD14. El buffer de

elusión utilizado para el tratamiento de las muestras en este protocolo de purificación consiste en PBS 1× pH 7.2, ASB [0.5%] y EDTA [2 mM] (v/m/m). Las suspensiones celulares de CMSP se incubaron a 4 °C por 15 minutos y posteriormente se lavaron con 1 mL de buffer de elusión, y se centrifugaron a 300 g por 10 minutos a 4 °C. Las muestras se decantaron y el botón de células se resuspendió en 500 µL de buffer de elusión.

Para utilizar el sistema de inmunomagnetismo, este debe refrigerarse previamente para mantener una condición de frío en las células durante el procedimiento de purificación. Una vez colocada la columna sobre el magneto, esta fue equilibrada con 500 µL de buffer de elusión. Posteriormente, las suspensión celular fue eluida a través de la columna, colectando en inicio el correspondiente a la fracción de CMSP CD14⁻ (linfocitos) y la cual se designó como F1. Seguidamente, tres lavados de 500 µL de buffer de elusión fueron realizados a la columna en el magneto y sus eluidos fueron colectados y designados como F2. Finalmente la columna se retiró del magneto y se colocó en un tubo falcon de 15 mL estéril, 300 µL de buffer de elusión fueron depositados en la columna y estos a su vez presionados con un embolo, obteniendo en el tubo colector la fracción 3 o F3, que corresponde a la fracción de células CD14⁺ o monocitos. Cada columna empleada durante un protocolo de purificación puede ser lavada 3 veces con buffer de elusión y utilizada para una purificación adicional siguiendo el mismo procedimiento.

7.2.28. Desarrollo del modelo de polarización de macrófagos M1/M2 en monocitos purificados.

Para llevar a cabo el ensayo de diferenciación de macrófagos *in vitro*, una suspensión celular de monocitos purificados se preparó en medio RPMI-1640 (Sigma Aldrich; St. Louis, MO, EUA) suplementado (piruvato de sodio [1 mM]; aminoácidos no esenciales [0.01 mM]; β-ME [0.05

mM]; penicilina [100 U/mL] y estreptomicina [100 µg/mL]; SFB [10%] v/v) a una concentración de 2×10^6 monocitos/mL. La suspensión celular fue dispuesta en placas de 96 pozos (Corning; Corning, NY, EUA) en volúmenes de 50 µL, sembrando 1×10^5 monocitos por pozo. La placa de cultivo fue incubada por 2 horas a 37 °C, 5% CO₂, para permitir la adherencia de las células, y entonces añadir los factores de crecimiento M-CSF y GM-CSF a una concentración final de 25 ng/mL, por 6 días de incubación.

Posteriormente, los sobrenadantes de cultivo fueron retirados y el medio fue remplazado con los estímulos respectivos para la diferenciación de macrófagos. Para la diferenciación de macrófagos M1, en los pozos pre tratados con GM-CSF se utilizó IFN-γ [40 ng/mL] y LPS [200 ng/mL], mientras que para la diferenciación del fenotipo M2 aquellos pozos que habían contenido el factor de crecimiento M-CSF, se reincorporó M-CSF [20 ng/mL] más IL-4 [40 ng/mL], incubando ambos esquemas de tratamiento por 72 horas bajo las mismas condiciones de cultivo. Por su parte, la proteasa MarP fue utilizada a una concentración de [10 µg/mL] (~65 mU/mL) y [5 µg/mL] (~32.5 mU/mL) para estimular los monocitos, empleando el M-CSF como pre-estimulo, y llevando igualmente a las células a una incubación a 37 °C, 5% CO₂, por tres días. Posterior al tiempo de incubación los sobrenadantes fueron retirados y almacenados a -20 °C hasta su análisis por ELISA para la detección de citocinas.

7.2.29. Análisis de viabilidad celular en macrófagos estimulados con MarP.

El efecto de la proteasa MarP en las células en cultivo se determinó mediante el ensayo de viabilidad celular con el compuesto MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazolio), y el cual se fundamenta en la reducción de este compuesto por acción de las enzimas deshidrogenasas de las células viables, generando un compuesto

coloreado de formazán soluble en el medio de cultivo. La determinación de la viabilidad celular en la placa de cultivo se realizó una vez culminado el protocolo de diferenciación celular, reincorporando un volumen igual de 100 μL de medio de cultivo fresco a los pozos con células y sobre estos 20 μL del reactivo CellTiter 96[®] AQueous One Solution (Promega; Madison, WI, EUA). La placa fue incubada por 30 minutos bajo las mismas condiciones de cultivo, y entonces la absorbancia de las muestras fue detectada a 490 nm en el lector de microplacas iMark.

7.2.30. Efecto de la proteasa MarP en la diferenciación de macrófagos en la línea celular de monocitos THP-1.

Como alternativa al estudio del efecto de la proteasa MarP en la diferenciación de macrófagos, se implementó también el uso de la línea celular de monocitos humanos THP-1, la cual proviene de un paciente masculino pediátrico con leucemia monocítica aguda, y la que a su vez a servido como un modelo de estudio para el proceso de diferenciación a macrófagos.

Para mantener y propagar la línea celular, las células se sembraron a una densidad celular de 0.5×10^6 células/mL en botellas de cultivo celular de 75 cm^2 (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, EUA), con medio RPMI-1640 suplementado con piruvato de sodio [1 mM], aminoácidos no esenciales [0.01 mM], β -ME [0.05 mM], antibióticos penicilina [100 U/mL] y estreptomina [100 $\mu\text{g}/\text{mL}$], y SFB al [10%] (v/v). Las células se mantuvieron en incubación con una atmósfera de 5% CO_2 , a 37 °C por tres días, evitando alcanzar una densidad celular de 1×10^6 células/mL. Para subcultivar las células y continuar con su propagación, estas son transferidas a un tubo cónico de 50 mL y centrifugadas a 1000 rpm por 5 minutos. Posteriormente el medio es retirado y resguardado, resuspendiendo las células en 1 mL de medio fresco y contando la viabilidad celular con azul tripano para ajustar a la densidad celular

mencionada anteriormente de 0.5×10^6 células/mL en medio RPMI-1640 suplementado. El volumen de cultivo que se mantuvo en las botellas de 75 cm² fue de 25 mL, de los cuales 20 mL correspondieron a la suspensión de células THP-1 y 5 mL al sobrenadante de cultivo anterior, el cual aporta una serie de factores de crecimiento producidos por las mismas células y que favorecen el crecimiento de estas en el subcultivo.

Por otro lado, para desarrollar el protocolo de polarización de macrófagos con las células THP-1, en placas de 24 pozos se sembraron 5×10^5 células por pozo en un volumen de 250 μ L (2×10^6 células/mL), las cuales fueron estimuladas con PMA a una concentración final de 5 ng/mL en un volumen final de 500 μ L. Las células fueron incubadas a 37 °C, 5% de CO₂, y 24 horas después el medio de cultivo fue retirado y remplazado con medio fresco, reintroduciendo las células a incubación ahora por 48 horas. Después de este periodo de tiempo, el medio de cultivo vuelve a ser retirado y en su lugar la reposición se realizó con los estímulos de diferenciación a los macrófagos M1/M2, así como la proteasa MarP, empleando las mismas concentraciones descritas para el modelo de monocitos purificados (paso 7.2.28) e incubando las células por 72 horas y bajo las mismas condiciones de cultivo.

7.2.31. Cuantificación de citocinas mediante ensayos por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

El fenotipo de los macrófagos diferenciados fue definido con base en su perfil de producción de citocinas liberadas al medio extracelular, cuantificándolas mediante un ensayo de ELISA tipo sándwich. Para este propósito se realizó la determinación de IL-4, IL-10, IL-12 y TNF- α empleando el kit comercial de OptEIA (Becton Dickinson; Franklin Lakes, NJ, EUA), siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, en placas nunc de 96 pozos (Thermo Fisher

Scientific; Waltham, MA, EUA) se dispusieron 100 μL por pozo del anticuerpo de captura correspondiente, diluido en buffer de carbonatos (NaHCO_3 [85 mM], Na_2CO_3 [15 mM], pH 9.5), y posteriormente la placa se incubó a 4 °C por 16 horas. Las diluciones de los anticuerpos empleados en este protocolo se resumen en la **Tabla 7.16**.

Tabla 7.16. Diluciones de anticuerpos y rangos de concentración de curva estándar en ensayos de ELISA.

Citocina	Factor de dilución Ac. de captura	Factor de dilución Ac. de detección	Rango de concentraciones curva estándar (pg/mL)
IL-4	1:250	1:1000	500 – 7.8
IL-10	1:250	1:1000	500 – 7.8
IL-12	1:250	1:250	2000 – 31.2
TNF- α	1:250	1:250	500 – 7.8

*Junto al anticuerpo de detección se diluyó la HRP en una dilución 1:250 para todos los casos.

A continuación, se retiró el anticuerpo de captura y los pozos se lavaron tres veces con 250 μL de buffer de lavado (PBS 1 \times , Tween-20 [0.05%] v/v), golpeando contra la superficie después del último lavado. Posteriormente, las placas se bloquearon por dos horas con 200 μL de diluyente de ensayo (PBS 1 \times , ASB [3%]) a temperatura ambiente, para continuar entonces con otra serie de tres lavados. Después de ello, las muestras, controles y estándares se añadieron en volúmenes de 100 μL por pozo, empleando el diluyente de ensayo en las muestras que hubiesen requerido ser diluidas, e incubado la placa toda la noche a temperatura ambiente. Los rangos de concentraciones de proteína estándar para cada citocina se refieren en la **Tabla 7.16**.

Para finalizar, a la placa se les retiró el contenido anterior y se lavaron 5 veces como se mencionó previamente, y entonces 100 μL de la solución detectora (anticuerpo de detección más HRP en diluyente de ensayo, **Tabla 7.16**) se añadió en cada pozo y la placa se incubó por una hora a temperatura ambiente. Se realizaron 7 lavados finales, y se procedió con el revelado añadiendo 100 μL por pozo del reactivo 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (TMB, Sigma Aldrich; St.

Louis, MO, EUA), y la placa se incubó en oscuridad por 10 minutos. Para detener la reacción, 50 μL de H_2SO_4 [2 N] se incorporaron por en cada pozo, y entonces la placa fue llevada al lector de microplacas iMark para realizar las lecturas de absorbancia con una longitud de onda de 450 nm, con corrección a 595 nm.

7.2.32. Participación de los receptores activados por proteasas en la diferenciación de macrófagos estimulados con MarP.

Para evidenciar que el efecto en la diferenciación de macrófagos cuando las células THP-1 son estimuladas con MarP_{Sol} es dependiente de su actividad de proteasa, inicialmente, la proteína inactivada por calor a 80 °C por 1 hora fue empleada como estímulo bajo las condiciones de cultivo celular descritas en el paso **7.2.30**, empleando a la proteasa en estado nativo como control positivo de estimulación. Una vez culminado el protocolo de cultivo los sobrenadantes fueron retirados y almacenados para su posterior análisis en la determinación de citocinas.

Por otra parte, la participación de los receptores PARs en el proceso de diferenciación celular llevado a cabo en las células THP-1, fue evaluado mediante la inhibición selectiva del receptor PAR1 y PAR2 en presencia de MarP_{Sol} . Para la inhibición del receptor PAR1 se utilizó el fármaco SCH-79797 en un rango de concentraciones que va de [0.01 μM] a [1 μM], mientras que para el bloqueo del receptor PAR2 se empleó el péptido FSLRLRY-NH₂ con concentraciones entre los [50 μM] y los [100 μM]. Los tratamientos de inhibición consistieron en una incubación de 30 minutos a 37 °C, 5% de CO₂, previo a la adición del estímulo con MarP_{Sol} en un volumen final del pozo de cultivo de 500 μL . Posteriormente el cultivo se desarrolló de igual forma a lo descrito en el paso **7.2.30**, para la posterior colección de los sobrenadantes de cultivo. Todos los

sobrenadantes fueron utilizados para la determinación de citocinas siguiendo el protocolo de ELISA descrito en el paso **7.2.31**.

Por su parte, se desarrolló un cultivo celular análogo a este en placas de 96 pozos, en donde el efecto que los inhibidores hubiesen presentado en la viabilidad de las células fue determinado mediante el ensayo con MTS. Para esta determinación, un volumen de 100 μL fue repuesto en cada pozo y subsiguientemente 20 μL de MTS fueron añadidos, continuando con el protocolo como se describió en el paso **7.2.29**.

7.2.33. Análisis de las vías de señalamiento intracelular implicadas durante la polarización de macrófagos estimulados con MarP.

Adicionalmente a la demostración de actividad de proteasa como el mecanismo de acción empleado por la enzima MarP durante el proceso de polarización de macrófagos, se analizaron las probables vías de señalamiento intracelular que pudiesen estar implicadas detrás de la activación de los receptores PARs. Para este propósito se utilizaron los inhibidores específicos BAY 11-7082, U0126 y Ro-32-0432 de las vías de señalamiento NF- κB , MAPK y PKC respectivamente. Los inhibidores fueron aplicados a las células por un periodo de 30 minutos antes de su estimulación con MarP_{Sol} en concentraciones de [5 μM] (BAY 11-7082), [10 μM] (U0126) y [20 μM] (Ro-32-0432). El cultivo fue desarrollado de manera convencional como se ha descrito previamente (**7.2.30**) y los sobrenadantes resultantes utilizados para la cuantificación de citocinas (**7.2.31**).

Adicionalmente, para conocer el efecto que estas moléculas inhibitoras puedan presentar frente a la viabilidad de las células en cultivo, se desarrolló un ensayo con MTS como se describe al final del paso **7.2.32**.

7.2.34. Análisis estadísticos.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el *software* Prism™ v7.0a de Graph Pad. La significancia estadística de las diferencias se estimó mediante una prueba de ANOVA de una vía con corrección post hoc de Bonferroni para más de dos grupos o con una prueba de t para dos grupos, representando las significancias estadísticas en los gráficos de la siguiente manera: $*P < 0.05$, $**P < 0.01$ y $***P < 0.001$.

CAPITULO VIII

RESULTADOS

8.1. CLONACIÓN DEL GEN Rv3671c EN *E. coli* DH5 α .

8.1.1. Amplificación del gen Rv3671c por PCR y preparación para su clonación.

Inicialmente, se comenzó con la estandarización de las condiciones ideales para la amplificación del gen Rv3671c de *Mycobacterium tuberculosis*, el cual sería posteriormente empleado como inserto durante el proceso de clonación en el vector pPICZ α A. Previo a la amplificación del gen Rv3671c, se realizó la extracción de ADNg de *M. tuberculosis* empleando la técnica de lisis enzimática/CETAB, presentando una relación 260/280 de 1.8 y una concentración promedio de 500 ng/ μ L.

Para la amplificación del gen Rv3671c se utilizaron los *primers* RvV1-F y RvV3-F como *primer* sentido para la amplificación de la secuencia codificante de la proteína MarP en su forma transmembranal y soluble, respectivamente, así como el *primer* Rv-R que funcionó como anti-sentido para ambos amplicones (**Tabla 7.2**). Las características termodinámicas de los *primers* mostraron durante su diseño una Tm de 72 °C con una temperatura de alineamiento (Ta) de 67 °C. Con base en ello se realizó la amplificación del gen Rv3671c tanto en su forma transmembranal como en su forma soluble, utilizando una temperatura de alineamiento de 67 °C, sin embargo, también se exploró la posibilidad que los amplicones pudiesen amplificarse en

temperaturas de alineamiento menores, para lo cual se probó un gradiente de temperaturas de 62 – 64 °C. En la **Figura 8.1** se muestran los amplicones obtenidos para la forma transmembranal (carril 2), la forma soluble (carril 3) y la subunidad de ARNr 16S como control endógeno (carril 4), en las diferentes condiciones de temperatura de alineamiento probadas.

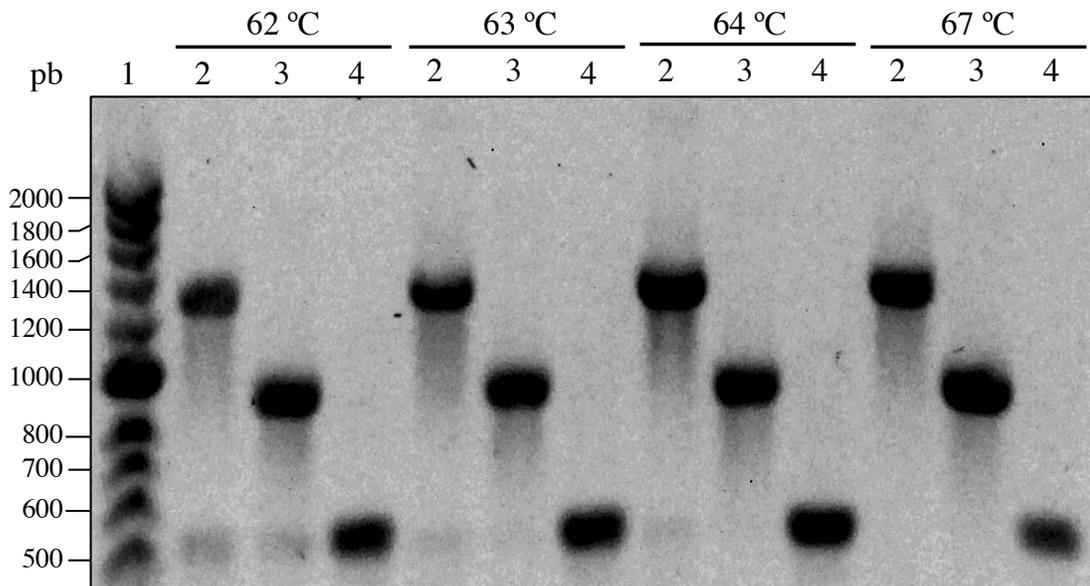


Figura 8.1. Amplificación del gen Rv3671c en un gradiente de temperaturas. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) amplicones del gen Rv3671c en su forma transmembranal (1238 pb), (3) amplicones del gen Rv3671c en su forma soluble (878 pb), (4) amplicones correspondientes a la subunidad de ARNr 16S (595 pb). Las reacciones de PCR fueron realizadas probando como temperatura de alineamiento 62, 63, 64 y 67 °C.

La amplificación del gen Rv3671c, en sus formas transmembranal y soluble, se obtuvo en las cuatro temperaturas de alineamiento probadas con un peso teórico de 1238 pb y 878 pb, respectivamente. En lo que respecta a la amplificación de la forma transmembranal del gen Rv3671c en el rango de temperatura de 62 – 64 °C, se mostró además del amplicón esperado, una banda inespecífica de aproximadamente 500 pb. Por su parte, la forma soluble del mismo gen presentó una banda inespecífica de 500 pb aproximadamente, cuando la temperatura de

alineamiento en la reacción se llevó a cabo a 62 °C. El control de amplificación para genes mycobacterianos consistió en la subunidad de ARNr 16S, el cual se amplificó en las cuatro condiciones de temperatura, y sin mostrar inespecificidades.

Una vez que se definieron las condiciones de reacción de PCR para la amplificación de las dos formas del gen Rv3671c que se emplearon en la estrategia de clonación, estas fueron resultas en una electroforesis en gel de agarosa para su posterior purificación. En la **Figura 8.2** se muestra un gel de agarosa representativo con los amplicones del gen Rv3671c, en sus formas transmembranal y soluble, acompañados con el control endógeno de amplificación.

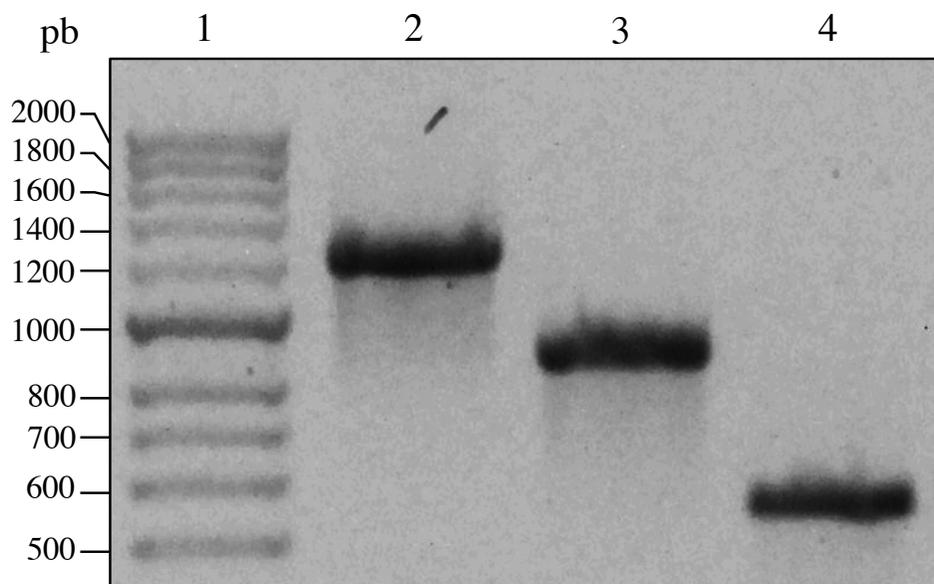


Figura 8.2. Generación de productos de PCR del gen Rv3671c para clonación. Representación de un gel de agarosa al 1.5% en el que se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) amplicón del gen Rv3671c en su forma transmembranal (1238 pb), (3) amplicón del gen Rv3671c en su forma soluble (878 pb), (4) amplicón de la subunidad de ARNr 16S (595 pb).

En la estrategia de clonación del gen Rv3671c, en ambas formas, se consideró que para la identificación de los vectores recombinantes estos serían identificados mediante su linealización empleando la enzima de restricción *Eco91-I*, un sitio de restricción presente en los

insertos próximo a la región $-3'$. En la **Figura 8.3** se muestra un gel de agarosa representativo en el que se demuestra la presencia del sitio de restricción *Eco91-I* en los amplicones mediante una reacción de digestión en la que los amplicones son divididos en dos fragmentos, generando un par de bandas con tamaños de 1008 pb y 230 pb para la forma transmembranal, y otro de 648 pb y 230 pb para la forma soluble.

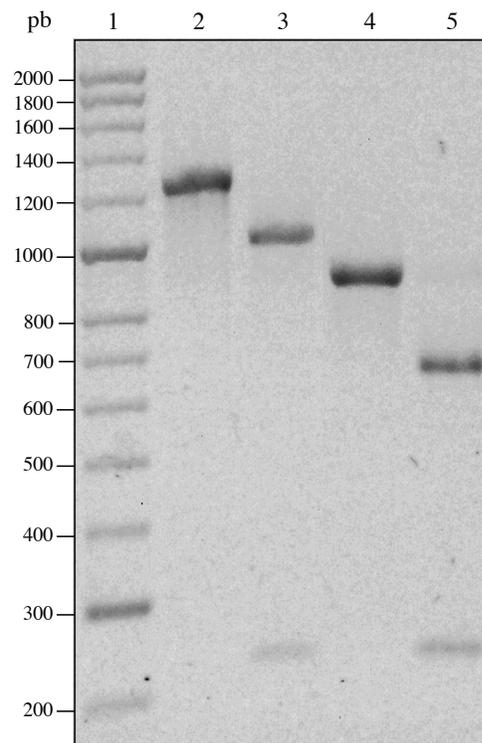


Figura 8.3. Digestión del gen Rv3671c con *Eco91-I*. Representación de un gel de agarosa al 1.5% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) amplicón del gen Rv3671c en su forma transmembranal (1238 pb), (3) digestión de la forma transmembranal con *Eco91-I* (1008 pb y 230 pb), (4) amplicón del gen Rv3671c en su forma soluble (878 pb), (5) digestión de la forma soluble con *Eco91-I* (648 pb y 230 pb).

