



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería

Programa de Maestría en Ciencias e Ingeniería

**Desarrollo de una variante de GFP susceptible a
proteólisis, como sustrato fluorogénico, para la
caracterización bioquímica de la serina proteasa
MarP de *Mycobacterium tuberculosis***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS

PRESENTA

Pablo Alfonso Madero Ayala

Tijuana, B.C.

Junio de 2019.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

FOLIO No. 274

Tijuana, B. C., a 05 de Junio 2019

C. Pablo Alfonso Madero Ayala
Pasante de: Maestro en Ciencias
Presente

El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción TESIS

Es propuesto, por el C. Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra,

Quien será el responsable de la calidad de trabajo que usted presente, referido al
tema “Desarrollo de una variante de GFP susceptible a proteólisis, como sustrato
fluorogenico, para la caracterización bioquímica de la serina proteasa MarP de
Mycobacterium tuberculosis”

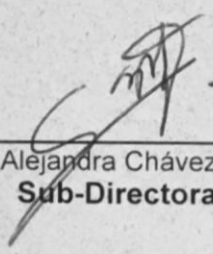
el cual deberá usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

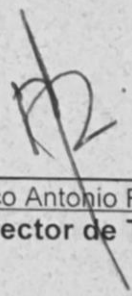
- I.- INTRODUCCION
- II.- HIPOTESIS Y OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y METODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- REFERENCIAS

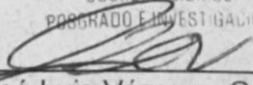
UNIVERSIDAD AUTONOMA
DE BAJA CALIFORNIA



FACULTAD DE CIENCIAS
QUÍMICAS E INGENIERIA
COORDINACION DE
PROBADO E INVESTIGACION


Dra. Rocio Alejandra Chávez Santoscoy
Sub-Directora


Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Director de Tesis


Dr. José Luis Vázquez González
Director

Madero Ayala, Pablo Alfonso

Desarrollo de una variante de GFP susceptible a proteólisis, como sustrato fluorogénico, para la caracterización bioquímica de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis*

Tesis de Maestría en Ciencias

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Madero Ayala, Pablo Alfonso. Desarrollo de una variante de GFP susceptible a proteólisis, como sustrato fluorogénico, para la caracterización bioquímica de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría en Ciencias. Programa Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Junio de 2019.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Madero Ayala, Pablo Alfonso. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2019.

Tesis: Desarrollo de una variante de GFP susceptible a proteólisis, como sustrato fluorogénico, para la caracterización bioquímica de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis*

Grado: Maestría en Ciencias, Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias e Ingeniería

Institución Universidad Autónoma de Baja California

Sustentante: Pablo Alfonso Madero Ayala

Fecha: Junio de 2019

El presente trabajo de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología y Biociencias de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la dirección del profesor **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra**, con financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714), otorgado al Dr. Ramos.

El **Manuscrito de Tesis** correspondiente fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico** conformado por los siguientes profesores:

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Presidente)

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Secretario)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Sinodal)

Patricia Lilián Alejandra Muñoz Muñoz, Dra. (Suplente)

Durante mis **Estudios de Posgrado** (Maestría), fui **Becario** del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología**, CONACyT (CVU 840444, periodo 08/2017 – 07/2019).

“Do not pray for easy lives. Pray to be stronger men. Do not pray for tasks equal to your powers. Pray for powers equal to your tasks. Then the doing of your work shall be no miracle, but you shall be the miracle.”

Phillips Brooks (1835 – 1893)

Agradecimientos

Primero, quiero empezar agradeciendo a Ale, a quien dedico este trabajo, por toda tu ayuda y apoyo incondicional no solo para realizar este proyecto, sino en nuestra vida cotidiana. También quiero agradecerte por siempre mantenerme enfocado, por todo tu amor y paciencia, por escucharme y aconsejarme, por siempre ser mi mayor motivación para seguir adelante y, por último, pero no menos importante, por haber tomado una de las decisiones más difíciles e importantes de nuestras vidas durante esta etapa.

También quiero agradecer a mis padres, Ceci y Víctor, porque gracias a ustedes soy la persona que soy el día de hoy, porque a pesar de todas las adversidades siempre vieron por mi hermana y por mí, por brindarnos la mejor educación y las mejores oportunidades a pesar de los estragos que esto pudiera ocasionarles, por siempre alentarme a seguirme superando y por siempre estar ahí para mí de forma incondicional.