8.1.2. Caracterización del vector de clonación/expresión pPICZ α A.

Los insertos correspondientes a la forma transmembranal y a la forma soluble del gen Rv3671c fueron las secuencias que posteriormente se insertaron en el vector de clonación y expresión pPICZ α A. Para llevar a cabo la estrategia de clonación empleando este plásmido se consideró

la presencia de los sitios de restricción *Xho*-I y *Xba*-I con los cuales se lograría la inserción de la secuencia de interés, el sitio *Sac*-I se utilizó para la linearización del plásmido y su posterior transfección en el sistema de levaduras, y la discriminación entre plásmidos falsos positivos portadores del inserto se logró con la pérdida del sitio *Eco*R-I y la ganancia del sitio *Eco*91-I. En la **Figura 8.4** se presenta un gel de agarosa representativo en el que se muestra el resultado de una serie de reacciones de digestión del vector pPICZ α A, donde se demuestra la presencia de los sitios de interés *Xho*-I, *Xba*-I, *Sac*-I y *Eco*R-I, y la ausencia del sitio *Eco*91-I. El peso molecular del vector linearizado, en todas las reacciones de digestión, corresponde con los ~3.6 kpb de peso esperado, demostrando con esta serie de evidencias que el vector se encontró en buenas condiciones para realizar el proceso de clonación.

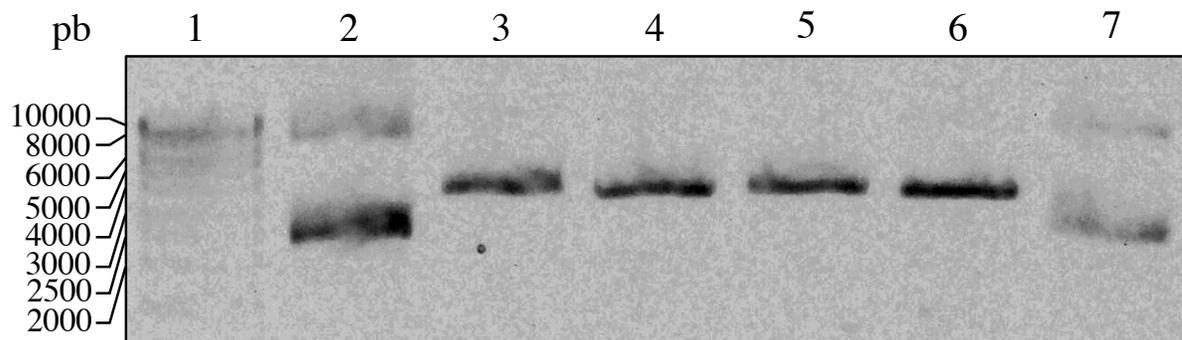


Figura 8.4. Identificación de los sitios de restricción *Xho*-I, *Xba*-I, *Sac*-I y *Eco*R-I en pPICZ α A. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZ α A sin digerir, (3) pPICZ α A digerido con *Xho*-I, (4) pPICZ α A digerido con *Xba*-I, (5) pPICZ α A digerido con *Sac*-I, (6) pPICZ α A digerido con *Eco*R-I, (7) pPICZ α A sin digerir por *Eco*91-I. El peso molecular de los plásmidos linearizados corresponde con el peso teórico esperado de ~3.6 kpb.

8.1.3. Transformación de vectores recombinante en *E. coli* DH5 α .

Las secuencias del gen Rv3671c, en sus dos variantes, amplificadas mediante reacción de PCR y purificadas por columna, así como el vector pPICZ α A fueron digeridos cada uno en una

reacción simultánea con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Xba*-I, generando los sitios que favorecieron la interacción entre el vector y los insertos. Seguido de ello, el vector y el respectivo inserto fueron dispuestos en relaciones molares 1:3 y 1:6, utilizando la enzima T4 ligasa para catalizar la ligación entre los reactivos de la reacción. Una vez que se generaron los nuevos vectores recombinantes estos se prepararon y fueron entonces electroporados en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 α . Las células transformadas fueron recuperadas y cultivadas en medio LB+Zeo [100 μ g/mL], utilizando el antibiótico como marcador de selección de clonas positivas.

La validación del resultado se apoyó en los controles dentro del protocolo de electroporación los cuales incluyeron la actividad del antibiótico contra células sensibles no electroporadas con el vector pPICZ α A (control de antibiótico), el control de digestión que consistió en la verificación de actividad de nucleasa por parte de las enzimas *Xho*-I y *Xba*-I y como el vector linearizado al ser electroporado no confiere la propiedad de resistencia al antibiótico zeocina, y por otro lado se verificó la actividad de la T4 ligasa al poder religar el vector pPICZ α A previamente digerido por las enzimas *Xho*-I y *Xba*-I (**Figura 5A**).

En lo que respecta a los resultados de la electroporación con los vectores recombinantes, como se mencionó anteriormente, se probaron las proporciones vector/inserto de 1:3 y 1:6 para cada una de las variantes del gen Rv3671c. La forma transmembranal mostró una mayor cantidad de colonias resistentes a zeocina en la proporción 1:3 con respecto a la proporción 1:6 (**Figura 5B**), sin embargo, para la forma soluble resultó en un número mayor de clonas en la proporción 1:6 con respecto a la proporción 1:3, siendo en cualquier caso un resultado superior para las transformantes con la variante soluble del gen Rv3671c (**Figura 5C**). Los vectores recombinantes identificados y las sus clonas portadoras fueron respaldadas.

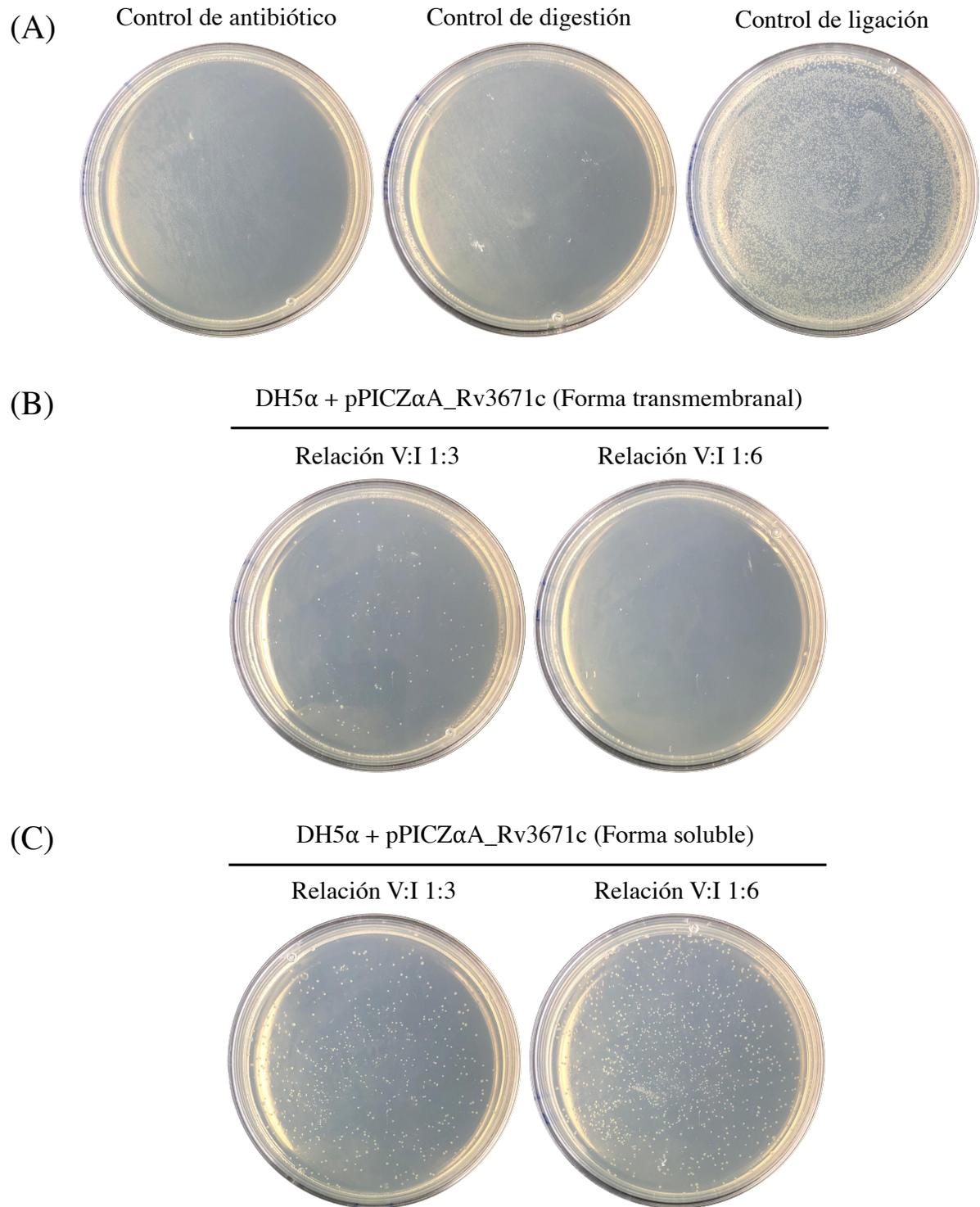


Figura 8.5. Clonación del gen Rv3671c en su forma transmembranal y soluble en *E. coli* DH5α. Obtención de colonias de *E. coli* DH5α transformadas con (A) controles del protocolo de electroporación, (B) vector recombinante pPICZαA_Rv3671c forma transmembranal y (C) vector recombinante pPICZαA_Rv3671c forma soluble.

8.1.4. Purificación de vectores recombinantes por método de Miniprep.

De las colonias obtenidas después del procedimiento de electroporación, un número de 30 clonas de cada variante fueron respaldadas en una nueva placa de agar LB+Zeo [100 µg/mL], y de estas 10 de cada una fueron seleccionadas aleatoriamente para realizar la búsqueda de plásmidos recombinantes, realizando la purificación plasmídica mediante una preparación a pequeña escala o miniprep. El vector pPICZ α A fue utilizado como referencia para diferenciar el patrón de bandas obtenido en los vectores recombinantes, los cuales debieron presentar un retardo en su electroforesis debido al incremento de peso ganado proporcionado por el inserto. En las clonas evaluadas cuyos vectores corresponden a los portadores de la forma transmembranal del gen Rv3671c, se encontró que 5 de ellas presentaron el retardo en su corrimiento que se mencionó previamente (**Figura 8.6**).

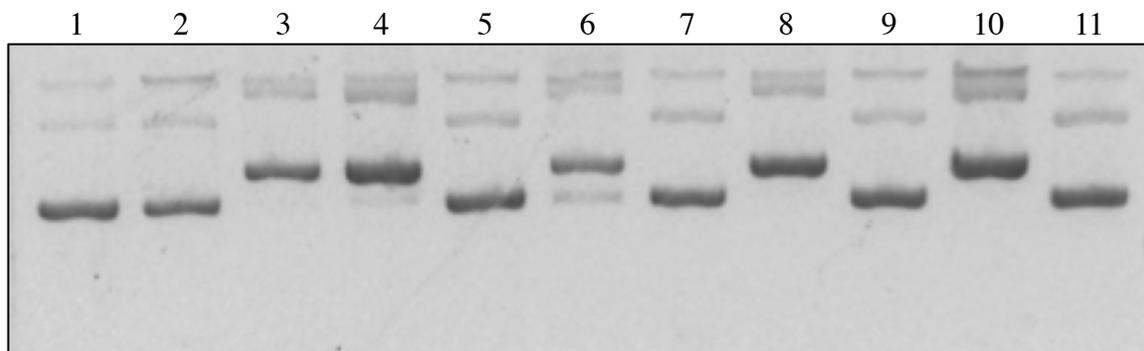


Figura 8.6. Purificación de construcciones plasmídicas pPICZ α A_Rv3671c_{TM}. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) pPICZ α A, (3, 4, 6, 8, 10) presuntas construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM}, (2, 5, 7, 9, 11) plásmidos con corrimiento electroforético igual a pPICZ α A.

Por su parte, en las clonas analizadas portadoras presuntamente del vector recombinante construido con el gen Rv3671c en su forma soluble, se encontró el resultado de retardo electroforético en 8 vectores. De esta manera y en conjunto con la cantidad de transformantes obtenidas se observó una preferencia por la forma soluble del gen Rv3671c para su clonación.

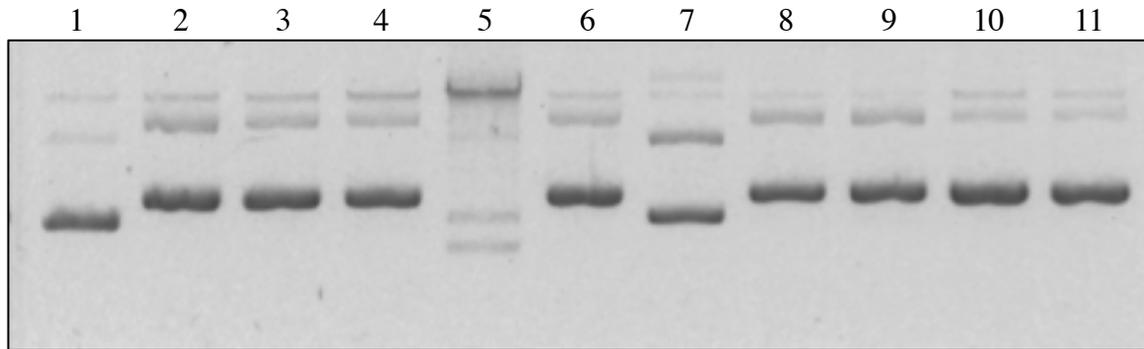


Figura 8.7. Purificación de construcciones plasmídicas pPICZαA_Rv3671c_{Sol}. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) pPICZαA, (2, 3, 4, 6, 8, 9, 10, 11) presuntas construcciones pPICZαA_Rv3671c_{Sol}, (5, 7) plásmidos con corrimiento electroforético igual a pPICZαA.

8.1.5. Caracterización de vectores recombinantes por ensayos de restricción.

Para evidenciar que los vectores purificados corresponden a las construcciones pPICZαA_Rv3671c, se utilizaron ensayos de restricción en los que la actividad de nucleasa de las enzimas de restricción previamente descritas demostraron la diferencia entre las clonas positivas y los resultados falsos positivos.

Inicialmente, para demostrar la presencia del inserto en los vectores purificados se digirieron los plásmidos con la enzima *Eco91-I*, de manera que las construcciones con la forma transmembranal que presentaron retraso electroforético resultaron linearizadas (**Figura 8.8**).

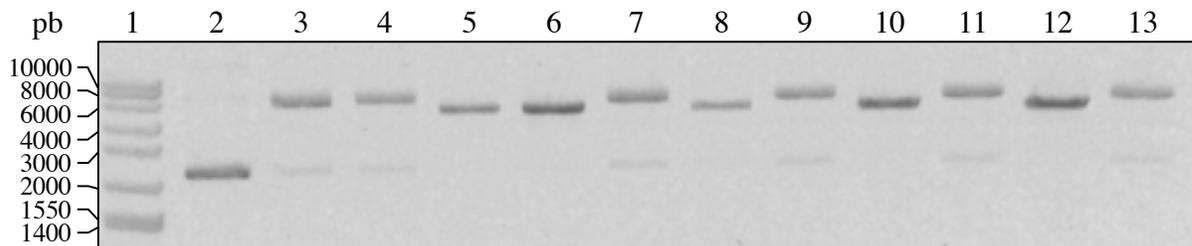


Figura 8.8. Linearización de construcciones pPICZαA_Rv3671c_{TM} con *Eco91-I*. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZαA sin *Eco91-I*, (3) pPICZαA con *Eco91-I*, (5, 6, 8, 10, 12) construcciones pPICZαA_Rv3671c_{TM}, (4, 7, 9, 11, 13) plásmidos con corrimiento electroforético igual a pPICZαA. Los carriles 5, 6, 8, 10, 12 mostraron linearización con un tamaño de ~4.8 kpb.

Por su parte, cuando se realizó la misma evaluación en los vectores correspondientes con la forma soluble del gen Rv3671c, se encontró un resultado similar al anterior en el que todos los plásmidos que presentaron el mismo retraso electroforético se linearizaron en la digestión con la enzima *Eco91-I* (**Figura 8.9**).

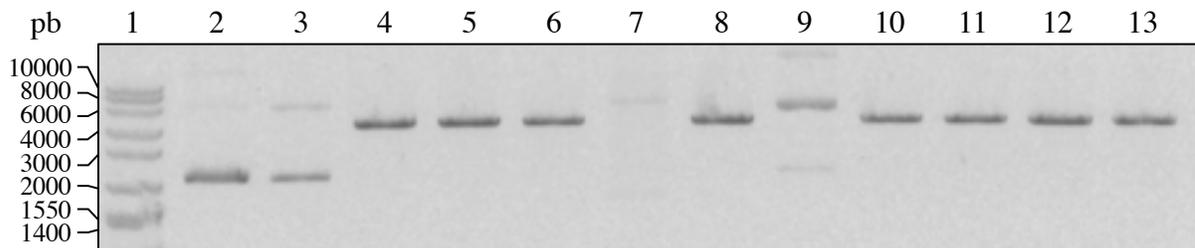


Figura 8.9. Linearización de construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} con *Eco91-I*. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZ α A sin *Eco91-I*, (3) pPICZ α A con *Eco91-I*, (4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13) construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{Sol}, (7, 9) plásmidos con corrimiento electroforético igual a pPICZ α A. Los carriles 4, 5, 6, 8, 10, 11, 12, 13 mostraron linearización con un tamaño de ~4.5 kpb.

Para la correcta inserción de las secuencias dispuestas para clonación, la estrategia comprendió la posición del inserto entre el sitio *Xho-I* (1184) y el sitio *Xba-I* (1271), perdiendo de esta manera los sitios *EcoR-I* y un segundo sitio *Xho-I* (1246). La presencia del segundo sitio *Xho-I* representó la posibilidad de que cualquiera de los insertos pudiesen haberse insertado incorrectamente en el vector y en consecuencia se generaran clonas falsas positivas cuya secuencia del gen Rv3671c no estuviera en marco de lectura con el vector y su transcripción produjera una secuencia indeseable. Para discriminar entre los vectores recombinantes que posicionaron el inserto a partir del segundo sitio de *Xho-I*, debido a que estos conservaron el sitio *EcoR-I*, las clonas linearizadas con esta última enzima de restricción fueron descartadas. De las construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} identificadas en la reacción de digestión con la enzima *Eco91-I*, ninguna de ellas mostró el mismo resultado de linearización al exponerse a la

actividad de nucleasa de la enzima *EcoR*-I, encontrando que las cinco clonas fueron correctamente insertadas en el vector (**Figura 8.10**).

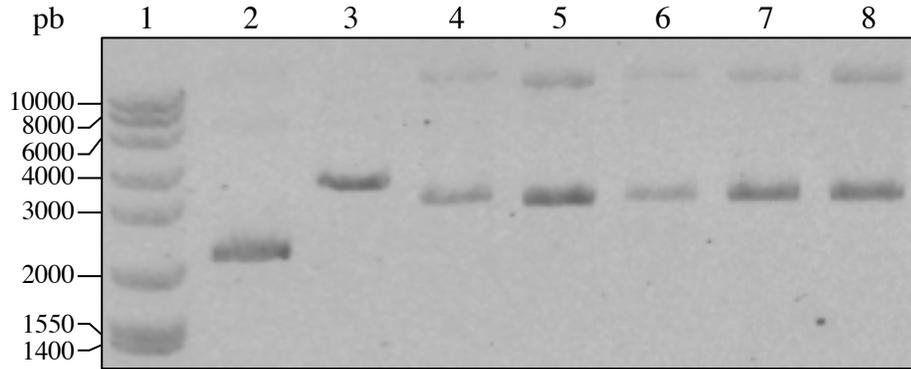


Figura 8.10. Reacción de digestión de la construcción pPICZαA_Rv3671c_{TM} con *EcoR*-I. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZαA sin *EcoR*-I, (3) pPICZαA con *EcoR*-I, (4 – 8) construcciones pPICZαA_Rv3671c_{TM} con *EcoR*-I. El carril 3 mostró linearización con un tamaño de ~3.6 kpb.

De igual manera, El mismo resultado fue el que se observó en los plásmidos recuperados de las clonas correspondientes con la construcción pPICZαA_Rv3671c_{Sol} en los que ninguno de los vectores fueron linearizados con *EcoR*-I (**Figura 8.11**).

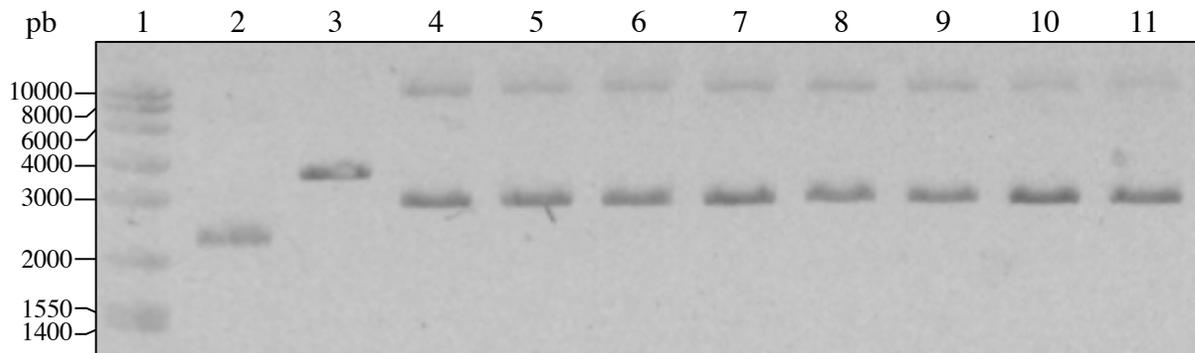


Figura 8.11. Reacción de digestión de la construcción pPICZαA_Rv3671c_{Sol} con *EcoR*-I. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZαA sin *EcoR*-I, (3) pPICZαA con *EcoR*-I, (4 – 11) construcciones pPICZαA_Rv3671c_{Sol} con *EcoR*-I. El carril 3 mostró linearización con un tamaño de ~3.6 kpb.

Finalmente, la evidencia que concluyó la construcción de los vectores recombinantes pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} fue la liberación del inserto durante una reacción de doble digestión con las enzimas *Xho*-I y *Xba*-I, de manera que esa ganancia en el peso molecular observado en la linearización de los vectores recombinantes con la enzima *Eco*91-I fue debido a la captación de los insertos Rv3671c_{TM} y Rv3671c_{Sol} por el vector pPICZ α A. La **Figura 8.12** demuestra de forma representativa cinco clonas de cada una de las construcciones previamente analizadas con *Eco*91-I y *Eco*R-I, en donde se observa la liberación del inserto.

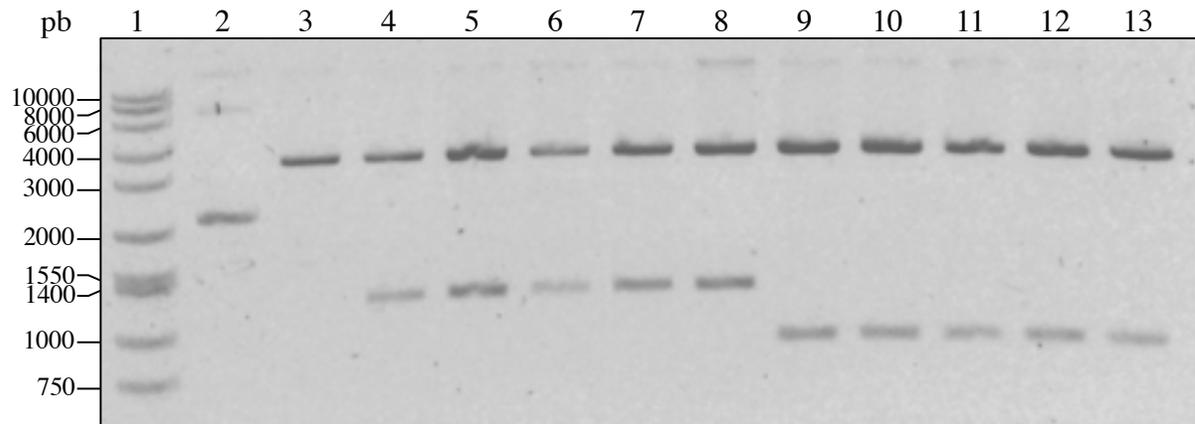


Figura 8.12. Liberación del inserto Rv3671c_{TM} y Rv3671c_{Sol} y linearización del vector pPICZ α A en la doble digestión con las enzimas de restricción *Xho*-I y *Xba*-I. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZ α A sin *Xho*-I/*Xba*-I, (3) pPICZ α A con *Xho*-I/*Xba*-I, (4 – 8) construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} con *Xho*-I/*Xba*-I, (9 – 13) construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} con *Xho*-I/*Xba*-I. Se muestra el vector linearizado pPICZ α A con un tamaño de ~3.6 kpb, el inserto Rv3671c_{TM} con un tamaño de 1238 pb y el inserto Rv3671c_{Sol} con un tamaño de 878 pb.

Las clonas que fueron definidas como positivas después del escrutinio con los ensayos de restricción previamente mostrados, fueron preservadas en medio LB con glicerol al 20%, preparando una serie de viales por triplicado para cada clona y congeladas a -80 °C para su almacenamiento hasta su disposición en los consiguientes ensayos de transfección en el sistema de levaduras con *P. pastoris*.

8.2. CONSTRUCCIÓN DE CLONAS RECOMBINANTES DE *P. pastoris* GS115.

8.2.1. Transfección de vectores recombinantes en *P. pastoris* GS115.

En el vector pPICZ α A se cuenta con un sitio *Sac*-I en la secuencia promotora de AOX1, el cual al ser escindido ofrece la posibilidad de ser integrado por el genoma de la levadura metilotrónica *P. pastoris* GS115 mediante recombinación homóloga. De las construcciones que fueron previamente identificadas se seleccionaron tres clonas de cada variante para ser linearizadas con la enzima *Sac*-I y posteriormente ser electroporadas en la cepa de *P. pastoris* GS115 (**Figura 8.13**).

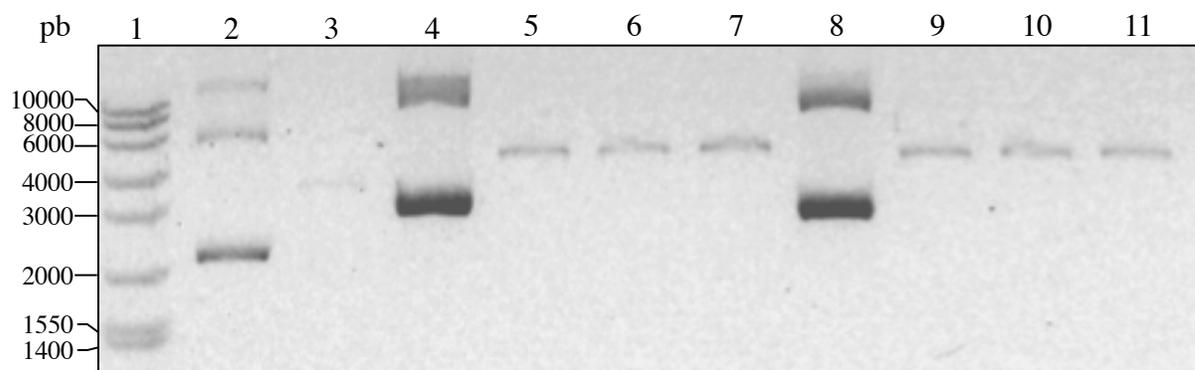


Figura 8.13. Linearización de construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} con *Sac*-I. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) pPICZ α A sin *Sac*-I, (3) pPICZ α A con *Sac*-I, (4) construcción pPICZ α A_Rv3671c_{TM} sin *Sac*-I, (5 – 7) construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} con *Sac*-I, (8) construcción pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} sin *Sac*-I, (9 – 11) construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} con *Sac*-I. Se muestra el vector linearizado pPICZ α A con un tamaño de ~3.6 kpb, la construcción pPICZ α A_Rv3671c_{TM} con un tamaño de ~4.8 kpb y la construcción pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} con un tamaño de ~4.5 kpb.

Células electrocompetentes de *P. pastoris* GS115 fueron transfectadas con las construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} y posteriormente sembradas en medio YPD+Zeo [100 μ g/mL], utilizando el antibiótico zeocina como marcador de selección para la identificación de las clonas transfectadas con las construcciones (**Figura 8.14A**).

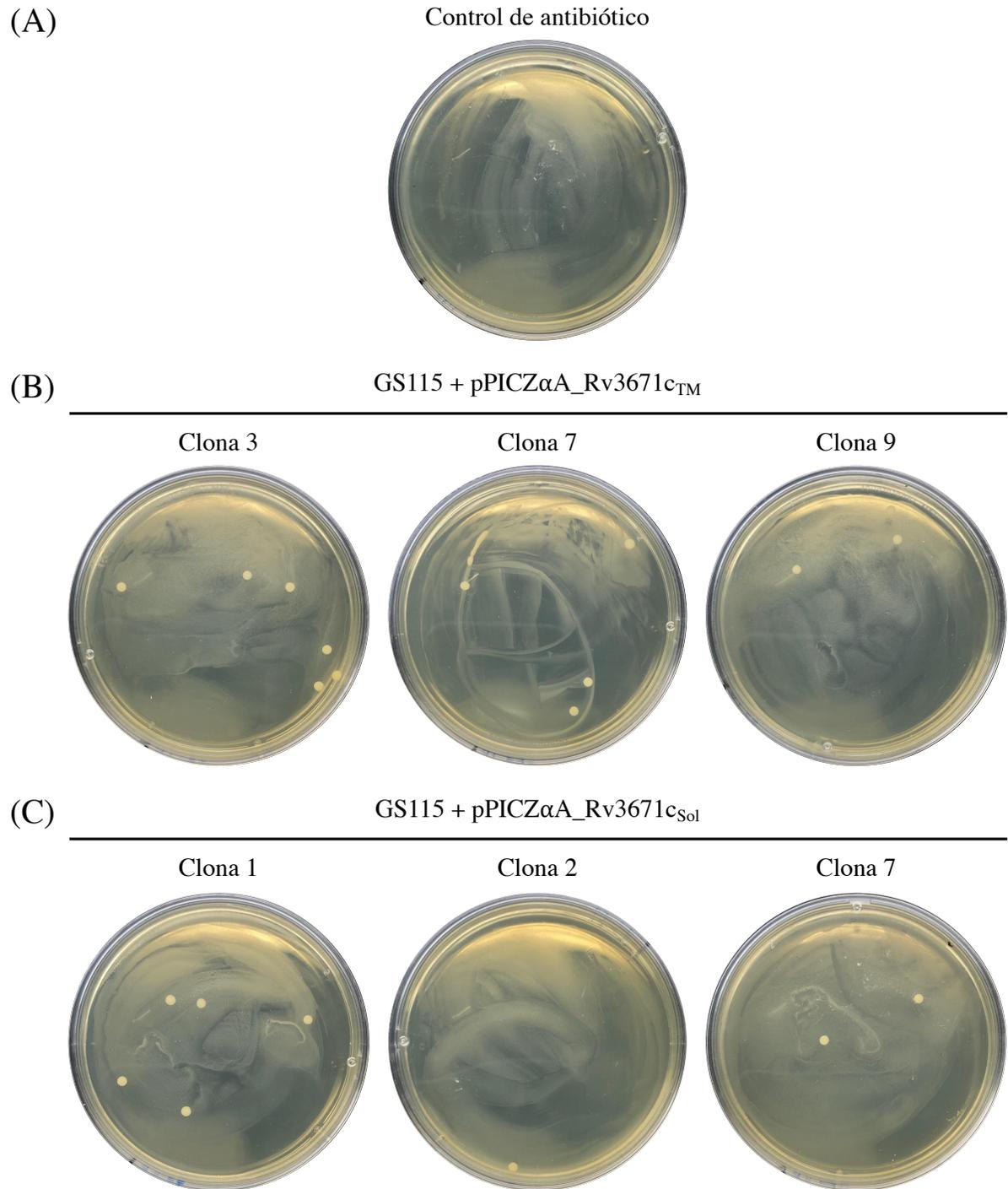


Figura 8.14. Transfección de las construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y pPICZ α A_Rv3671c_{Sol} en *P. pastoris* GS115. Obtención de colonias de *P. pastoris* GS115 transfectadas con (A) control de antibiótico, (B) construcción pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y (C) construcción pPICZ α A_Rv3671c_{Sol}.

Las placas de YPD+Zeo [100 µg/mL] fueron incubadas a 30 °C por un periodo de 48 horas, tiempo en el que se identificó la aparición de colonias. Las clonas 3, 7 y 9 fueron las clonas aleatoriamente seleccionadas de la construcción pPICZαA_Rv3671c_{TM} (**Figura 8.14B**), así como la clona 1, 2 y 7 de la construcción pPICZαA_Rv3671c_{Sol} (**Figura 8.14C**), en donde todas ellas habían demostrado ser construcciones correctamente sintetizadas. En ambos casos la aparición de colonias representó un número escaso, sin embargo todas las clonas fueron debidamente respaldadas y analizadas en la búsqueda de clonas de *P. pastoris* portadoras del gen Rv3671c en su forma transmembranal y soluble.

8.2.2. Genotipificación de clonas de *P. pastoris* portadoras del gen Rv3671c.

Para realizar el análisis de las clonas de *P. pastoris* portadoras del gen Rv3671c, se identificó la presencia de este mediante PCR empleando los *primers* AOX1-F y AOX1-R, dado que las secuencia del gen de interés debió posicionarse entre los elementos de la región promotora del gen AOX1 (**Figura 8.15**).

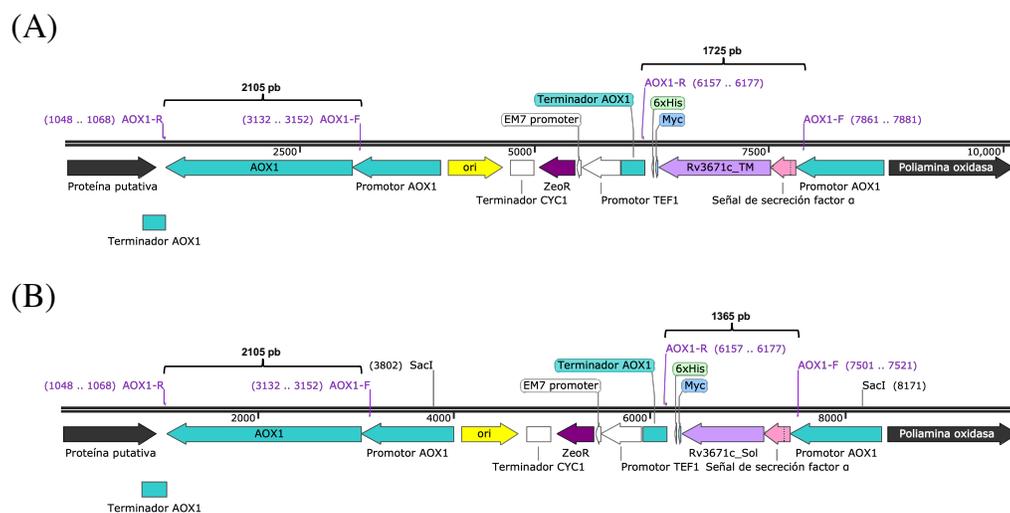


Figura 8.15. Esquematación del alineamiento de los *primers* AOX1 en el *cassette* de expresión en las clonas recombinantes de *P. pastoris* GS115. Los *primers* de AOX1 generan un amplicón de 2105 pb en el gen endógeno de AOX1 en *P. pastoris* GS115, con un segundo amplicón de (A) 1725 pb en la construcción pPICZ α A_Rv3671c_{TM} o (B) 1365 pb en la construcción pPICZ α A_Rv3671c_{sol}.

Inicialmente, todas las clonas de *P. pastoris* que fueron obtenidas en las placas de YPD+Zeo [100 μ g/mL] fueron inoculadas en caldo YPD para la posterior extracción de ADNg de las levaduras mediante la técnica de TSNT (**Figura 8.16**).

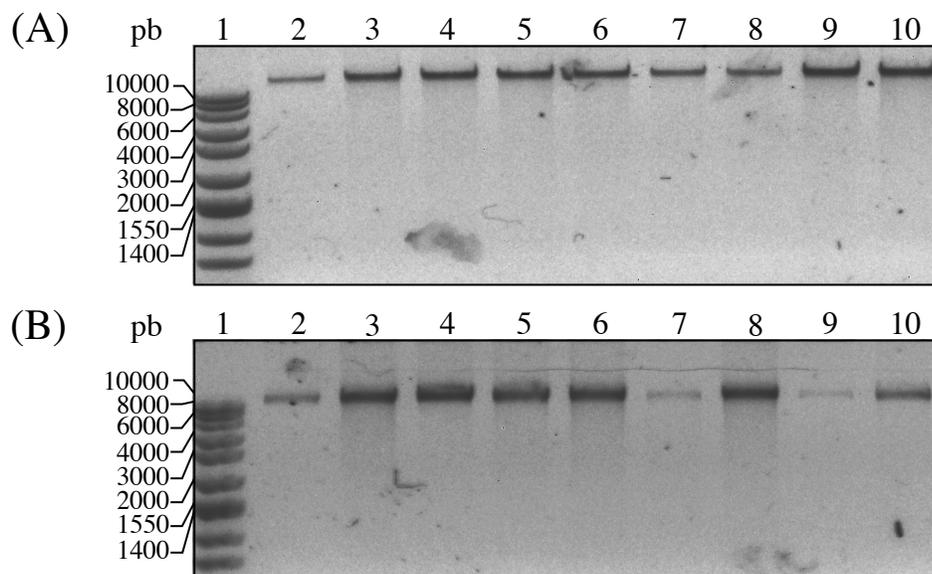


Figura 8.16. Extracción de ADNg de *P. pastoris* GS115 transfectadas con las construcciones pPICZ α A_Rv3671c_{TM} y pPICZ α A_Rv3671c_{sol}. (A) Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) ADNg de *P. pastoris* GS115 y los ADNg de las transfectantes con pPICZ α A_Rv3671c_{TM} en (3 – 5) clona 3, (6 – 8) clona 7 y (9 – 10) clona 9. (B) Por su parte se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) ADNg de *P. pastoris* GS115 y las extracciones de ADNg de las transfectantes con pPICZ α A_Rv3671c_{sol} de (3 – 7) clona 1, (8) clona 2, (9 – 10) clona 7.

El material genético extraído fue cuantificado en nanodrop y la integridad verificada mediante su resolución en geles de agarosa lo mostraron adecuado para el análisis de PCR. En la **Figura 8.17** se muestran los amplicones obtenidos.

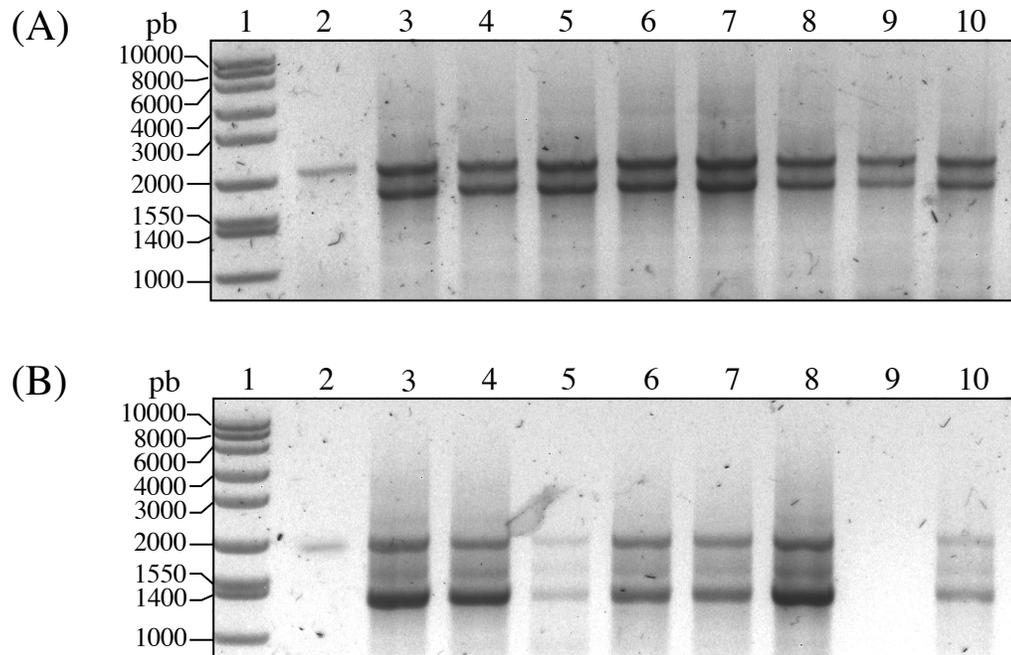


Figura 8.17. Validación por PCR del genotipo AOX1/Rv3671_{c_{TM}} y AOX1/Rv3671_{c_{Sol}} en *P. pastoris* GS115. (A) Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) amplificación del gen AOX1 en *P. pastoris* GS115 y los amplicones del gen AOX1/Rv3671_{c_{TM}} en (3 – 5) clona 3, (6 – 8) clona 7, (9 – 10) y clona 9. (B) Por otro lado se observa (1) marcador de peso molecular, (2) amplificación del gen AOX1 en *P. pastoris* GS115 y los amplicones del gen AOX1/Rv3671_{c_{Sol}} en (3 – 7) clona 1, (8) clona 2, (9 – 10) y clona 7.

8.2.3. Análisis por secuenciación de clonas de *P. pastoris* recombinantes.

Para validar que las construcciones de levaduras cuentan con el *cassette* de expresión y que este no presenta ninguna alteración que pueda repercutir en la expresión de la proteína de interés, se purificaron los productos de PCR correspondientes a las variantes transmembranal y soluble de la proteasa MarP insertadas en el genoma de la levadura *P. pastoris* (**Figura 8.18**). Los productos de PCR fueron enviados para su secuenciación a la Unidad de Biología Molecular del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM, con los cuales se evidenció que las construcciones de las dos variantes del gen Rv3671c se ubican en marco de lectura con la secuencia de secreción alfa del vector pPICZ α A, además de no mostrar cambios nucleotídicos indeseados (**Figura 8.19**).

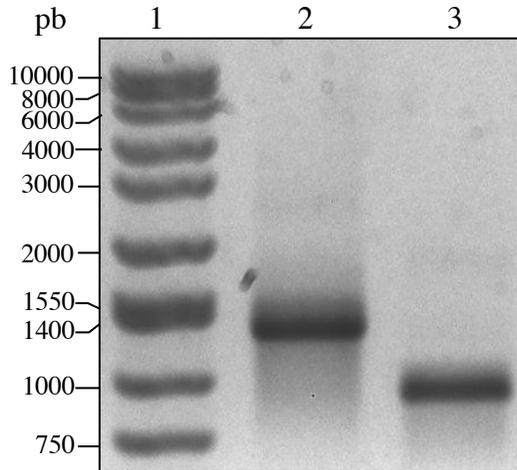


Figura 8.18. Amplificación por PCR de los *cassettes* AOX1/Rv3671c_{TM} y AOX1/Rv3671c_{Sol} en ADNg de *P. pastoris* GS115. Representación de un gel de agarosa al 1% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) amplificación del gen AOX1/Rv3671c_{TM} y (3) amplificación del gen AOX1/Rv3671c_{Sol}.

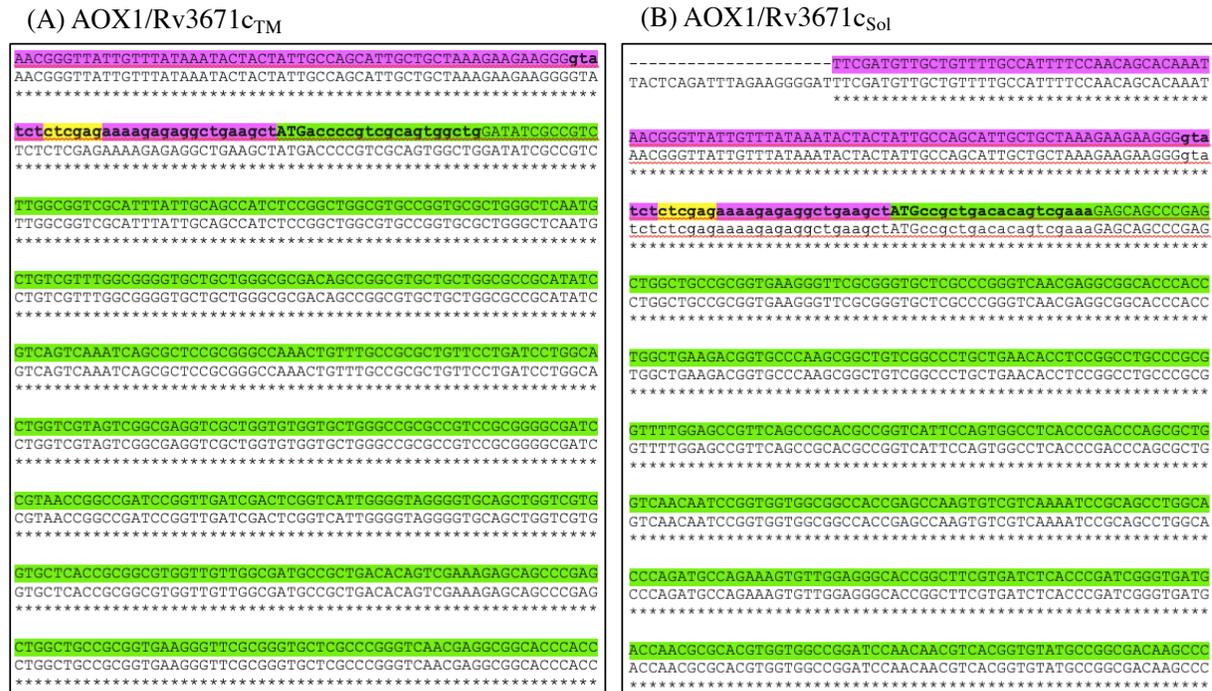


Figura 8.19. Análisis de secuenciación de los *cassettes* de expresión AOX1/Rv3671c_{TM} y AOX1/Rv3671c_{Sol}. La secuencias correspondientes al genotipo AOX1/Rv3671c_{TM} (A) y AOX1/Rv3671c_{Sol} (B) muestran en rosa la secuencia correspondiente a la región de secreción alfa, en amarillo el sitio de restricción *Xho*-I (ctcag) ubicado en el extremo -3' del inserto, y en verde la secuencia correspondiente al gen de interés de la respectiva variante.