Para los Doctores que conforman el laboratorio de biotecnología, que además son mis Sinodales, las Doctoras Lilian Muñoz y Rosy Mares y los Doctores Samuel Meléndez y Marco Ramos, no tengo nada más que respeto y admiración por ustedes ya que son un ejemplo de vida a seguir y siempre estaré infinitamente agradecido con ustedes por todo lo que han hecho por mí, no solo por aceptarme en el laboratorio, encaminarme y apoyarme en mi formación como investigador, sino también por tener la confianza y darme la oportunidad de formarme como docente en esta universidad. Gracias por todo el aprendizaje que me han dejado.

Quiero extender un especial agradecimiento al Doctor Ignacio Rivero por permitirnos utilizar, de forma desinteresada, equipo especializado para la realización de este proyecto.

A mis compañeros de laboratorio, por todas las risas, comidas y frustraciones que compartimos. Por el esfuerzo diario realizado para sacar adelante los proyectos de este laboratorio, muchas gracias.

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Universidad Autónoma de Baja California por su apoyo y la beca recibida para la realización de este proyecto de tesis.

Gracias a todas las personas que de forma directa o indirecta contribuyeron en la realización de este proyecto.

Dedicatorias

Para Ale

Abreviaturas

Amp	Ampicilina
BAAR	Bacilo acido-alcohol resistente
°C	Centígrados
CDC	Centros para el control y prevención de enfermedades
DO	Densidad óptica
DPBS	Dulbecco's Buffer fosfatos salino
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilendiaminetetracético
ERN	Especies reactivas de nitrógeno
ERO	Especies reactivas de oxígeno
EUA	Estados Unidos de América
FDA	Administración de alimentos y medicamentos de los Estados Unidos
GFP	Proteína verde fluorescente
h, min, seg	Hora, minutos, segundos
IPTG	Isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido
Kg, g, μ g	Kilogramos, gramos, microgramos
L, mL, μ L	Litro, mililitro, microlitro
LB	Luria Bertani
LBST	Lisado bacteriano soluble total
MarP	Proteína de resistencia a medios ácidos de <i>Mycobacterium</i>
MDR	Multirresistente
PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecilsulfato de sodio
TB	Tuberculosis
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TST	Prueba cutánea de tuberculina
U	Unidades
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WHO	Organización mundial de la salud
XDR	Extensamente resistente

Tabla de contenido

Agradecimientos.....	6
Dedicatorias.....	7
Abreviaturas.....	8
Tabla de contenido.....	9
Índice de figuras y tablas.....	11
1. INTRODUCCIÓN.....	12
1.1. Tuberculosis y <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	12
1.1.1. Tuberculosis como problema de salud pública.....	12
1.1.2. <i>M. tuberculosis</i> y su ciclo biológico	13
1.1.3. Patogenia celular y molecular	13
1.1.4. Diagnóstico y tratamiento	14
1.2. Proteólisis, plegamiento y secreción de proteínas.....	15
1.2.1. Proteólisis de proteínas.....	15
1.2.2. Plegamiento de proteínas	17
1.2.3. Chaperonas moleculares	17
1.2.4. Secreción de proteínas	18
1.3. Familia de enzimas serina proteasas	20
1.3.1. Estructura y función	20
1.3.2. Mecanismo catalítico	21
1.3.3. Regulación de la actividad proteolítica	22
1.4. La proteína MarP de <i>M. tuberculosis</i>	23
1.4.1. Estructura.....	23
1.4.2. Función	24
1.4.3. Operatividad	26
1.4.4. RipA, un sustrato fisiológico	26
1.4.5. Blanco farmacológico anti-TB	27
1.5. GFP como sustrato	27
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	29
2.1. Hipótesis	29
2.2. Objetivo general.....	29
2.3. Objetivos específicos.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
3.1. Reactivos biológicos y químicos.....	30
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	30
3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos	30
3.1.3. Estuches comerciales	30
3.1.4. Células y medios de cultivo	31
3.1.5. Plásmidos.....	31
3.2. Equipo y programas computacionales	31
3.3. Protocolos generales	32