8.3. INDUCCIÓN DE LA EXPRESIÓN DE MarP RECOMBINANTE.

8.3.1. Expresión de la proteína MarP y evaluación del crecimiento de las clonas recombinantes de *P. pastoris* en medio con MetOH.

Las clonas recombinantes V1C7.2 y V3C7.2 de *P. pastoris* correspondientes al genotipo Rv3671c_{TM} y Rv3671c_{Sol} respectivamente, fueron dos cepas que mostraron por PCR la presencia de su respectivo *cassette* de expresión, y que a su vez no presentaron alteraciones en su secuencia, por lo que fueron seleccionadas como candidatas a la evaluación de la producción de la proteína recombinante MarP_{TM} y MarP_{Sol}. De manera inicial, las clonas recombinantes de *P. pastoris* fueron inoculadas en el medio BMMY para inducir la producción de proteínas con metanol al 1% siguiendo las condiciones estándar de pH 6.0 por un periodo de cinco días. El crecimiento de las clonas recombinante fue monitoreado haciendo una lectura de densidad óptica a 595 nm cada 24 horas hasta el término de la fermentación, observando un crecimiento exponencial hasta las 96 horas, con ninguna diferencia entre las tres cepas recombinantes con respecto a la cepa silvestre GS115 como control del crecimiento de la levadura (**Figura 8.20**).

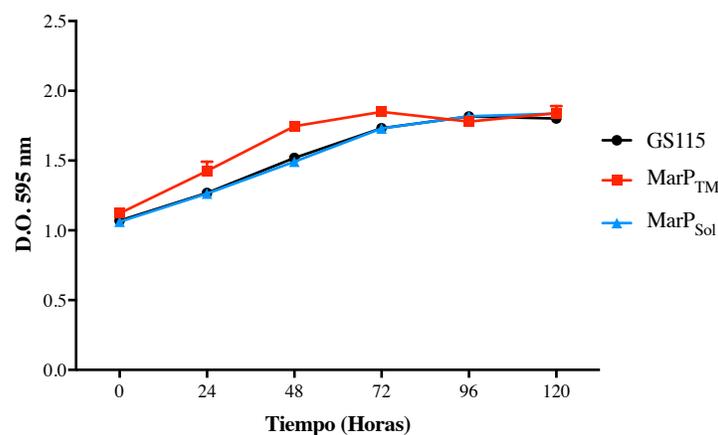


Figura 8.20. Curva de crecimiento de las levaduras productoras de las proteínas MarP_{TM} y MarP_{Sol}. Cinética de crecimiento de las cepas de *P. pastoris* GS115 (negro), la cepa productora de MarP_{TM} (rojo) y la cepa productora de MarP_{Sol} (azul).

Una vez finalizada la fermentación, los sobrenadantes de cultivo fueron analizados mediante SDS-PAGE y *western blot*. Como se observa en la **Figura 8.21** el carril 4 correspondiente con el sobrenadante de cultivo de la cepa productora de MarP_{Sol}, presenta un perfil de bandas diferente al de la cepa silvestre (carril 2) y al de la cepa productora de MarP_{TM} (carril 3). Por otro lado, al realizar el marcaje específico con el anticuerpo anti C-myc en el *western blot* se observa una señal positiva solo en la cepa productora de MarP_{Sol}, encontrando una banda de ~28 kDa y otra de mayor tamaño con un peso de entre 38 y 49 kDa. Mientras que la banda inferior correspondería con una forma autoprosesada de la proteasa MarP_{Sol}, la banda superior teóricamente podría coincidir con una serie de agregaciones de la misma proteína.

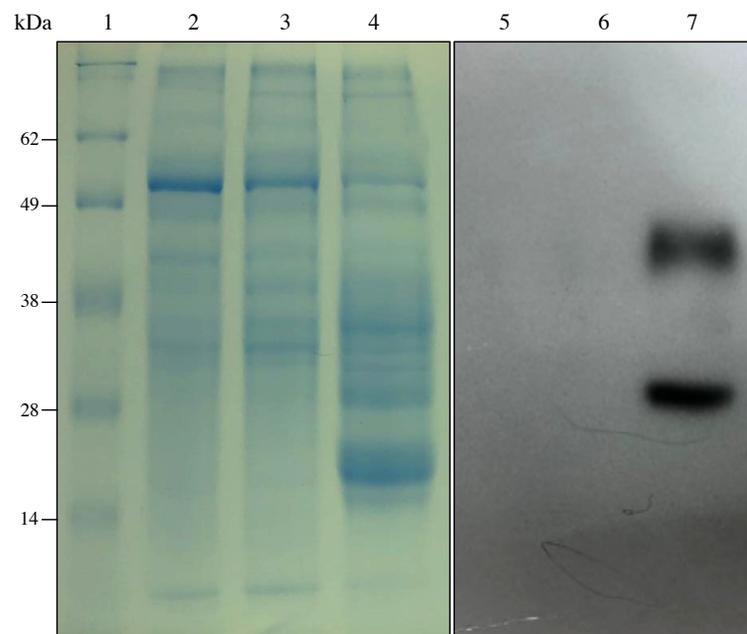


Figura 8.21. SDS-PAGE y *western blot* de los sobrenadantes de cultivo de las cepas de *P. pastoris* productoras de MarP_{TM} y MarP_{Sol}. Representación de un gel de poliacrilamida al 12% en el que se muestra (1) marcador de peso molecular, (2) la cepa GS115, (3) MarP_{TM} y (4) MarP_{Sol}. En el *western blot* se muestran (5) la cepa GS115, (6) MarP_{TM} y (7) MarP_{Sol}.

8.3.2. Efecto del pH en la producción de MarP_{Sol} recombinante durante el cultivo de *P. pastoris*.

En los estudios previos de la proteasa MarP se ha descrito una asociación de la función de esta enzima con la condición de pH en la que se encuentre¹⁹⁰, por lo cual se realizaron una serie de fermentaciones a diferentes pH y se analizó el efecto que estos cambios presentarían en el crecimiento de las levaduras, y en la expresión de la proteasa recombinante. Como se observa en la **Figura 8.22**, al crecer la cepa GS115+MarP_{Sol} en el medio BMMY a diferentes pH se observa un aparente retraso en el crecimiento conforme el medio se encuentra en condiciones alcalinas, no mostrando diferencias significativas en un rango de pH entre 4 – 6.

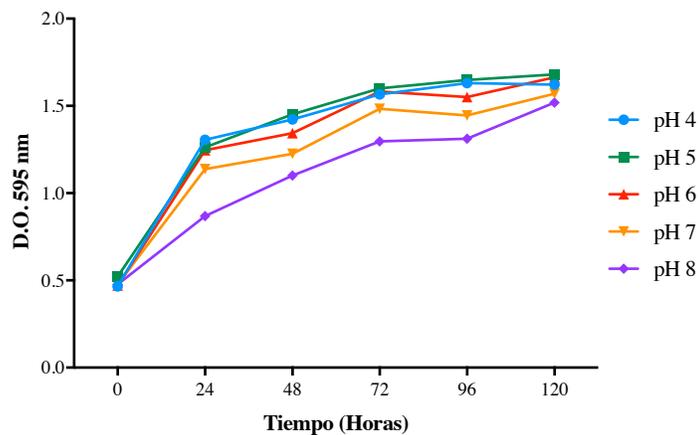


Figura 8.22. Curva de crecimiento de la cepa productora de MarP_{Sol} en diferentes pH. Cinética de crecimiento de la cepa GS115+MarP_{Sol} en el medio de inducción de proteínas BMMY preparado con diferentes pH.

Por otro lado, cuando se evaluaron los sobrenadantes para conocer los niveles de expresión de la proteasa MarP_{Sol} inicialmente no se observan diferencias en el patrón de proteínas en el SDS-PAGE teñido con azul de Coomassie (**Figura 8.23** carriles 2-6), sin embargo, al realizar el inmunomarcaje en el *western blot* se encontró un patrón de bandas dependientes del pH al que se realizó la fermentación. Mientras que a pH ácidos se encontraron

las bandas de ~28 kDa y la otra de un tamaño mayor (**Figura 8.23** carriles 7-9), conforme aumenta el pH se observa una disminución de la señal en la banda de ~28 kDa y a la par aparece una banda en un tamaño entre los 28 y 38 kDa que teóricamente puede coincidir con el tamaño real de la proteasa MarP_{Sol} (**Figura 8.23** carriles 10 y 11). A su vez también se encontró que cuando la fermentación se realizó a pH 8.0 la banda superior no apareció. Con base en esto se definió como condición de fermentación utilizar el medio de cultivo a pH 6.0 en la cual se mantiene la presunta actividad de proteasa en un punto medio.

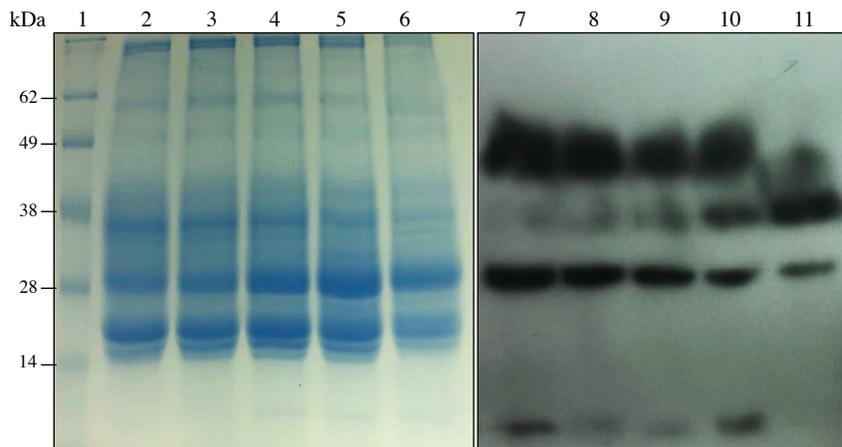


Figura 8.23. Evaluación de la expresión de MarP_{Sol} en diferentes pH. Las muestras se analizaron por SDS-PAGE (carriles 1 – 4) y *western blot* (carriles 7 – 11). Las muestras que se cargaron corresponden al sobrenadante de las fermentaciones realizadas a pH 4.0 (carriles 2 y 7), pH 5.0 (carriles 3 y 8), pH 6.0 (carriles 4 y 9), pH 7.0 (carriles 5 y 10) y pH 8.0 (carriles 6 y 11).

8.3.3. Purificación de MarP recombinante por cromatografía de afinidad a níquel.

Posteriormente, y haciendo uso de la etiqueta de histidinas fusionada con la proteína recombinante MarP se realizó su purificación mediante cromatografía de afinidad a los iones de níquel. Además de ser un paso en el que se purificó MarP_{Sol} y se eliminaron todas las otras proteínas presentes en el mismo sobrenadante de cultivo de *P. pastoris*, también fue un paso que funcionó como para concentrar la proteína, al obtener en las primeras dos eluciones colectadas

la totalidad de la misma, siendo la primer fracción la que mostró una mayor intensidad en el *western blot* y un producto residual en la segunda colección (**Figura 8.24** carriles 2-3).

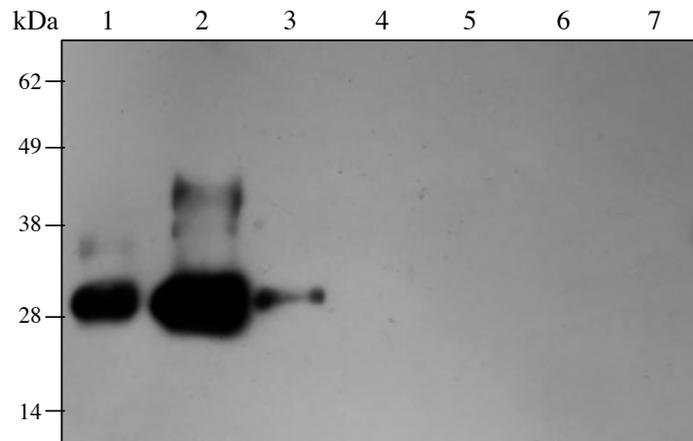


Figura 8.24. Purificación de MarP_{Sol} por cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Las muestras que se cargaron corresponden al sobrenadante de la fermentación (control positivo; carril 1), MarP_{Sol} purificada (carriles 2 y 3) y fracciones siguientes de la elución durante el método de purificación (carriles 4 y 7).

La purificación de MarP_{Sol} mostró un óptimo rendimiento al no observar pérdidas de proteína recombinante durante los diferentes pasos del proceso de purificación. En la **Figura 8.25** se muestra la evidencia sobre como durante los lavados de la resina para purificar MarP_{Sol} no hubo desprendimiento de esta que pudiera significar una disminución en la eficiencia del método.

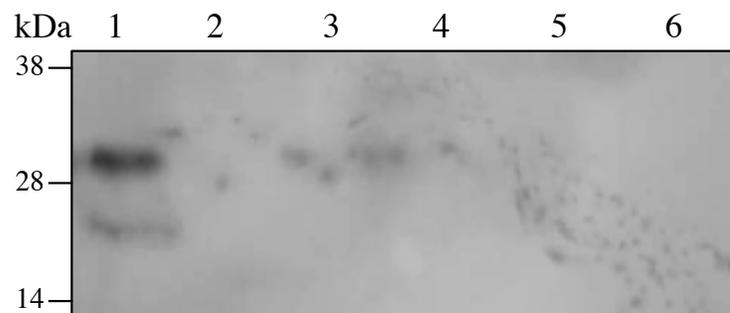


Figura 8.25. Pasos de lavado durante la purificación de MarP_{Sol} por cromatografía de afinidad a Ni²⁺. Las muestras que se cargaron corresponden al sobrenadante de la fermentación (control positivo; carril 1) y a los diferentes pasos de lavado de la resina en interacción con MarP_{Sol} (carriles 2 – 6).

8.3.4. Eliminación de imidazol en MarP recombinante purificada con columnas PD-10.

Uno de los inconvenientes con el método de purificación por cromatografía de afinidad a Ni^{2+} fue la presencia de una elevada concentración de imidazol y NaCl en las muestras de proteína, por lo que para eliminar estos solutos se utilizó un sistema de desalado con las columnas PD-10 y la matriz de *sephadex* G25. Como se presenta en la **Figura 8.26** (carril 2) la proteína purificada se recuperó en la muestra desalada, no observando pérdidas durante el método al realizar lavados adicionales de la columna PD-10. La concentración promedio de proteína MarP_{Sol} obtenida hasta este punto del proceso de purificación fue de $45.3 \pm 13.4 \mu\text{g/mL}$, en un protocolo de fermentación de 100 mL.

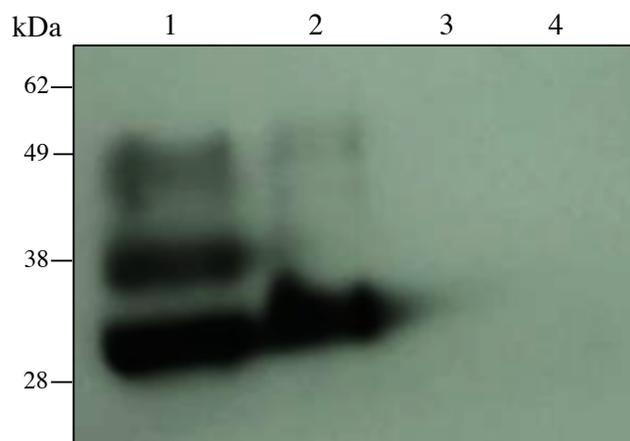


Figura 8.26. Desalado de MarP_{Sol} con columnas PD-10. Las muestras que se cargaron corresponden al sobrenadante de la fermentación (control positivo; carril 1), MarP_{Sol} desalado (carril 2) y lavados de columna PD-10 (carril 3 – 4).

Para validar la eliminación de los solutos contaminantes en la muestra de MarP_{Sol} purificada, se monitoreó la presencia del imidazol mediante un análisis espectrofotométrico utilizando un NanoDrop 2000. Inicialmente se definió el espectro de absorción del imidazol haciendo uso de una curva estándar entre 0.062 – 1 M en un rango de longitud de onda entre los

200 y 300 nm, encontrando el punto óptimo de absorción a los 230 nm (**Figura 8.27A**). Una vez definido este parámetro, se realizaron las lecturas de absorbancia a 230 nm en las muestras eluidas en la columna PD-10, observando que en la primera elusión que corresponde a la de la muestra MarP_{sol} los niveles de imidazol son menores a los de una concentración de 0.062 M (**Figura 8.27B**). Posteriormente conforme se realizan mas eluciones, los pequeños solutos que habían sido retenidos en la matriz de *sephadex* G25 comenzaron a presentarse, observando mayores niveles de absorbancia a 230 nm con tendencia al incremento en los lavados de la columna PD-10 (**Figura 8.27B**).

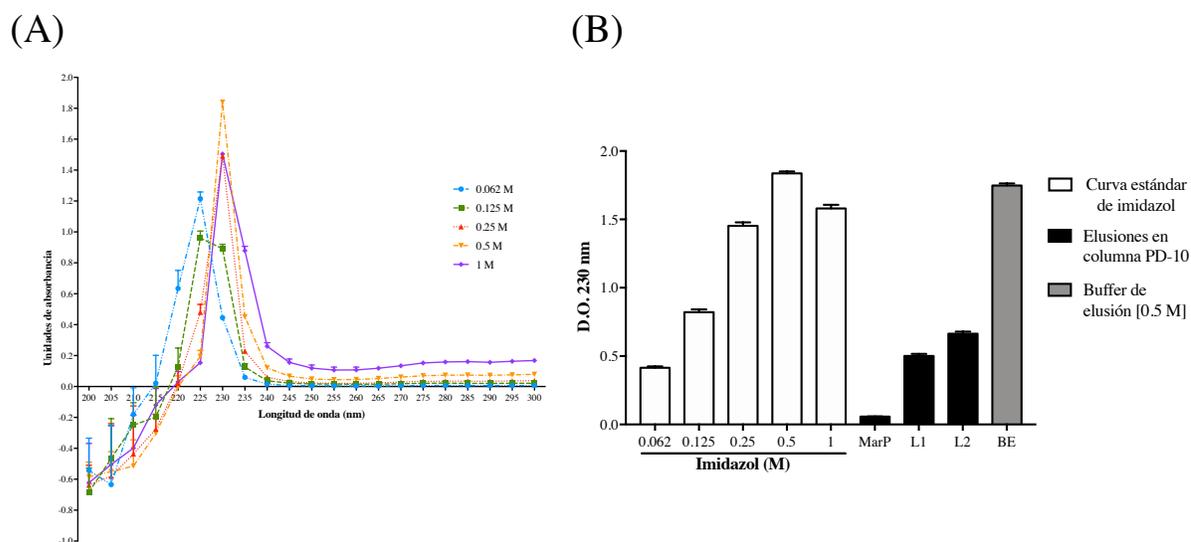


Figura 8.27. Análisis espectrofotométrico del imidazol en muestras desaladas por columnas PD-10. (A) Espectro de absorción de imidazol [0.062 – 1 M] entre los 200 – 300 nm. (B) Lecturas de absorbancia del imidazol a 230 nm. Las barras en blanco muestran el patrón de la curva estándar; las barras en negro corresponden a las muestras eluidas en la columna PD-10; la barra gris representa el buffer de elusión utilizado durante la cromatografía de afinidad a Ni²⁺, cuya concentración de imidazol es de [0.5 M].

8.3.5. Análisis de glicosilación en la proteína recombinante MarP.

Dentro de las características descritas en las proteínas de *M. tuberculosis* se menciona la capacidad de incorporarles residuos de carbohidratos, principalmente pequeñas cadenas de

residuos manosilados, y a su vez esta es una propiedad similar a las modificaciones postraduccionales llevadas a cabo en la levadura *P. pastoris*, principalmente en residuos N-X-T/S. En la secuencia aminoacídica de la proteasa MarP se ubicaron dos potenciales sitios de glicosilación con base en el dominio N-X-T/S (**Figura 8.28A**). Al analizar la estructura tridimensional de la proteasa MarP (PDB ID: 3K6Y) se observó que los sitios probables de glicosilación se localizan relativamente alejados del sitio activo, lo que sugiere que no existiría una interferencia en su actividad enzimática (**Figura 8.28B**).

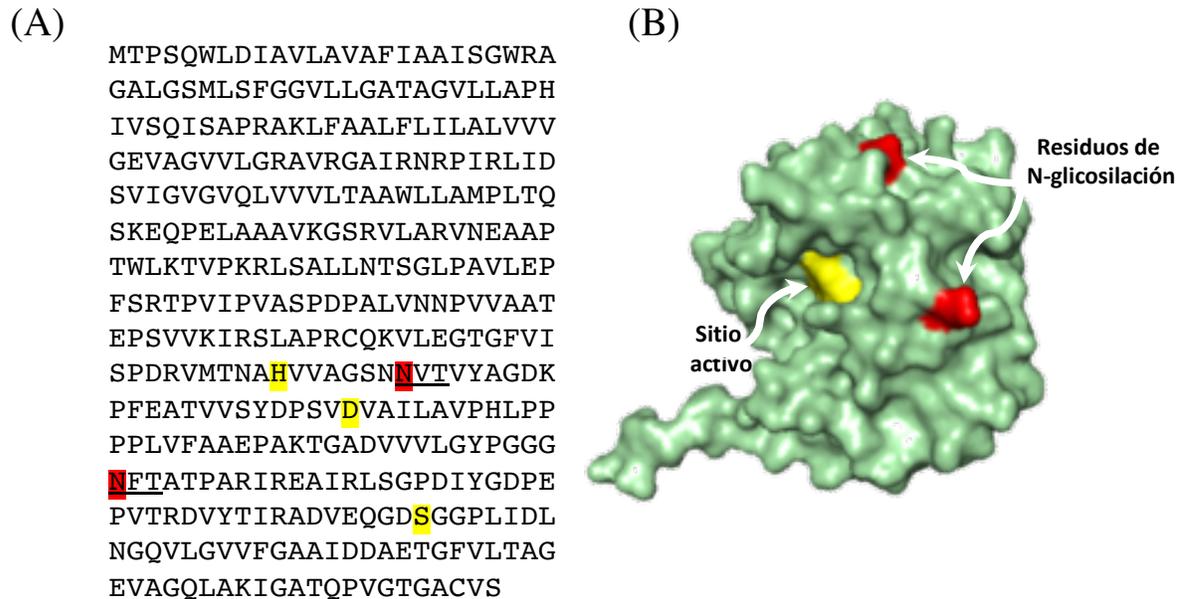


Figura 8.28. Presencia de glicosilaciones en la proteasa MarP_{sol}. (A) Secuencia aminoacídica de MarP en la que se señalan los residuos catalíticos del sitio activo (amarillo) y los probables sitios de glicosilación N-X-T/S (subrayado) con énfasis en el residuo de asparagina (rojo). (B) Representación tridimensional de la proteasa MarP en donde se resaltan el sitio activo (amarillo) y los residuos de glicosilación (rojo).

Posteriormente, para validar de manera experimental la presencia de glicosilaciones en la proteína MarP_{sol} expresada en *P. pastoris*, la proteína recombinante fue tratada con la glicosidasa PNGasa F para remover todos aquellos oligómeros de carbohidratos enlazados en

forma de N-glicosilaciones a diferentes residuos de asparagina. Después del tratamiento enzimático la proteína MarP_{Sol} fue resuelta en un gel de poliacrilamida y revelada en un *western blot* encontrando una pérdida en su peso molecular por debajo de los 28 kDa, en comparación con la proteína no tratada con la glicosidasa PNGasa F, sugiriendo que esa diferencia de peso molecular es proporcionado por las glicosilaciones en la proteína (**Figura 29**).

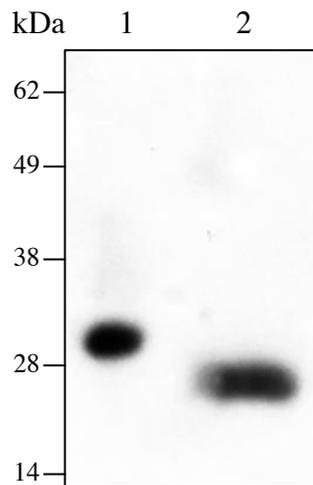


Figura 8.29. Deglicosilación de la proteasa MarP_{Sol} con PNGasa F. Análisis por *western blot* en donde se muestra la señal correspondiente a MarP_{Sol} con su tamaño de aproximadamente 28 kDa (carril 1) y MarP_{Sol} + PNGasa F con un tamaño inferior a los 28 kDa (carril 2).

8.4. EVALUACIÓN DE ACTIVIDAD *IN VITRO* DE MarP RECOMBINANTE.

8.4.1. Digestión de albúmina y evaluación de proteólisis por electroforesis de proteínas.

Dentro del propósito de expresar a la proteasa MarP está el conocer el efecto enzimático que esta presenta en un modelo biológico, por lo que para validar su actividad de proteasa se realizaron una serie de ensayos en donde se expuso a la proteína recombinante a diferentes substratos. Primeramente se realizó un ensayo de proteólisis en el que se utilizó ASB como substrato y MarP_{Sol} fue incorporada en la reacción en concentraciones de [5 µg/mL] y [10

$\mu\text{g/mL}$]. Posterior al tiempo de incubación las reacciones fueron procesadas por SDS-PAGE, observando distintos patrones de corrimiento entre las digestiones realizadas con tripsina y las diferentes concentraciones de MarP_{Sol} (**Figura 8.30A**). Adicionalmente, se realizó una semicuantificación de la albúmina que no fue degradada, considerando la reacción sin enzima como el 100% (**Figura 8.30A**, carril 2), y con base en esto se observó un remante del 18.9% para el control positivo de tripsina, mientras que en los tratamiento de MarP_{Sol} se conservó el 43.9% (5 $\mu\text{g/mL}$) y 16.8% (10 $\mu\text{g/mL}$), lo que se consideró como la primer evidencia de actividad de proteasa (**Figura 8.30B**).

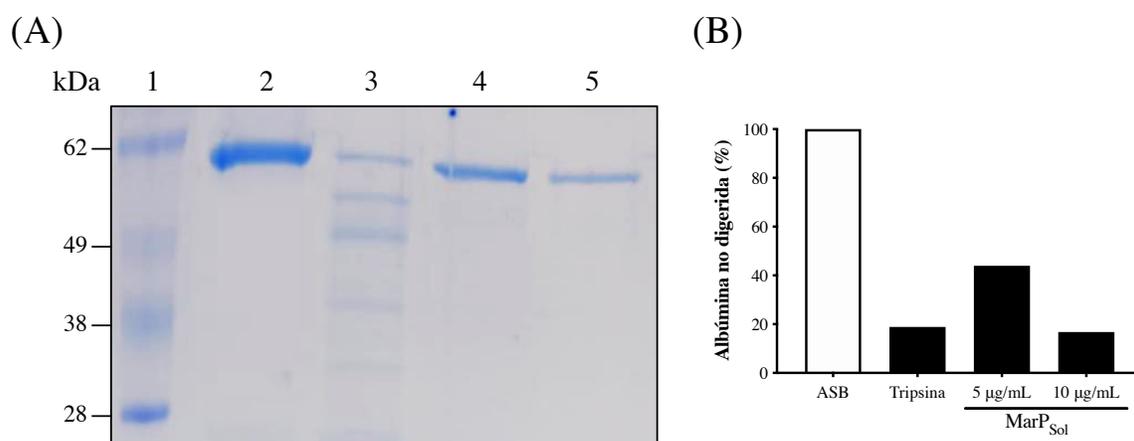


Figura 8.30. Digestión de albúmina por MarP_{Sol} y análisis por SDS-PAGE. (A) Representación de un gel de poliacrilamida al 15% en el que se muestran (1) marcador de peso molecular, (2) albúmina no digerida, (3) albúmina digerida con tripsina, (4) albúmina digerida con MarP_{Sol} [5 $\mu\text{g/mL}$], (5) albúmina digerida con MarP_{Sol} [10 $\mu\text{g/mL}$]. Análisis semicuantitativo del porcentaje de albúmina no digerida, tomando como el 100% el control negativo (barra blanca). (B) La semicuantificación se realizó en el programa ImageJ.

8.4.2. Evaluación de actividad de proteasa tipo tripsina por hidrólisis de *p*-nitroanilina.

La proteasa MarP es descrita como poseedora de un dominio de actividad tipo tripsina, por lo que para definir esta característica se realizó un segundo análisis de proteólisis empleando el sustrato N α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida (BAPNA). Cuando el sustrato BAPNA es

procesado proteolíticamente por una serin proteasa con actividad del tipo tripsina, este generará un producto de color amarillo derivado de la hidrólisis de la *p*-NA y el α -Benzoil-L-arginina (Figura 8.31A). Inicialmente, para definir la concentración ideal del sustrato en la reacción de proteólisis, este se utilizó en un rango de 1 mM – 10 mM, empleando tripsina como proteasa modelo en una concentración de [35 μ g/mL], y monitoreando la liberación de *p*-NA midiendo su absorbancia a 405 nm durante una cinética de 2 horas. Con base en esta cinética se definió una concentración de 5 mM de sustrato como un punto medio en el que es posible ubicar la velocidad inicial de la reacción hasta la llegada a su punto de equilibrio (Figura 8.31B).

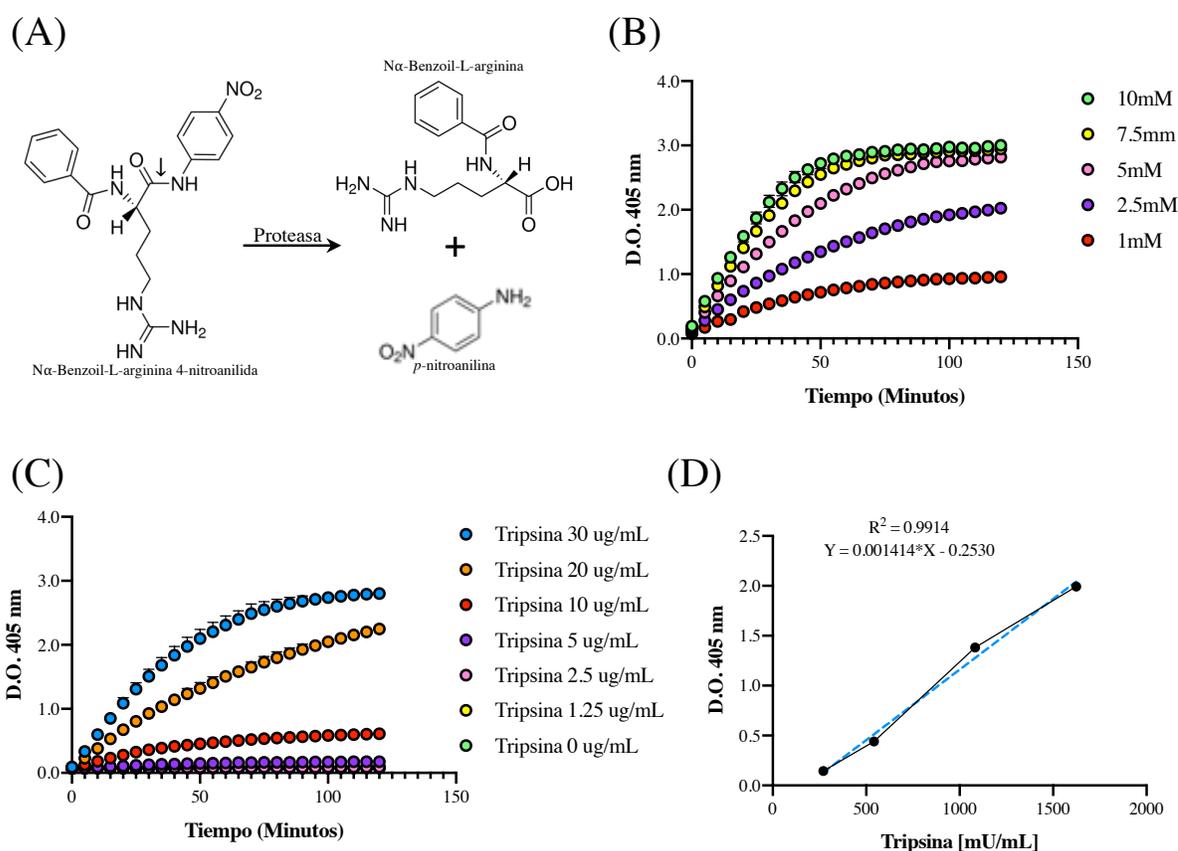


Figura 8.31. Hidrólisis de BApNA por tripsina y estandarización del sistema para cuantificación de actividad proteolítica. (A) Representación de la reacción de hidrólisis del sustrato α -Benzoil-L-arginina 4-nitroanilida por acción de proteasas con actividad de tipo tripsina. En el compuesto BApNA se identifica el enlace (\downarrow) que al hidrolizarse por acción de una proteasa de serina genera los productos α -Benzoil-L-arginina y *p*-nitroanilina. (B)

Hidrólisis de BApNA (1 mM – 10 mM) con tripsina [35 µg/mL] y medición de *p*-NA a 405 nm. (C) Hidrólisis de BApNA [5 mM] con tripsina (1.25 µg/mL – 30 µg/mL) y medición de *p*-NA a 405 nm. (D) Curva de calibración de actividad proteolítica con respecto a la medición de *p*-NA a 405 nm. Las unidades de actividad se calcularon con base en la actividad de tripsina de 54.12 mU/µg y con respecto a las concentraciones utilizadas en (C) definiendo el rango lineal entre los 270.6 mU/mL (5 µg/mL) – 1623.6 mU/mL (30 µg/mL).

Posteriormente, se definió el rango dinámico de la reacción utilizando tripsina como modelo, en un rango de concentraciones desde los [1.25 µg/mL] – [30 µg/mL], con los 5 mM de BApNA previamente definidos (**Figura 8.31C**). Con base en la evidencia anterior, se construyó una curva de calibración para poder interpolar la actividad de la proteasa MarP_{Sol} a partir de las absorbancias obtenidas de sus reacciones proteolíticas empleando el sistema previamente definido. La curva de calibración fue construida con las unidades de actividad de tripsina (mU/mL) tomando en consideración que 1 µg de tripsina posee 54.12 mU de actividad enzimática (**Figura 8.31D**).

Con base en el sistema previamente establecido, se realizaron las determinaciones empleando ahora como enzima a la proteasa MarP_{Sol} purificada. Primeramente, se monitoreó la liberación de *p*-NA en la reacción proteolítica llevando a cabo la reacción a pH 4.0, pH 7.0 y pH 8.0, observando una tasa de hidrólisis muy parecida entre las diferentes condiciones (**Figura 8.32A**). Cuando se calculó la actividad de proteasa igualmente se observaron niveles muy similares de 274.7 ± 0.53 mU/mL para la reacción desarrollada a pH 4.0, 277.3 ± 1.87 mU/mL a pH 7.0 y de 277.2 ± 1.72 mU/mL cuando esta se desarrolló a pH 8.0 (**Figura 8.32B**). Con base en estos resultados se estableció la condición de pH 7.0 para desarrollar las reacciones de proteólisis utilizando MarP_{Sol} con el sustrato BApNA.

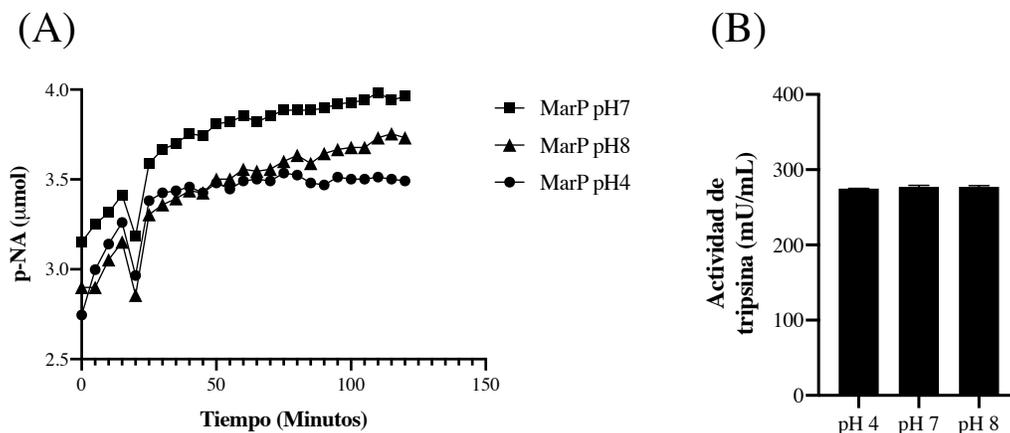


Figura 8.32. Cuantificación de actividad de MarP_{Sol} en diferentes pH. (A) Se midió la cinética de liberación del *p*-NA en función de la actividad de MarP_{Sol} a pH 4.0, pH 7.0 y pH 8.0. (B) La cuantificación de la actividad de MarP_{Sol} se calculó interpolando las absorbancias de la reacción desarrollada a pH 4.0, pH 7.0 y pH 8.0 en la curva de actividad de tripsina.

Finalmente, como se mencionó en la **Figura 8.28B** la existencia de probables sitios de glicosilación en MarP_{Sol} se ubican relativamente alejados del dominio catalítico, lo que en teoría no tendría efectos sobre sus niveles de actividad. Para validar este hecho, una MarP_{Sol} tratada con PNGasa F fue utilizada para llevar a cabo la reacción de proteólisis utilizando BApNA como sustrato. Al realizar una cinética de liberación de *p*-NA se observó un comportamiento relativamente similar entre los tratamientos (**Figura 8.33A**), y cuando se calculó la actividad de proteasa se encontró un nivel 375.7 ± 1.57 mU/mL para MarP_{Sol} y de 380.5 ± 2.19 mU/mL en el tratamiento de la proteína desglicosilada (**Figura 8.33B**), concluyendo con esta evidencia que los residuos de carbohidratos no influyen sobre la capacidad enzimática de la proteasa MarP_{Sol}. La actividad de proteasa de MarP_{Sol} fue calculada para cada uno de los lotes de proteína recombinante producida y purificada presentando ligeras variaciones entre producciones, sin embargo realizando un análisis entre diferentes lotes de MarP_{Sol} se calculó una actividad de proteasa promedio de 294.0 ± 59.87 mU/mL.

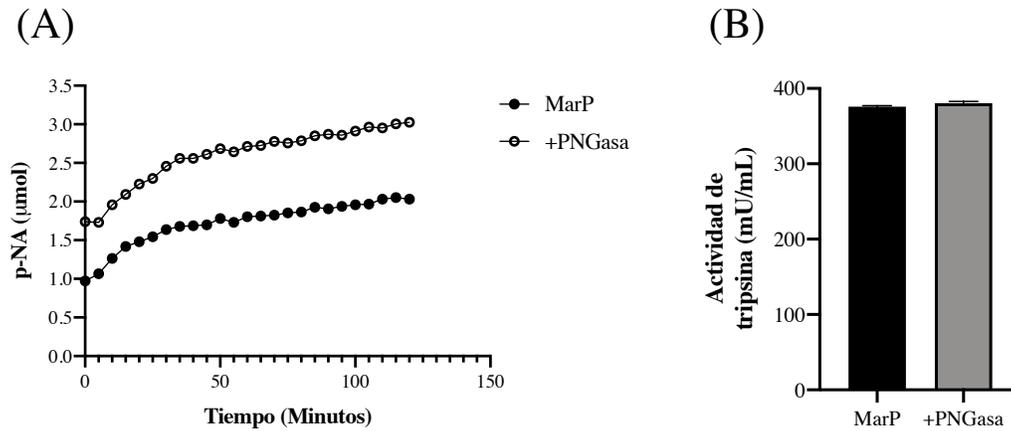


Figura 8.33. Cuantificación de actividad de MarP_{Sol} desglucosilada. (A) Se midió la cinética de liberación del *p*-NA en función de la actividad de MarP_{Sol} y MarP_{Sol} + PNGasa F. (B) La cuantificación de la actividad de MarP_{Sol} se calculó interpolando las absorbancias de la reacción desarrollada con MarP_{Sol} y MarP_{Sol} + PNGasa F, en la curva de actividad de tripsina.

8.5. EFECTO DE MarP EN LA POLARIZACIÓN DE MACRÓFAGOS.

8.5.1. Evaluación del efecto de la proteasa MarP con monocitos humanos purificados.

Una vez que se validó que la proteína recombinante MarP_{Sol} expresada en *P. pastoris* presentaba una actividad de proteasa funcional y se determinó dicha actividad, lo siguiente fue llevar el biológico a un sistema *in vitro* de diferenciación de macrófagos. Inicialmente una población de monocitos humanos purificados fueron expuestos a una serie de concentraciones de MarP_{Sol} y en primera instancia se determinó que a los [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] las células se observaron adheridas a la placa con ligeros cambios morfológicos, lo que sugiere una respuesta favorable por parte del estímulo a las células (**Figura 8.34A**). Así mismo se midió mediante el ensayo de MTS la actividad metabólica de las células estimuladas con MarP_{Sol} como indicativo de viabilidad celular con respecto a aquellas células no tratadas, encontrando que no existe una diferencia estadísticamente significativa entre los tratamientos (**Figura 8.34B**).

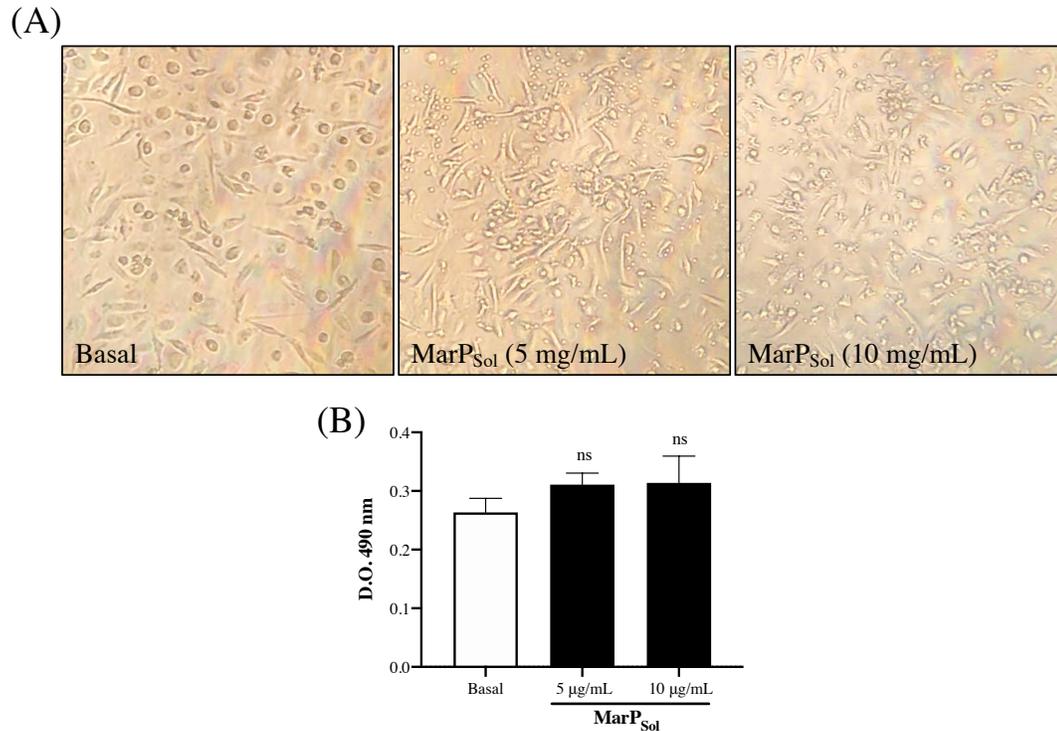


Figura 8.34. Análisis de viabilidad celular en monocitos humanos purificados y estimulados con MarP_{Sol}. (A) Imágenes representativas de un cultivo celular *in vitro* de monocitos estimulados con MarP en concentraciones de [5 µg/mL] y [10 µg/mL]. El control basal corresponde a células sin estímulo. (B) El análisis de viabilidad con MTS se realizó con las células posterior al protocolo de diferenciación. La absorbancia se midió a 490 nm y el análisis estadístico se realizó comparando las absorbancias con respecto al control basa.

Posteriormente, habiendo demostrado el efecto inocuo que presentó la proteasa MarP_{Sol} en estas dosis frente a los monocitos humanos, los sobrenadantes de cultivo fueron colectados y tratados para la cuantificación de IL-12 o IL-4, como los marcadores de diferenciación a macrófagos M1/M2 que anteriormente se había definido¹⁸⁷. Cuando las células fueron tratadas con [5 µg/mL] y [10 µg/mL] de MarP_{Sol} se detectaron niveles de IL-12p40 de hasta 93.8 ± 51.0 pg/mL y 46.9 ± 9.9 pg/mL, respectivamente, mostrándose significativamente distintos de las células control (**Figura 8.35A**). Por su parte, cuando se cuantificó la liberación de IL-4 esta citocina fue apenas medible en algunos individuos, encontrando valores de 7.8 ± 4.4 pg/mL

para la dosis de [5 $\mu\text{g}/\text{mL}$] y de 14.7 ± 11.0 pg/mL para los [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] de MarP_{Sol} (**Figura 8.35B**).

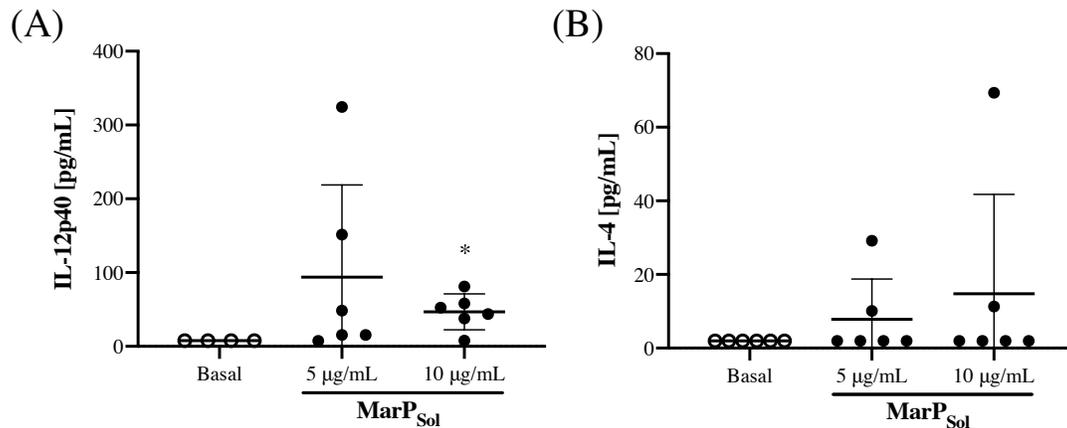


Figura 8.35. Cuantificación de citocinas IL-12p40 e IL-4 en monocitos estimulados con MarP_{Sol}. Determinación de los niveles de IL-12p40 (A) e IL-4 (B) en cultivo celular de macrófagos derivados de monocitos humanos purificados estimulados por tres días con MarP_{Sol}. Los valores son expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las células no estimuladas fueron utilizadas como tratamiento control para los niveles basales de producción de citocinas.

A pesar de haber encontrado niveles diferenciales de las dos citocinas cuantificadas, sorprendentemente la detección de IL-12p40 fue un resultado más consistente en los monocitos estimulados con MarP_{Sol}, con respecto a cuando en el proceso de diferenciación de macrófagos se emplean las proteasas trombina o tripsina, con niveles consistentes de IL-4.

8.5.2. Efecto de la proteasa MarP en monocitos de la línea celular THP-1.

Debido a la alta tasa de variación que aparecieron en los resultados de citocinas de los cultivos de células humanas purificadas, como se ha descrito previamente¹⁸⁷, el modelo de polarización de macrófagos fue posteriormente replicado ahora en la línea celular de monocitos humanos THP-1. Empleando la dosis fijada de [10 $\mu\text{g}/\text{mL}$] de la proteasa recombinante MarP_{Sol} se

realizaron las cuantificaciones de las citocinas IL-12p40 e IL-4, no encontrando resultados en estas determinaciones (**Figura 8.36AB**). Sin embargo, el modelo fue validado con base en los controles de polarización, en donde en los macrófagos M1 se detectaron niveles de IL-12p40 de 1924.0 ± 15.9 pg/mL (**Figura 8.36A**), mientras que para los macrófagos M2 se obtuvieron niveles de IL-4 de 554.8 ± 6.8 pg/mL (**Figura 8.36B**).

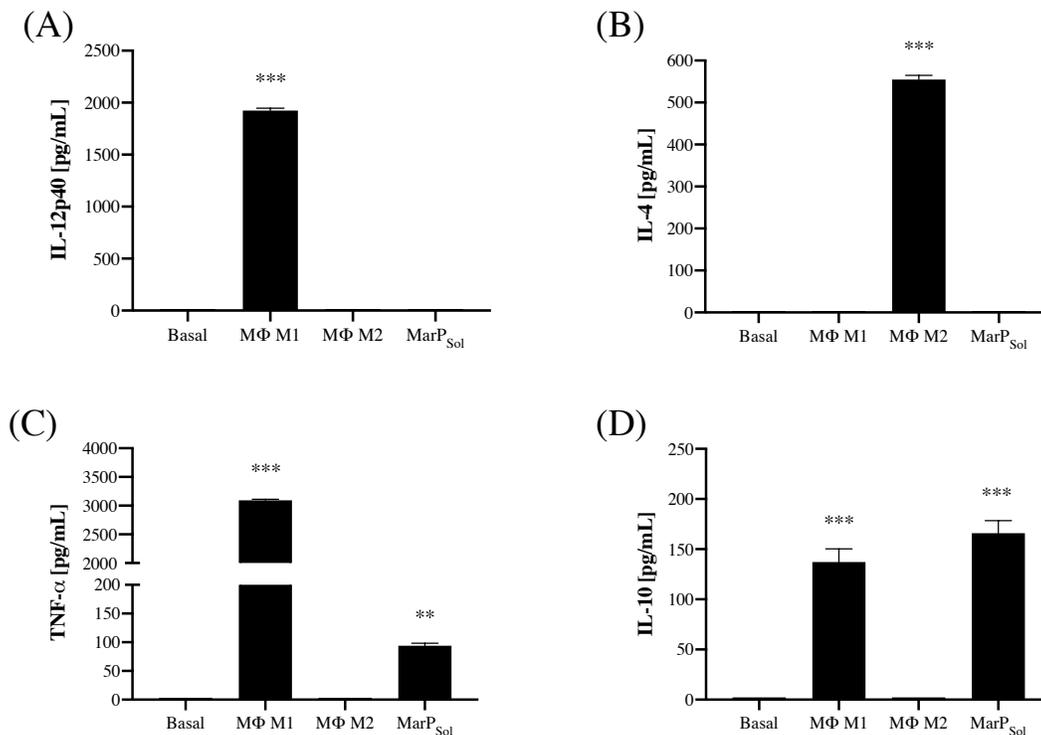


Figura 8.36. Cuantificación de citocinas IL-12p40, IL-4, TNF- α e IL-10 en células THP-1 estimuladas con MarP_{Sol}. Determinación de los niveles de IL-12p40 (A), IL-4 (B), TNF- α (C) e IL-10 (D) en cultivo celular de monocitos THP-1 estimulados por tres días con MarP_{Sol}. Los valores son expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las células no estimuladas fueron utilizadas como tratamiento control para los niveles basales de producción de citocinas. Los controles de macrófagos M1 (IFN- γ / LPS) y M2 (M-CSF / IL-4) fueron empleados como controles positivos para validar la producción de citocinas.

Con base en los resultados anteriores no se observaron los criterios para definir el fenotipo de macrófago M1/M2 basado en la producción de las citocinas IL-12p40 e IL-4, por lo que al tomar el indicio de los monocitos purificados sobre un posible fenotipo pro-inflamatorio se realizó la cuantificación de TNF- α en los sobrenadantes de cultivo de las células estimuladas

con MarP_{Sol}, encontrando niveles de 93.9 ± 3.0 pg/mL (**Figura 8.36C**), sin embargo, adicionalmente también observamos la detección de la citocina de carácter anti-inflamatorio IL-10 (165.9 ± 8.8 pg/mL; **Figura 8.36D**), aunque con una ligera variación entre ensayos por lo que en ocasiones no fue posible su cuantificación.

8.5.3. Participación de los receptores PARs en la actividad de la proteasa MarP.

Las proteasas de serina han sido utilizadas como un estímulo en la diferenciación de macrófagos M1/M2, y recientemente se ha demostrado que estas participan en dicho proceso a través de la activación de los receptores PARs. Posteriormente a la evidencia obtenida, para demostrar si el efecto de la proteasa MarP_{Sol} en el cultivo de células THP-1 es dependiente de su actividad enzimática como proteasa, MarP_{Sol} fue inactivada por calor a 80 °C por 1 hora, y utilizada como estímulo de diferenciación encontrando que los niveles de producción de TNF- α se redujeron dramáticamente (**Figura 8.37A**).

Si la producción de TNF- α por acción de la proteasa MarP_{Sol} es dependiente de su actividad enzimática, probablemente la activación de los receptores PARs estén jugando un papel importante, por lo que en inicio se bloqueó la activación del receptor PAR1 empleando el inhibidor SCH79797, con lo que los niveles de TNF- α detectados después de la estimulación con MarP_{Sol} se redujeron significativamente entre un 92.5 % – 71.9 % (**Figura 8.37A**). Aunque el inhibidor SCH79797 se ha identificado como un fármaco que puede generar un efecto nocivo en células en cultivo, las concentraciones utilizadas en el experimento han sido previamente definidas como inocuas preservando sus efectos como inhibidor. Para validar este planteamiento se desarrolló un análisis de viabilidad con MTS sobre las células tratadas con SCH79797 y la proteasa MarP_{Sol} encontrando una viabilidad similar a las del tratamiento basal (**Figura 8.37B**).

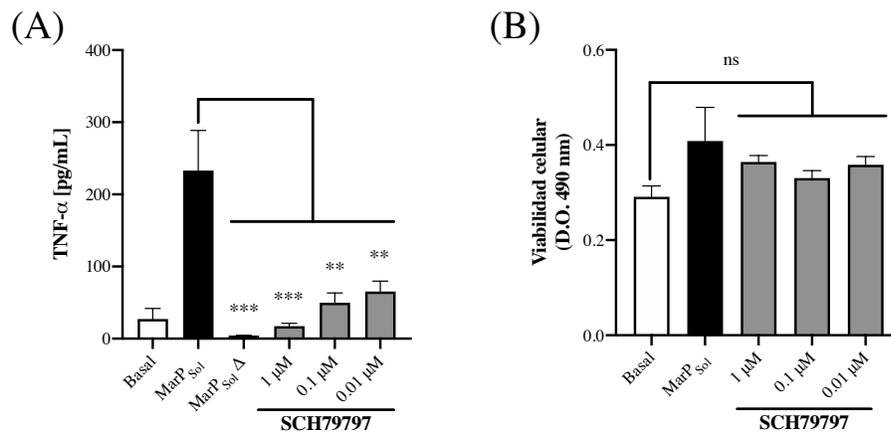


Figura 8.37. Efecto de la inhibición del receptor PAR1 en células THP-1 estimuladas con MarP_{Sol}. (A) Cuantificación de los niveles de TNF-α en células THP-1 tratadas con MarP_{Sol}, MarP_{Sol} inactivada por calor (Δ) y MarP_{Sol} en presencia del inhibidor del PAR1 SCH79797 [0.01 μM, 0.1 μM y 1 μM]. Los valores son expresados como la media ± SD de tres experimentos independientes. Las células no estimuladas fueron utilizadas como tratamiento control para los niveles basales de producción de citocinas. (B) Determinación de la viabilidad en células expuestas a MarP_{Sol} y el inhibidor del PAR1 SCH79797. La viabilidad celular se comparó con respecto a las células que no recibieron un estímulo.

Análogamente a lo observado en las células THP-1 estimuladas con MarP_{Sol} cuando se inhibió la vía desencadenada por la activación del PAR1, al utilizar el péptido sintético FSLLRY-NH₂ se encontró una reducción en los niveles de TNF- α de entre los 80.5 % – 74.9 % (Figura 8.38A).

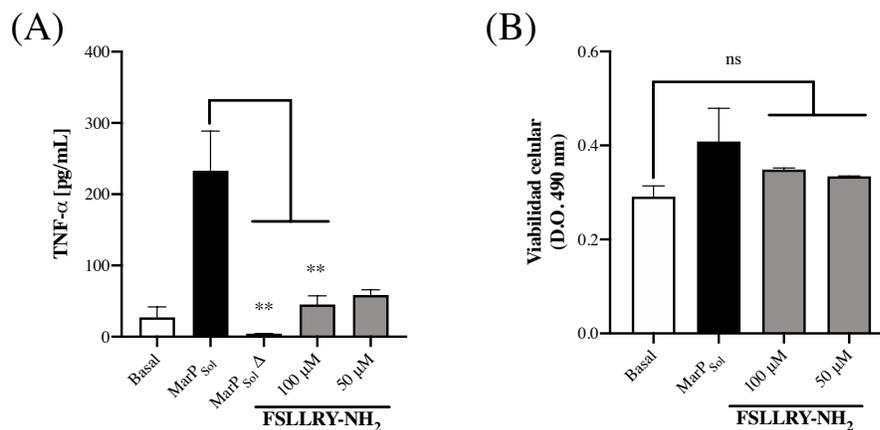


Figura 8.38. Efecto de la inhibición del receptor PAR2 en células THP-1 estimuladas con MarP_{Sol}. (A) Cuantificación de los niveles de TNF- α en células THP-1 tratadas con MarP_{Sol}, MarP_{Sol} inactivada por calor (Δ) y MarP_{Sol} en presencia del inhibidor del PAR2 FSLLRY-NH₂ [50 μ M y 100 μ M]. Los valores son expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las células no estimuladas fueron utilizadas como tratamiento control para los niveles basales de producción de citocinas. (B) Determinación de la viabilidad en células expuestas a MarP_{Sol} y el inhibidor del PAR2 FSLLRY-NH₂. La viabilidad celular se comparó con respecto a las células que no recibieron un estímulo.

Al realizar el análisis de viabilidad celular para conocer los efectos tóxicos que el inhibidor del receptor PAR2 pudiera presentar sobre las células THP-1 en cultivo, no se encontraron diferencias con respecto a las células en estado basal, considerando de esta forma un rango de concentraciones inocuo para las células (**Figura 8.38B**).

8.5.4. Vías de señalamiento implicadas en los macrófagos estimulados con MarP.

En este punto la proteasa MarP_{Sol} a mostrado tener un efecto sobre las células THP-1 con la liberación de TNF- α y que a su vez esta inducción implica la participación de los receptores PAR1/2. Para indagar con profundidad, se observó que al bloquear una serie de vías de señalamiento intracelular consideradas puntos clave en la expresión del TNF- α (NF- κ B, MAPK y PKC) cuando las células son estimuladas con MarP_{Sol}, los niveles de expresión de esta citocina son reducidos dramáticamente a 11.44 ± 2.7 pg/mL (BAY 11-7082), 43.3 ± 6.6 pg/mL (U0126) y 84.9 ± 8.3 pg/mL (Ro-32-0432), comparados con los niveles inducidos por MarP_{Sol} de 250.7 ± 72.4 pg/mL (**Figura 39A**).

Las vías de señalamiento en estudio, NF- κ B, MAPK y PKC, implican una serie de procesos vitales para la célula, por lo que su inhibición puede repercutir en su funcionamiento normal e inclusive impactar en su viabilidad celular, por lo tanto, para descartar que estas reducciones tan abruptas en los niveles de TNF- α generados por la estimulación con MarP_{Sol}, sean debido a efectos tóxicos de los inhibidores utilizados se realizó un ensayo de MTS,

encontrando que los tratamientos no presentaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a las células control no tratadas (**Figura 39B**).

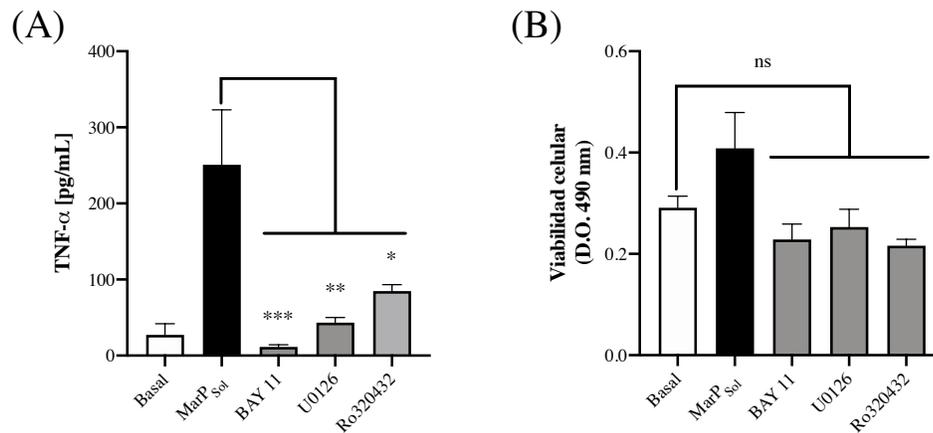


Figura 8.39. Inhibición de señalización intracelular en células THP-1 estimuladas con MarP_{Sol}. (A) Cuantificación de los niveles de TNF- α en células THP-1 tratadas con MarP_{Sol}, y MarP_{Sol} en presencia de los inhibidores de las vías NF- κ B (BAY 11-7082 [5 μ M]), MAPK (U0126 [10 μ M]) y PKC(Ro-32-0432 [20 μ M]). Los valores son expresados como la media \pm SD de tres experimentos independientes. Las células no estimuladas fueron utilizadas como tratamiento control para los niveles basales de producción de citocinas. (B) Determinación de la viabilidad en células expuestas a MarP_{Sol} y los inhibidores de NF- κ B (BAY 11-7082), MAPK (U0126) y PKC (Ro-32-0432). La viabilidad celular se comparó con respecto a las células que no recibieron un estímulo.

Con base en toda la evidencia presentada, la proteasa MarP_{Sol} expresada en *P. pastoris* presentó un efecto sobre la línea celular de monocitos humanos THP-1 al inducir la liberación de la citocina TNF- α , un efecto que depende de la actividad de proteasa *per se* de MarP_{Sol} a través de la activación de los receptores PAR1/2, y en donde las vías de señalamiento intracelular NF- κ B, MAPK y PKC presentan cierto grado de participación.

CAPITULO IX

DISCUSIÓN

La proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* empleada en este trabajo fue expresada de manera recombinante en el sistema de producción de proteínas heterólogas en la levadura *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffi*), debido a las ventajas que este sistema ofrece para la producción de proteínas micobacterianas, incluyendo la similitud en las modificaciones postraduccionales, el uso de codones y las grandes cantidades de proteína libre de LPS^{192,193}. Previamente, MarP fue una proteasa que se expresó de manera recombinante en *Escherichia coli* en una versión que carecía de sus dominios transmembranales desde los residuos 142 al 397, debido a que la forma completa de la proteína presentó efectos tóxicos en la bacteria¹⁸⁹. Con esto en consideración se buscó la expresión en *P. pastoris*, tanto de una forma completa (MarP_{TM}) como de una forma recortada carente de los mencionados cruces transmembranales y la cual se designó como la forma soluble (MarP_{Sol}). A pesar de que las levaduras recombinantes con la forma transmembranal no presentaron defectos en su crecimiento y mostraron el genotipo positivo Rv3671c_{TM} al realizar su amplificación por PCR, no fue posible la detección a nivel de proteína por *western blot* utilizando el anticuerpo c-Myc. Esta forma transmembranal estuvo ausente en la evaluación tanto de sobrenadantes como de lisados completos de levadura, descartando la

posible traducción de esta variante. Adicionalmente, se evaluó por RT-PCR la expresión del transcrito codificante para la forma transmembranal, encontrando un resultado negativo.

Posteriormente, los experimentos solo consideraron a la proteasa recombinante MarP_{Sol}, una proteína con un tamaño teórico de 31.8 kDa, considerando los elementos añadidos durante su clonación, sin embargo los resultados mostraron un enriquecimiento en una banda con un tamaño cercano a los 28 kDa. El análisis realizado a diferentes pH como condición de fermentación, mostró una desaparición de la banda con tamaño superior a los 38 kDa a pH 8.0, coincidiendo con un efecto favorecido por la proteasa Kex2, responsable de retirar la secuencia de señal factor- α ¹⁹⁴. Por otro lado, al observar la expresión de la proteína recombinante en diferentes condiciones de pH se encuentra un incremento en la intensidad en la banda de entre 28 – 38 kDa (31.8 kDa) a mayor alcalinidad en el medio, mientras que la banda de 28 kDa se mantiene enriquecida a pH bajo. Con base en lo anterior, dado que la actividad fisiológica de MarP se ha visto asociada a las condiciones de pH ácido para su función¹⁹⁰, y que existe un demostrado sitio de autocorte después de su leucina 160¹⁸⁹, se sugiere que la banda de 28 kDa corresponde a una forma autoprosesada de la proteína MarP_{Sol}. La proteína MarP de menor tamaño al ser tratada con la glicosidasa PNGasa mostró una reducción de peso por debajo de los 28 kDa, correspondiendo con el tamaño teórico esperado de 27.1 kDa.

Los niveles de producción de proteína recombinante obtenidos en este trabajo son alrededor de 45 mg/L, los cuales son niveles de producción inferiores con respecto a otras proteínas de *M. tuberculosis* expresadas en *P. pastoris* como el antígeno rico en alanina-prolina con 600 mg/L¹⁹⁵ o la proteína CFP-32 con 500 mg/L¹⁹³, pero mayores a los de otras enzimas recombinantes como los 4 mg/L de una pectato liasa¹⁹⁶. Además, se obtuvo una actividad de proteasa cercana a las 300 mU/mL utilizando el compuesto BApNA como sustrato, y se

demostró que los residuos de glicosilación presentes en la proteína recombinante no mostraron interferencias con su actividad enzimática. A pesar de que los probables sitios de glicosilación que se encuentran en los residuos de asparagina 242 y 301 y que pueden ser reconocidos por *P. pastoris*^{197,198} se mantienen alejados del sitio activo, estos residuos de carbohidratos pueden repercutir en otros aspectos como interacción con el sustrato, estabilidad de la proteasa o modificaciones en el plegamiento¹⁹⁹. Previamente se reportó como la actividad de MarP alcanza niveles máximos a pH 9.0 utilizando un tetrapéptido fluorescente WKLL-AMC y cuando esta expresión se llevó a cabo en *E. coli*^{188,189}, sin embargo, con el sistema de expresión basado en levaduras se observó que los niveles de actividad de proteasa no presentaron diferencias entre el pH 4.0 – 8.0, considerando inclusive la capacidad de autoprosesamiento favorecido a pH ácido observado en el *western blot*.

El efecto de las proteasas en la modulación de un fenotipo adquirido por los macrófagos fue el punto de partida de este trabajo, y considerando el valor biológico que esto puede representar para *M. tuberculosis*. El efecto que las proteasas presentan sobre los monocitos ha sido previamente descrito al observar como en una población de CMSP estos adquieren un fenotipo del tipo anti-inflamatorio con la expresión de CD206, CD163 y la producción de IL-4 e IL-13¹⁸⁶, sin embargo en un trabajo posterior con monocitos purificados se ratificó el efecto de las proteasas trombina y tripsina para dar lugar a un macrófago de fenotipo tipo M2a través del receptor PAR1 y PAR2, respectivamente¹⁸⁷. En el caso de este trabajo los monocitos purificados mostraron un fenotipo inverso al mantener niveles discretos de IL-12p40, con niveles inferiores de IL-4. Sin embargo, considerando los resultados tan variables obtenidos entre individuos, se realizó la determinación de citocinas en la línea celular THP-1 encontrando niveles de TNF- α dependientes de la actividad de proteasa de MarP_{sol} y de la activación de los

receptores PAR1 y PAR2, acompañado adicionalmente con una secreción de IL-10 que fue variable entre experimentos. Estos resultados fueron similares a los reportados por Zhao *et. al.* en los que encontró la secreción de las citocinas pro-inflamatorias IL-1 β , IL-6 y TNF- α en las células monocíticas U937 al ser estimuladas por la proteasa de *M. tuberculosis* Rv3668c²⁰⁰.

A la fecha no existen reportes que sugieran la polarización tal cual de un fenotipo pro-inflamatorio en macrófagos estimulados por acción proteolítica, sin embargo hay una sólida evidencia que señala a la activación de los PARs como promotores de una respuesta inflamatoria sugiriendo inclusive que conforman una grupo “no clásico” de receptores PRRs que participan en la respuesta inmune innata^{164,201,202}. Inclusive se han encontrado resultados en los que la activación de los PARs está vinculada con la co-participación de los TLRs de la inmunidad innata²⁰³. Tanto las proteasas serralisina de *Serratia marcescens* como LepA de *Pseudomonas aeruginosa* mostraron la inducción de una respuesta pro-inflamatoria, en células EBC-I y COS-7 respectivamente, después de la activación de los receptores PARs y de una manera dependiente del factor de transcripción NF- κ B^{172,174}. En el caso de las gingipaínas de *Porphyromonas gingivalis*, estas proteasas de cisteína si mostraron una actividad sobre los receptores PAR1 y PAR2, análogamente a lo observado por MarP_{Sol}, promoviendo la secreción del TNF- α y otros mediadores inflamatorios que incluyen la IL-1 α , IL-1 β y la IL-6²⁰⁴.

En este trabajo se demostró que la inhibición de NF- κ B mostró el mayor decremento en la producción de TNF- α después de la estimulación con MarP_{Sol}. La expresión de genes asociados a un perfil inflamatorio dependientes de la activación de los receptores PARs está fuertemente asociado a la expresión del factor de transcripción NF- κ B^{165,205}, y este a su vez este es un elemento esencial para la transcripción y producción de TNF- α ²⁰⁶. Por otro lado, el bloqueo de las vías de señalamiento MAPK y PKC también mostraron reducciones en los niveles

cuantificados de TNF- α . En este sentido las vías de MAPK y PKC son activadas rio arriba de la activación de NF- κ B y pueden participar en puntos alternativos promoviendo la transcripción del gen codificante para el TNF- α ²⁰⁷. La cascada de MAPK a través de las cinasas AP1, JNK y p38 pueden promover la transcripción del gen *tnf- α* ²⁰⁸, mientras que la PKC ζ promueve la activación del complejo IKK y la posterior degradación del inhibidor I- κ B²⁰⁹.

Con base en los resultados mostrados con la liberación de TNF- α en las células THP-1 por acción de la proteasa MarP de *M. tuberculosis*, se observa un efecto distinto al de la polarización al fenotipo tipo M2 cuando los macrófagos son estimulados con trombina o tripsina, sin embargo este resultado contradictorio puede ser explicado por los diferentes mecanismos que las proteasas pueden desarrollar con los receptores PARs al encontrar sitios de reconocimiento distintos con efectos diferenciales en su activación²¹⁰.

El mecanismo por el cual MarP pueda interactuar con el hospedero y específicamente con los receptores PARs es posible que se lleve a cabo con la secreción de una variante soluble de la proteasa, considerando la posibilidad de su autoprosesamiento después de la leucina 160¹⁸⁹. Previamente se ha demostrado como otras proteasas cuya topología corresponde a proteínas de membrana como las HtrA de *Helicobacter pylori* o *Campylobacter jejuni*, son secretadas al espacio extracelular favoreciendo la patogénesis de la infección, en mecanismos que involucran la secreción vía Sec, sistemas de secreción o vesículas de membrana externa²¹¹. Aunque *M. tuberculosis* cuenta con mecanismos de exportación de proteínas análogos a los de las bacterias Gram negativas²¹², destacando los sistemas de secreción ESX²¹³, esto es un aspecto que aún quedará por definir en MarP.

Finalmente, los efectos atribuidos a la proteasa MarP actualmente se han limitado a la fisiología de *M. tuberculosis* participando en la resistencia a condiciones de estrés, con una clara

relevancia asociada a la virulencia de la bacteria^{190,214}, sin embargo, los resultados mostrados en este trabajo muestran una posible participación adicional en la que esta proteasa actúe de manera extracelular, aportando nuevos mecanismos aún no descritos a la patogénesis de *M. tuberculosis*.

CAPITULO X

CONCLUSIÓN

El sistema de producción de proteínas heterólogas basado en la levadura *Pichia pastoris* fue capaz de producir la proteasa de *Mycobacterium tuberculosis* MarP, en una forma soluble carente de sus cuatro dominios transmembranales, manteniendo además una actividad enzimática demostrada.

Posteriormente, la proteasa MarP_{sol} demostró una actividad biológica al inducir la producción de TNF- α en monocitos de la línea celular THP-1, de una manera dependiente de su actividad de proteasa y con la activación de los receptores PAR1 y PAR2, involucrando la activación de las vías de señalamiento NF- κ B, MAPK y PKC.

Con base en lo anterior, se sugiere que la proteasa MarP puede desempeñar otras funciones en la fisiopatología de *M. tuberculosis*, al interactuar extracelularmente con el hospedero. Por otro lado, la activación de los receptores PAR1/2 por MarP aporta una nueva evidencia en la que estos receptores “no clásicos” del sistema inmune participan en la inmunomodulación del hospedero.

A pesar de que los resultados no mostraron la capacidad en MarP de inducir la polarización de macrófagos M1/M2, la evidencia si aporta un nuevo papel no descrito en la patogenicidad de *M. tuberculosis* y este factor de virulencia.

CAPITULO XI

PERSPECTIVAS

1. La participación de MarP en la fisiopatología de la tuberculosis es indiscutiblemente relevante, sin embargo, con base en los resultados mostrados en este trabajo en los que aparentemente puede presentar implicaciones como un factor de virulencia secretado, estudiar los posibles mecanismos en los que participa aportarían información adicional a la virulencia de esta proteasa.
2. Existe evidencia de la antigenicidad que muchos efectores de la virulencia de *M. tuberculosis* presentan, por lo que el estudio de esta propiedad en MarP podría significar un conocimiento con posibles aplicaciones al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis.
3. Por último, las proteasas y la activación de los receptores PAR aún sigue siendo poco explorado en el campo de *M. tuberculosis*, por lo que el estudio de otras proteasas de este microorganismo, descritas o putativas, aportaría nueva información a la virulencia de este patógeno y la fisiopatología de la tuberculosis.

REFERENCIAS

1. Moule, M. G. & Cirillo, J. D. *Mycobacterium tuberculosis* dissemination plays a critical role in pathogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 65 (2020).
2. Wirth, T. *et al.* Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PLoS Pathog* **4**, (2008).
3. Tortoli, E. The new mycobacteria: an update. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* **48**, 159–178 (2006).
4. Hershkovitz, I. *et al.* Detection and molecular characterization of 9000-year-old *Mycobacterium tuberculosis* from a neolithic settlement in the eastern mediterranean. *PLoS ONE* **3**, e3426 (2008).
5. Filliol, I. *et al.* Global distribution of *Mycobacterium tuberculosis* spoligotypes. *Emerg. Infect. Dis.* **8**, 1347–1349 (2002).
6. Chihota, V. N. *et al.* Geospatial distribution of *Mycobacterium tuberculosis* genotypes in Africa. *PLoS ONE* **13**, e0200632 (2018).
7. Cabezas Vinueza, L. & Jiménez Arias, P. Distribution of *Mycobacterium tuberculosis* lineages in South America. *AD* **4**, 34–58 (2021).
8. Bottai, D. *et al.* TbD1 deletion as a driver of the evolutionary success of modern epidemic *Mycobacterium tuberculosis* lineages. *Nat Commun* **11**, 684 (2020).
9. Brosch, R. *et al.* A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**, 3684–3689 (2002).
10. Napier, G. *et al.* Robust barcoding and identification of *Mycobacterium tuberculosis* lineages for epidemiological and clinical studies. *Genome Med* **12**, 114 (2020).
11. Ford, C. B. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* mutation rate estimates from different lineages predict substantial differences in the emergence of drug-resistant tuberculosis. *Nat Genet* **45**, 784–790 (2013).
12. World Health Organization. *Global tuberculosis report 2020*. (World Health Organization, 2020).
13. Koneman, E. W. & Allen, S. *Koneman. Diagnostico Microbiologico/ Microbiological diagnosis: Texto Y Atlas En Color/ Text and Color Atlas*. (Ed. Médica Panamericana, 2008).
14. Murray, P. R., Rosenthal, K. S. & Pfaller, M. A. *Medical microbiology*. (Elsevier, 2016).
15. Cook, G. M. *et al.* Physiology of Mycobacteria. *Adv Microb Physiol* **55**, 81–319 (2009).
16. Zuber, B. *et al.* Direct visualization of the outer membrane of *mycobacteria* and *corynebacteria* in their native state. *J Bacteriol* **190**, 5672–5680 (2008).
17. Hoffmann, C., Leis, A., Niederweis, M., Plitzko, J. M. & Engelhardt, H. Disclosure of the mycobacterial outer membrane: Cryo-electron tomography and vitreous sections reveal the lipid bilayer structure. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 3963–3967 (2008).
18. Delogu, G., Sali, M. & Fadda, G. The biology of *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis* **5**, (2013).
19. Nieto, L. M., Mehaffy, C. & Dobos, K. M. The physiology of *Mycobacterium tuberculosis* in the context of drug resistance: a system biology perspective. in *Mycobacterium - Research and Development* (ed. Ribón, W.) (InTech, 2018). doi:10.5772/intechopen.69594.

20. Forrellad, M. A. *et al.* Virulence factors of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Virulence* **4**, 3–66 (2013).
21. Nambi, S. *et al.* The oxidative stress network of *Mycobacterium tuberculosis* reveals coordination between radical detoxification systems. *Cell Host & Microbe* **17**, 829–837 (2015).
22. Shastri, M. D. *et al.* Role of oxidative stress in the pathology and management of human tuberculosis. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity* **2018**, 1–10 (2018).
23. Roberts, D. M., Personne, Y., Ollinger, J. & Parish, T. Proteases in *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis: potential as drug targets. *Future Microbiology* **8**, 621–631 (2013).
24. Andrade, R. G. de, Junqueira-Kipnis, A. P. & Kipnis, A. Proteases associated with *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology* **48**, 1–12 (2019).
25. Fennelly, K. P. *et al.* Variability of infectious aerosols produced during coughing by patients with pulmonary tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* **186**, 450–457 (2012).
26. Schlesinger, L. S. Entry of *Mycobacterium tuberculosis* into mononuclear phagocytes. in *Tuberculosis* (ed. Shinnick, T. M.) vol. 215 71–96 (Springer Berlin Heidelberg, 1996).
27. Lowe, D. M., Redford, P. S., Wilkinson, R. J., O’Garra, A. & Martineau, A. R. Neutrophils in tuberculosis: friend or foe? *Trends in Immunology* **33**, 14–25 (2012).
28. Sturgill-Koszycki, S. *et al.* Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263**, 678–681 (1994).
29. O’Garra, A. *et al.* The immune response in tuberculosis. *Annual Review of Immunology* **31**, 475–527 (2013).
30. Zhang, X., Majlessi, L., Deriaud, E., Leclerc, C. & Lo-Man, R. Coactivation of Syk kinase and MyD88 adaptor protein pathways by bacteria promotes regulatory properties of neutrophils. *Immunity* **31**, 761–771 (2009).
31. Tian, T., Woodworth, J., Sköld, M. & Behar, S. M. *In vivo* depletion of CD11c⁺ cells delays the CD4⁺ T cell response to *Mycobacterium tuberculosis* and exacerbates the outcome of infection. *J Immunol* **175**, 3268–3272 (2005).
32. Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L. A. B., Netea, M. G. & Van Crevel, R. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clinical and Developmental Immunology* **2011**, 1–12 (2011).
33. Berrington, W. R. & Hawn, T. R. *Mycobacterium tuberculosis*, macrophages, and the innate immune response: does common variation matter? *Immunol Rev* **219**, 167–186 (2007).
34. Frieden, T. R., Sterling, T. R., Munsiff, S. S., Watt, C. J. & Dye, C. Tuberculosis. *The Lancet* **362**, 887–899 (2003).
35. Sasindran, S. J. & Torrelles, J. B. *Mycobacterium Tuberculosis* infection and inflammation: what is beneficial for the host and for the bacterium? *Front Microbiol* **2**, (2011).
36. Cooper, A. M. Cell mediated immune responses in Tuberculosis. *Annu Rev Immunol* **27**, 393–422 (2009).
37. Eruslanov, E. B. *et al.* Neutrophil responses to *Mycobacterium tuberculosis* infection in genetically susceptible and resistant mice. *Infect Immun* **73**, 1744–1753 (2005).
38. Wolf, A. J. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* infects dendritic cells with high frequency and impairs their function *in vivo*. *J Immunol* **179**, 2509–2519 (2007).

39. Ulrichs, T. & Kaufmann, S. H. New insights into the function of granulomas in human tuberculosis. *J. Pathol.* **208**, 261–269 (2006).
40. Cooper, A. M., Magram, J., Ferrante, J. & Orme, I. M. Interleukin 12 (IL-12) is crucial to the development of protective immunity in mice intravenously infected with *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Experimental Medicine* **186**, 39–45 (1997).
41. Khader, S. A. *et al.* Interleukin 12p40 is required for dendritic cell migration and T cell priming after *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1805–1815 (2006).
42. Flynn, J. L. & Chan, J. Immunology of tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**, 93–129 (2001).
43. MacMicking, J. D. *et al.* Identification of nitric oxide synthase as a protective locus against tuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5243–5248 (1997).
44. Scanga, C. A. *et al.* the inducible nitric oxide synthase locus confers protection against aerogenic challenge of both clinical and laboratory strains of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect Immun* **69**, 7711–7717 (2001).
45. Russell, D. G. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* wears what it eats. *Cell Host Microbe* **8**, 68–76 (2010).
46. Fabri, M. *et al.* Vitamin D is required for IFN- γ -mediated antimicrobial activity of human macrophages. *Sci Transl Med* **3**, 104ra102 (2011).
47. Saraiva, M. & O’Garra, A. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nat Rev Immunol* **10**, 170–181 (2010).
48. Turner, J. *et al.* *In vivo* IL-10 production reactivates chronic pulmonary tuberculosis in C57BL/6 Mice. *J Immunol* **169**, 6343–6351 (2002).
49. Moore, K. W., Malefyt, R. de W., Coffman, R. L. & O’Garra, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* **19**, 683–765 (2001).
50. Rook, G. A. W., Hernandez-Pando, R., Dheda, K. & Teng Seah, G. IL-4 in tuberculosis: implications for vaccine design. *Trends in Immunology* **25**, 483–488 (2004).
51. Lee, C. G. *et al.* Interleukin-13 induces tissue fibrosis by selectively stimulating and activating transforming growth factor β 1. *Journal of Experimental Medicine* **194**, 809–822 (2001).
52. Hernandez-Pando, R., Aguilar, D., Hernandez, M. L. G., Orozco, H. & Rook, G. Pulmonary tuberculosis in BALB/c mice with non-functional IL-4 genes: changes in the inflammatory effects of TNF- α and in the regulation of fibrosis. *Eur. J. Immunol.* **34**, 174–183 (2004).
53. Yong, A. J. *et al.* Total and anti-mycobacterial ige levels in serum from patients with tuberculosis and leprosy. *Tubercle* **70**, 273–279 (1989).
54. Marchant, A. *et al.* Polarization of PPD-specific T-cell response of patients with tuberculosis from Th0 to Th1 profile after successful antimycobacterial therapy or *in vitro* conditioning with interferon- α or interleukin-12. *Am J Respir Cell Mol Biol* **24**, 187–194 (2001).
55. Manca, C. *et al.* Differential monocyte activation underlies strain-specific *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis. *Infect Immun* **72**, 5511–5514 (2004).
56. Gordon, S. Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* **3**, 23–35 (2003).
57. Kahnert, A. *et al.* Alternative activation deprives macrophages of a coordinated defense program to *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur. J. Immunol.* **36**, 631–647 (2006).

58. Cedric Auffray, Michael H. Sieweke & Geissmann, F. Blood monocytes: Development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annual Review of Immunology* **27**, 669–692 (2009).
59. Hettinger, J. *et al.* Origin of monocytes and macrophages in a committed progenitor. *Nat Immunol* **14**, 821–830 (2013).
60. Shi, C. & Pamer, E. G. Monocyte recruitment during infection and inflammation. *Nat Rev Immunol* **11**, 762–774 (2011).
61. Italiani, P. & Boraschi, D. From monocytes to M1/M2 macrophages: Phenotypical vs. functional differentiation. *Front Immunol* **5**, (2014).
62. Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T. & Weissman, I. L. A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197 (2000).
63. Fogg, D. K. *et al.* A clonogenic bone marrow progenitor specific for macrophages and dendritic cells. *Science* **311**, 83–87 (2006).
64. McKenzie, S. B. *Hematología clínica*. (El Manual Moderno, 1991).
65. Hamilton, J. A. Colony-stimulating factors in inflammation and autoimmunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 533–544 (2008).
66. Gordon, S. & Taylor, P. R. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 953–964 (2005).
67. Yang, J., Zhang, L., Yu, C., Yang, X.-F. & Wang, H. Monocyte and macrophage differentiation: circulation inflammatory monocyte as biomarker for inflammatory diseases. *Biomark Res* **2**, 1 (2014).
68. Ghattas, A., Griffiths, H. R., Devitt, A., Lip, G. Y. H. & Shantsila, E. Monocytes in coronary artery disease and atherosclerosis. *Journal of the American College of Cardiology* **62**, 1541–1551 (2013).
69. Muraille, E., Leo, O. & Moser, M. Th1/Th2 paradigm extended: macrophage polarization as an unappreciated pathogen-driven escape mechanism? *Front Immunol* **5**, (2014).
70. Hoeffel, G. & Ginhoux, F. Ontogeny of tissue-resident macrophages. *Front Immunol* **6**, (2015).
71. McGrath, K. E., Koniski, A. D., Malik, J. & Palis, J. Circulation is established in a stepwise pattern in the mammalian embryo. *Blood* **101**, 1669–1675 (2003).
72. Lichanska, A. M. & Hume, D. A. Origins and functions of phagocytes in the embryo. *Experimental Hematology* **28**, 601–611 (2000).
73. Takahashi, K., Yamamura, F. & Naito, M. Differentiation, maturation, and proliferation of macrophages in the mouse yolk sac: a light-microscopic, enzyme-cytochemical, immunohistochemical, and ultrastructural study. *J. Leukoc. Biol.* **45**, 87–96 (1989).
74. Naito, M., Hasegawa, G. & Takahashi, K. Development, differentiation, and maturation of Kupffer cells. *Microsc. Res. Tech.* **39**, 350–364 (1997).
75. Hoeffel, G. *et al.* Adult Langerhans cells derive predominantly from embryonic fetal liver monocytes with a minor contribution of yolk sac-derived macrophages. *J Exp Med* **209**, 1167–1181 (2012).
76. Guilliams, M. *et al.* Alveolar macrophages develop from fetal monocytes that differentiate into long-lived cells in the first week of life via GM-CSF. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 1977–1992 (2013).
77. Epelman, S. *et al.* Embryonic and adult-derived resident cardiac macrophages are maintained through distinct mechanisms at steady state and during inflammation. *Immunity* **40**, 91–104 (2014).

78. Tamoutounour, S. *et al.* Origins and functional specialization of macrophages and of conventional and monocyte-derived dendritic cells in mouse skin. *Immunity* **39**, 925–938 (2013).
79. Bain, C. C. *et al.* Constant replenishment from circulating monocytes maintains the macrophage pool in adult intestine. *Nat Immunol* **15**, 929–937 (2014).
80. Molawi, K. *et al.* Progressive replacement of embryo-derived cardiac macrophages with age. *Journal of Experimental Medicine* **211**, 2151–2158 (2014).
81. Murray, P. J. *et al.* Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* **41**, 14–20 (2014).
82. Hoeffel, G. *et al.* C-Myb⁺ erythro-myeloid progenitor-derived fetal monocytes give rise to adult tissue-resident macrophages. *Immunity* **42**, 665–678 (2015).
83. Wang, N., Liang, H. & Zen, K. Molecular mechanisms that influence the macrophage M1–M2 polarization balance. *Front Immunol* **5**, (2014).
84. Ní Gabhann, J. *et al.* Btk regulates macrophage polarization in response to lipopolysaccharide. *PLoS One* **9**, (2014).
85. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages and dendritic cells. *Science* **327**, 656–661 (2010).
86. Galván-Peña, S. & O’Neill, L. A. J. Metabolic reprogramming in macrophage polarization. *Front Immunol* **5**, (2014).
87. Saha, B., Bruneau, J. C., Kodys, K. & Szabo, G. Alcohol-induced miR-27a regulates differentiation and M2 macrophage polarization of normal human monocytes. *J. Immunol.* **194**, 3079–3087 (2015).
88. Spence, S. *et al.* RETRACTED: Suppressors of cytokine signaling 2 and 3 diametrically control macrophage polarization. *Immunity* **38**, 66–78 (2013).
89. Ferrante, C. J. & Leibovich, S. J. Regulation of macrophage polarization and wound healing. *Adv Wound Care (New Rochelle)* **1**, 10–16 (2012).
90. Martinez, F. O., Sica, A., Mantovani, A. & Locati, M. Macrophage activation and polarization. *Front. Biosci.* **13**, 453–461 (2008).
91. Lawrence, T. & Natoli, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* **11**, 750–761 (2011).
92. Mantovani, A. *et al.* The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* **25**, 677–686 (2004).
93. Martinez, F. O., Gordon, S., Locati, M. & Mantovani, A. Transcriptional profiling of the human monocyte-to-macrophage differentiation and polarization: New molecules and patterns of gene expression. *J Immunol* **177**, 7303–7311 (2006).
94. Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G. & Eichmann, K. Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow-derived macrophages by Th1 and Th2 cytokines. *Eur. J. Immunol.* **25**, 1101–1104 (1995).
95. Anderson, C. F. & Mosser, D. M. Cutting edge: Biasing immune responses by directing antigen to macrophage Fc γ receptors. *J Immunol* **168**, 3697–3701 (2002).
96. Bowie, A. & O’Neill, L. A. J. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* **67**, 508–514 (2000).
97. Sutterwala, F. S., Noel, G. J., Salgame, P. & Mosser, D. M. Reversal of proinflammatory responses by ligating the macrophage Fc γ receptor type I. *Journal of Experimental Medicine* **188**, 217–222 (1998).

98. Benoit, M., Desnues, B. & Mege, J.-L. Macrophage polarization in bacterial infections. *J Immunol* **181**, 3733–3739 (2008).
99. Thiriot, J. D., Martinez-Martinez, Y. B., Endsley, J. J. & Torres, A. G. Hacking the host: exploitation of macrophage polarization by intracellular bacterial pathogens. *Pathog Dis* **78**, (2020).
100. Jenner, R. G. & Young, R. A. Insights into host responses against pathogens from transcriptional profiling. *Nat Rev Micro* **3**, 281–294 (2005).
101. Zhang, L. & Wang, C.-C. Inflammatory response of macrophages in infection. *Hepatobiliary & Pancreatic Diseases International* **13**, 138–152 (2014).
102. Bozza, F. A. *et al.* Cytokine profiles as markers of disease severity in sepsis: a multiplex analysis. *Crit Care* **11**, R49 (2007).
103. Kadioglu, A. & Andrew, P. W. The innate immune response to pneumococcal lung infection: the untold story. *Trends in Immunology* **25**, 143–149 (2004).
104. Kerrinnes, T. *et al.* Utilization of host polyamines in alternatively activated macrophages promotes chronic infection by *Brucella abortus*. *Infect Immun* **86**, (2018).
105. Galli, G. & Saleh, M. Immunometabolism of macrophages in bacterial infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **10**, 607650 (2021).
106. Armstrong, J. A. & Hart, P. D. Response of cultured macrophages to *Mycobacterium tuberculosis*, with observations on fusion of lysosomes with phagosomes. *Journal of Experimental Medicine* **134**, 713–740 (1971).
107. Rajaram, M. V. S. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* activates human macrophage peroxisome proliferator-activated receptor γ linking mannose receptor recognition to regulation of immune responses. *J.I.* **185**, 929–942 (2010).
108. Parveen, N. *et al.* Endocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* heat shock protein 60 is required to induce interleukin-10 production in macrophages*. *Journal of Biological Chemistry* **288**, 24956–24971 (2013).
109. Lim, Y.-J. *et al.* Roles of endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in M1-polarized macrophages during mycobacterial infections. *Scientific Reports* **6**, 37211 (2016).
110. Huang, Z. *et al.* IL-37 Expression is upregulated in patients with tuberculosis and induces macrophages towards an M2-like phenotype. *Scand J Immunol* **82**, 370–379 (2015).
111. Dulon, S. *et al.* Proteinase-activated receptor-2 and human lung epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **28**, 339–346 (2003).
112. Steinhoff, M. *et al.* Proteinase-activated receptors: transducers of proteinase-mediated signaling in inflammation and immune response. *Endocr. Rev.* **26**, 1–43 (2005).
113. Sébert, M., Sola-Tapias, N., Mas, E., Barreau, F. & Ferrand, A. Protease-activated receptors in the intestine: Focus on inflammation and cancer. *Front. Endocrinol.* **10**, 717 (2019).
114. Dulon, S. *et al.* *Pseudomonas aeruginosa* elastase disables proteinase-activated receptor 2 in respiratory epithelial cells. *Am J Respir Cell Mol Biol* **32**, 411–419 (2005).
115. Hyun, E., Andrade-Gordon, P., Steinhoff, M. & Vergnolle, N. Protease-activated receptor-2 activation: a major actor in intestinal inflammation. *Gut* **57**, 1222–1229 (2008).
116. Vergnolle, N. *et al.* Proteinase-activated receptor-2 and hyperalgesia: A novel pain pathway. *Nat Med* **7**, 821–826 (2001).
117. Vu, T.-K. H., Hung, D. T., Wheaton, V. I. & Coughlin, S. R. Molecular cloning of a functional thrombin receptor reveals a novel proteolytic mechanism of receptor activation. *Cell* **64**, 1057–1068 (1991).

118. Nystedt, S., Emilsson, K., Larsson, A.-K., Strömbeck, B. & Sundelin, J. Molecular cloning and functional expression of the gene encoding the human proteinase-activated receptor 2. *European Journal of Biochemistry* **232**, 84–89 (1995).
119. Ishihara, H. *et al.* Protease-activated receptor 3 is a second thrombin receptor in humans. *Nature* **386**, 502–506 (1997).
120. Kahn, M. L. *et al.* A dual thrombin receptor system for platelet activation. *Nature* **394**, 690–694 (1998).
121. Xu, W. *et al.* Cloning and characterization of human protease-activated receptor 4. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**, 6642–6646 (1998).
122. Russo, A., Soh, U. J. K., Paing, M. M., Arora, P. & Trejo, J. Caveolae are required for protease-selective signaling by protease-activated receptor-1. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**, 6393–6397 (2009).
123. Ramachandran, R. *et al.* Neutrophil elastase acts as a biased agonist for proteinase-activated receptor-2 (PAR2). *Journal of Biological Chemistry* **286**, 24638–24648 (2011).
124. Boire, A. *et al.* PAR1 is a matrix metalloprotease-1 receptor that promotes invasion and tumorigenesis of breast cancer cells. *Cell* **120**, 303–313 (2005).
125. Scarborough, R. M. *et al.* Tethered ligand agonist peptides. Structural requirements for thrombin receptor activation reveal mechanism of proteolytic unmasking of agonist function. *J. Biol. Chem.* **267**, 13146–13149 (1992).
126. Leger, A. J. *et al.* Blocking the protease-activated receptor 1-4 heterodimer in platelet-mediated thrombosis. *Circulation* **113**, 1244–1254 (2006).
127. Nakanishi-Matsui, M. *et al.* PAR3 is a cofactor for PAR4 activation by thrombin. *Nature* **404**, 609–613 (2000).
128. Blackhart, B. D. *et al.* Ligand cross-reactivity within the protease-activated receptor family. *Journal of Biological Chemistry* **271**, 16466–16471 (1996).
129. Kawabata, A., Kuroda, R., Nishikawa, H. & Kawai, K. Modulation by protease-activated receptors of the rat duodenal motility *in vitro* : possible mechanisms underlying the evoked contraction and relaxation: Protease-activated receptor and rat duodenal motility. *British Journal of Pharmacology* **128**, 865–872 (1999).
130. Hansen, K. K. *et al.* Proteinases as hormones: targets and mechanisms for proteolytic signaling. *Biological Chemistry* **389**, (2008).
131. Ramachandran, R. & Hollenberg, M. D. Proteinases and signalling: pathophysiological and therapeutic implications via PARs and more. *Br J Pharmacol* **153**, S263–S282 (2008).
132. Ossovskaya, V. S. & Bunnett, N. W. Protease-activated receptors: contribution to physiology and disease. *Physiol. Rev.* **84**, 579–621 (2004).
133. Shpacovitch, V., Feld, M., Bunnett, N. W. & Steinhoff, M. Protease-activated receptors: novel PARTners in innate immunity. *Trends in Immunology* **28**, 541–550 (2007).
134. Shpacovitch, V., Feld, M., Hollenberg, M. D., Luger, T. A. & Steinhoff, M. Role of protease-activated receptors in inflammatory responses, innate and adaptive immunity. *J Leukoc Biol* **83**, 1309–1322 (2008).
135. Miike, S., McWilliam, A. S. & Kita, H. Trypsin induces activation and inflammatory mediator release from human eosinophils through protease-activated receptor-2. *J Immunol* **167**, 6615–6622 (2001).
136. Bolton, S. J., McNulty, C. A., Thomas, R. J., Hewitt, C. R. A. & Wardlaw, A. J. Expression of and functional responses to protease-activated receptors on human eosinophils. *Journal of Leukocyte Biology* **74**, 60–68 (2003).

137. Lourbakos, A. *et al.* Cleavage and activation of proteinase-activated receptor-2 on human neutrophils by gingipain-R from *Porphyromonas gingivalis*. *FEBS Letters* **435**, 45–48 (1998).
138. Shpacovitch, V. M. *et al.* Agonists of proteinase-activated receptor-2 modulate human neutrophil cytokine secretion, expression of cell adhesion molecules, and migration within 3-D collagen lattices. *J. Leukoc. Biol.* **76**, 388–398 (2004).
139. Corvera, C. U. *et al.* Mast cell tryptase regulates rat colonic myocytes through proteinase-activated receptor 2. *J. Clin. Invest.* **100**, 1383–1393 (1997).
140. Steinhoff, M. *et al.* Proteinase-activated receptor-2 in human skin: tissue distribution and activation of keratinocytes by mast cell tryptase. *Experimental Dermatology* **8**, 282–294 (2007).
141. Steinhoff, M. *et al.* Agonists of proteinase-activated receptor 2 induce inflammation by a neurogenic mechanism. *Nat Med* **6**, 151–158 (2000).
142. Temkin, V., Kantor, B., Weg, V., Hartman, M.-L. & Levi-Schaffer, F. Tryptase activates the mitogen-activated protein kinase/activator protein-1 pathway in human peripheral blood eosinophils, causing cytokine production and release. *J Immunol* **169**, 2662–2669 (2002).
143. Falcone, F. H., Morroll, S. & Gibbs, B. F. Lack of protease activated receptor (PAR) expression in purified human basophils. *Inflamm. res.* **54**, S13–S14 (2005).
144. He, S.-H., He, Y.-S. & Xie, H. Activation of human colon mast cells through proteinase activated receptor-2. *WJG* **10**, 327 (2004).
145. He, S., Xie, H. & Fu, Y. Activation of human tonsil and skin mast cells by agonists of proteinase activated receptor-2. *Acta Pharmacol Sin* **26**, 568–574 (2005).
146. Moormann, C. *et al.* Functional characterization and expression analysis of the proteinase-activated receptor-2 in human cutaneous mast cells. *Journal of Investigative Dermatology* **126**, 746–755 (2006).
147. Baek, O.-S. *et al.* Curcumin inhibits protease-activated receptor-2 and -4-mediated mast cell activation. *Clinica Chimica Acta* **338**, 135–141 (2003).
148. Mari, B. *et al.* Thrombin and trypsin-induced Ca²⁺ mobilization in human T cell lines through interaction with different protease-activated receptors. *FASEB j.* **10**, 309–316 (1996).
149. Bar-Shavit, R. *et al.* Signalling pathways induced by protease-activated receptors and integrins in T cells. *Immunology* **105**, 35–46 (2002).
150. Hansen, K. K., Saifeddine, M. & Hollenberg, M. D. Tethered ligand-derived peptides of proteinase-activated receptor 3 (PAR3) activate PAR1 and PAR2 in Jurkat T cells. *Immunology* **112**, 183–190 (2004).
151. Li, T. & He, S. Induction of IL-6 release from human T cells by PAR-1 and PAR-2 agonists. *Immunol Cell Biol* **84**, 461–466 (2006).
152. Lim, S. Y., Tennant, G. M., Kennedy, S., Wainwright, C. L. & Kane, K. A. Activation of mouse protease-activated receptor-2 induces lymphocyte adhesion and generation of reactive oxygen species: PAR-2 and lymphocyte function. *British Journal of Pharmacology* **149**, 591–599 (2006).
153. Colognato, R. *et al.* Differential expression and regulation of protease-activated receptors in human peripheral monocytes and monocyte-derived antigen-presenting cells. *Blood* **102**, 2645–2652 (2003).

154. Naldini Antonella, Bernini Claudia, Pucci Annalisa, & Carraro Fabio. Thrombin-mediated IL-10 up-regulation involves protease-activated receptor (PAR)-1 expression in human mononuclear leukocytes. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 736–744 (2005).
155. Li, T., Wang, H. & He, S. Induction of interleukin-6 release from monocytes by serine proteinases and its potential mechanisms. *Scandinavian Journal of Immunology* **64**, 10–16 (2006).
156. Naldini, A., Carney, D. H., Pucci, A. & Carraro, F. Human alpha-thrombin stimulates proliferation of interferon-gamma differentiated, growth-arrested U937 cells, overcoming differentiation-related changes in expression of p21CIP1/WAF1 and cyclin D1. *J. Cell. Physiol.* **191**, 290–297 (2002).
157. Naldini, A., Pucci, A., Carney, D. H., Fanetti, G. & Carraro, F. Thrombin enhancement of interleukin-1 expression in mononuclear cells: involvement of proteinase-activated receptor-1. *Cytokine* **20**, 191–199 (2002).
158. Schaffner, A. Regulated expression of platelet factor 4 in human monocytes-role of PARs as a quantitatively important monocyte activation pathway. *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 202–209 (2005).
159. Johansson Ulrika *et al.* Human peripheral blood monocytes express protease receptor-2 and respond to receptor activation by production of IL-6, IL-8, and IL-1 β . *Journal of Leukocyte Biology* **78**, 967–975 (2005).
160. Roche, N. *et al.* Effect of acute and chronic inflammatory stimuli on expression of protease-activated receptors 1 and 2 in alveolar macrophages. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **111**, 367–373 (2003).
161. Napoli, C. Evidence that protease activated receptor 2 expression is enhanced in human coronary atherosclerotic lesions. *Journal of Clinical Pathology* **57**, 513–516 (2004).
162. Rullier, A. *et al.* Expression of protease-activated receptors and tissue factor in human liver. *Virchows Arch* **448**, 46–51 (2006).
163. Yanagita, M., Kobayashi, R., Kashiwagi, Y., Shimabukuro, Y. & Murakami, S. Thrombin regulates the function of human blood dendritic cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **364**, 318–324 (2007).
164. Heuberger, D. M. & Schuepbach, R. A. Protease-activated receptors (PARs): mechanisms of action and potential therapeutic modulators in PAR-driven inflammatory diseases. *Thromb J* **17**, (2019).
165. Nhu, Q. *et al.* Novel signaling interactions between proteinase-activated receptor 2 and Toll-like receptors *in vitro* and *in vivo*. *Mucosal Immunol* **3**, 29–39 (2010).
166. Díaz Zúñiga, J. *et al.* Virulencia y variabilidad de *Porphyromonas gingivalis* y *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* y su asociación a la periodontitis. *Rev. Clin. Periodoncia Implantol. Rehabil. Oral* **5**, 40–45 (2012).
167. Loubakos, A. *et al.* Activation of protease-activated receptors by gingipains from *Porphyromonas gingivalis* leads to platelet aggregation: a new trait in microbial pathogenicity. *Blood* **97**, 3790–3797 (2001).
168. Loubakos, A. *et al.* Arginine-specific protease from *Porphyromonas gingivalis* activates protease-activated receptors on human oral epithelial cells and induces interleukin-6 secretion. *Infect Immun* **69**, 5121–5130 (2001).
169. Chung, W. O., Hansen, S. R., Rao, D. & Dale, B. A. Protease-activated receptor signaling increases epithelial antimicrobial peptide expression. *J Immunol* **173**, 5165–5170 (2004).

170. Bryzek, D. *et al.* Triggering NETosis via protease-activated receptor (PAR)-2 signaling as a mechanism of hijacking neutrophils function for pathogen benefits. *PLoS Pathog* **15**, e1007773 (2019).
171. Nonaka, S. & Nakanishi, H. Secreted gingipains from *Porphyromonas gingivalis* induce microglia migration through endosomal signaling by protease-activated receptor 2. *Neurochemistry International* **140**, 104840 (2020).
172. Kida, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. *Serratia marcescens* serralyisin induces inflammatory responses through protease-activated receptor 2. *Infect Immun* **75**, 164–174 (2007).
173. Kajikawa, H. *et al.* *Helicobacter pylori* activates gastric epithelial cells to produce interleukin-8 via protease-activated receptor 2. *DIG* **76**, 248–255 (2007).
174. Kida, Y., Higashimoto, Y., Inoue, H., Shimizu, T. & Kuwano, K. A novel secreted protease from *Pseudomonas aeruginosa* activates NF- κ B through protease-activated receptors. *Cellular Microbiology* **10**, 1491–1504 (2008).
175. Ohol, Y. M. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* MycP1 protease plays a dual role in regulation of ESX-1 secretion and virulence. *Cell Host Microbe* **7**, 210–220 (2010).
176. Brown, G. D. *et al.* The mycosins of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: a family of subtilisin-like serine proteases. *Gene* **254**, 147–155 (2000).
177. Frees, D., Savijoki, K., Varmanen, P. & Ingmer, H. Clp ATPases and ClpP proteolytic complexes regulate vital biological processes in low GC, Gram-positive bacteria. *Molecular Microbiology* **63**, 1285–1295 (2007).
178. Ollinger, J., O'Malley, T., Kesicki, E. A., Odingo, J. & Parish, T. Validation of the essential ClpP protease in *Mycobacterium tuberculosis* as a novel drug target. *J Bacteriol* **194**, 663–668 (2012).
179. Benaroudj, N., Raynal, B., Miot, M. & Ortiz-Lombardia, M. Assembly and proteolytic processing of mycobacterial ClpP1 and ClpP2. *BMC Biochem* **12**, 61 (2011).
180. Barik, S., Sureka, K., Mukherjee, P., Basu, J. & Kundu, M. RseA, the SigE specific anti-sigma factor of *Mycobacterium tuberculosis*, is inactivated by phosphorylation-dependent ClpC1P2 proteolysis: Proteolysis of mycobacterial anti-SigE. *Molecular Microbiology* **75**, 592–606 (2010).
181. MohamedMohaideen, N. N. *et al.* Structure and function of the virulence-associated high-temperature requirement a of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochemistry* **47**, 6092–6102 (2008).
182. Singh, N., Kuppili, R. R. & Bose, K. The structural basis of mode of activation and functional diversity: A case study with HtrA family of serine proteases. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **516**, 85–96 (2011).
183. Stapels, D. A. C. *et al.* *Salmonella* persists undermine host immune defenses during antibiotic treatment. *Science* **362**, 1156–1160 (2018).
184. Stempin, C., Giordanengo, L., Gea, S. & Cerbán, F. Alternative activation and increase of *Trypanosoma cruzi* survival in murine macrophages stimulated by cruzipain, a parasite antigen. *J. Leukoc. Biol.* **72**, 727–734 (2002).
185. Lee, S. H. *et al.* M2-like, dermal macrophages are maintained via IL-4/CCL24-mediated cooperative interaction with eosinophils in cutaneous leishmaniasis. *Sci. Immunol.* **5**, eaaz4415 (2020).
186. White, M. J. V. & Gomer, R. H. Trypsin, tryptase, and thrombin polarize macrophages towards a pro-fibrotic M2a phenotype. *PLoS One* **10**, (2015).

187. García-González, G. *et al.* Triggering of protease-activated receptors (PARs) induces alternative M2 macrophage polarization with impaired plasticity. *Molecular Immunology* **114**, 278–288 (2019).
188. Small, J. L. *et al.* Substrate specificity of MarP, a periplasmic protease required for resistance to acid and oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem* **288**, 12489–12499 (2013).
189. Biswas, T. *et al.* Structural insight into serine protease Rv3671c that protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress. *Structure* **18**, 1353–1363 (2010).
190. Vandal, O. H., Pierini, L. M., Schnappinger, D., Nathan, C. F. & Ehrt, S. A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Med* **14**, 849–854 (2008).
191. Wiechelmann, K. J., Braun, R. D. & Fitzpatrick, J. D. Investigation of the bicinchoninic acid protein assay: Identification of the groups responsible for color formation. *Analytical Biochemistry* **175**, 231–237 (1988).
192. Bando-Campos, G. *et al.* Recombinant O-mannosylated protein production (PstS-1) from *Mycobacterium tuberculosis* in *Pichia pastoris* (*Komagataella phaffii*) as a tool to study tuberculosis infection. *Microbial Cell Factories* **18**, 11 (2019).
193. Benabdeselem, C. *et al.* High level expression of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate protein CFP32 in *Pichia pastoris*. *Mol Biotechnol* **35**, 41–49 (2007).
194. Antunes, A. A. *et al.* Thermodynamic analysis of Kex2 activity: The acylation and deacylation steps are potassium- and substrate-dependent. *Biophysical Chemistry* **235**, 29–39 (2018).
195. Wang, S., Wang, Y., Wang, P. G., Chen, M. & Kong, Y. High level expression and glycosylation of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Ala-Pro-rich antigen in *Pichia pastoris*. *Protein Expression and Purification* **150**, 67–71 (2018).
196. Guo, W., González-Candelas, L. & Kolattukudy, P. E. Cloning of a new pectate lyase gene pelC from *Fusarium solani* f. sp. pisi (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **323**, 352–360 (1995).
197. Karbalaei, M., Rezaee, S. A. & Farsiani, H. *Pichia pastoris*: A highly successful expression system for optimal synthesis of heterologous proteins. *J Cell Physiol* **235**, 5867–5881 (2020).
198. Shu, M. *et al.* High-level expression and characterization of a novel serine protease in *Pichia pastoris* by multi-copy integration. *Enzyme and Microbial Technology* **92**, 56–66 (2016).
199. Goettig, P. Effects of glycosylation on the enzymatic activity and mechanisms of proteases. *Int J Mol Sci* **17**, (2016).
200. Zhao, Q. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* serine protease Rv3668c can manipulate the host–pathogen interaction via Erk-NF- κ B axis-mediated cytokine differential expression. *J Interferon Cytokine Res* **34**, 686–698 (2014).
201. Gieseler, F., Ungefroren, H., Settmacher, U., Hollenberg, M. D. & Kaufmann, R. Proteinase-activated receptors (PARs) – focus on receptor-receptor-interactions and their physiological and pathophysiological impact. *Cell Commun Signal* **11**, 86 (2013).

202. Soh, U. J., Dores, M. R., Chen, B. & Trejo, J. Signal transduction by protease-activated receptors: PAR signalling paradigms. *British Journal of Pharmacology* **160**, 191–203 (2010).
203. Rayees, S. *et al.* Macrophage TLR4 and PAR2 Signaling: Role in regulating vascular inflammatory injury and repair. *Front. Immunol.* **11**, 2091 (2020).
204. Giacaman, R. A., Asrani, A. C., Ross, K. F. & Herzberg, M. C. Cleavage of protease-activated receptors on an immortalized oral epithelial cell line by *Porphyromonas gingivalis* gingipains. *Microbiology* **155**, 3238–3246 (2009).
205. Rovai, E. S. & Holzhausen, M. The role of proteinase-activated receptors 1 and 2 in the regulation of periodontal tissue metabolism and disease. *Journal of Immunology Research* **2017**, 1–13 (2017).
206. Parameswaran, N. & Patial, S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukar Gene Expr* **20**, 87–103 (2010).
207. Wajant, H., Pfizenmaier, K. & Scheurich, P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ* **10**, 45–65 (2003).
208. Iqbal, M., Verpoorte, R., Korthout, H. A. A. J. & Mustafa, N. R. Phytochemicals as a potential source for TNF- α inhibitors. *Phytochem Rev* **12**, 65–93 (2013).
209. Lallena, M.-J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Payá, C. V. & Moscat, J. Activation of I κ B kinase β by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol* **19**, 2180–2188 (1999).
210. Zhao, P., Metcalf, M. & Bunnett, N. W. Biased signaling of protease-activated receptors. *Front. Endocrinol.* **5**, (2014).
211. Backert, S., Bernegger, S., Skórko-Glonek, J. & Wessler, S. Extracellular HtrA serine proteases: An emerging new strategy in bacterial pathogenesis. *Cellular Microbiology* **20**, e12845 (2018).
212. Miller, B. K., Zulauf, K. E. & Braunstein, M. The Sec pathways and exportomes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Spectr* **5**, (2017).
213. Tiwari, S., Casey, R., Goulding, C. W., Hingley-Wilson, S. & Jacobs, Jr., W. R. Infect and inject: How *Mycobacterium tuberculosis* exploits its major virulence-associated type VII secretion system, ESX-1. *Microbiol Spectr* **7**, (2019).
214. Botella, H. *et al.* *Mycobacterium tuberculosis* protease MarP activates a peptidoglycan hydrolase during acid stress. *The EMBO Journal* **36**, 536–548 (2017).