3.3.1.	Amplificación de la secuencia GFPc.....	32
3.3.2.	Construcción del plásmido pQGFC	32
3.3.3.	Preparación de bacterias competentes	33
3.3.4.	Transformación bacteriana.....	33
3.3.5.	Purificación de ADN plasmídico.....	33
3.3.6.	Secuenciación automática de ADN.....	33
3.3.7.	Expresión proteica a mini-escala	33
3.3.8.	Electroforesis en gel de poliacrilamida (<i>SDS-PAGE</i>).....	34
3.3.9.	Inmuno-detección (<i>western blot</i>)	34
3.3.10.	Cuantificación de proteínas mediante micro-Bradford	34
3.4.	Producción recombinante de MarP-SP a midi-escala	34
3.4.1.	Inducción de la expresión recombinante.....	35
3.4.2.	Extracción de proteínas totales en condiciones nativas	35
3.4.3.	Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel	35
3.4.4.	Desalación mediante cromatografía de exclusión molecular.....	35
3.5.	Producción recombinante de GFPCC4 a midi-escala.....	36
3.5.1.	Inducción de la expresión recombinante.....	36
3.5.2.	Extracción de proteínas totales en condiciones desnaturalizantes	36
3.5.3.	Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel	36
3.6.	Evaluación de la actividad proteolítica de MarP-SP	37
3.6.1.	FITC-gelatina como sustrato	37
3.6.2.	GFPCC4 como sustrato	37
3.6.3.	Ensayos de inhibición	37
4.	RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	38
4.1.	Racionalización: GFP como sensor-sustrato para MarP	38
4.2.	Obtención de pQGFC4, codificante de la variante GFPC	39
4.3.	Análisis de producción a mini-escala	42
4.4.	Producción recombinante de GFPCC4.....	43
4.5.	Producción recombinante de MarP-SP	44
4.6.	MarP-SP exhibe actividad proteolítica sobre FITC-gelatina.....	44
4.7.	MarP-SP exhibe actividad proteolítica sobre GFPCC4	45
4.8.	Inhibición de la actividad proteolítica de MarP-SP.....	47
5.	CONCLUSIONES.....	50
6.	REFERENCIAS	51

Índice de figuras y tablas

Figura 1-1. Representación del mecanismo de transmisión de <i>M. tuberculosis</i>	12
Figura 1-2. Formación del granuloma tuberculoso.	14
Figura 1-3. Acción de chaperonas moleculares durante la biosíntesis de proteínas.	18
Figura 1-4. Modelo del sistema de secreción tipo VII (SST7).	19
Figura 1-5. Estructura del cristal de α -quimotripsina.	20
Figura 1-6. Mecanismo de acción de las enzimas serina proteasas.	21
Figura 1-7. Regulación de la actividad y expresión de proteasas.	22
Figura 1-8. Representación de la estructura 3D del dominio catalítico de MarP de <i>M. tuberculosis</i>	23
Figura 1-9. Análisis de especificidad de sustrato del dominio catalítico (serina proteasa) de MarP de <i>M. tuberculosis</i>	25
Figura 1-10. Representación de la estructura 3D de la proteína verde fluorescente (GFP) de <i>Aequorea victoria</i>	28
Figura 4-1. Representación de la topología de plegamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) de <i>Aequorea victoria</i>	38
Figura 4-2. Representación de la topología de plegamiento de la GFP recombinante (GFPsg).	39
Figura 4-3. Amplificación de los fragmentos GFPn y GFPc.	39
Figura 4-4. Caracterización de 4 clonas (C1-C4) de las construcciones pQGFN y pQGFC mediante polimorfismo de restricción.	40
Figura 4-5. Caracterización de 5 clonas (C16-C20) de la construcción pQGFN mediante polimorfismo de restricción.	40
Figura 4-6. Caracterización de 7 clonas (C5-C10, C13) de la construcción pQGFC mediante polimorfismo de restricción.	41
Figura 4-7. Representación gráfica del plásmido recombinante pQGFCC4.	42
Figura 4-8. Producción recombinante de GFPN (clona NC16) y GFPC (clonas CC2, CC4, CC8 y CC10) a mini-escala, en condiciones típicas de inducción.	42
Figura 4-9. Producción recombinante de GFPCC4 a mini-escala y ensayo de solubilidad.	43
Figura 4-10. Purificación de GFPCC4 mediante cromatografía de afinidad a níquel.	44
Figura 4-11. Purificación de MarP-SP mediante cromatografía de afinidad a níquel.	44
Figura 4-12. Actividad proteolítica de MarP-SP recombinante sobre FITC-gelatina.	45
Figura 4-13. Actividad proteolítica (pH 7.4) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis fluorométrico).	45
Figura 4-14. Actividad proteolítica (pH 7.4) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis electroforético).	46
Figura 4-15. Actividad proteolítica (pH 5.5 \pm 0.5) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis electroforético).	47
Figura 4-16. Inhibición de la actividad proteolítica de MarP-SP (análisis electroforético).	48
Tabla 1-1. Genes codificantes para proteasas anotados en los genomas de <i>M. leprae</i> , <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. bovis</i> y <i>M. avium</i> (<i>paratuberculosis</i>).	16
Tabla 1-2. Sustratos del dominio catalítico (serina proteasa) de MarP de <i>M. tuberculosis</i>	24
Tabla 3-1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> utilizadas en el presente estudio.	31

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis y *Mycobacterium tuberculosis*

1.1.1. Tuberculosis como problema de salud pública

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades con mayor índice de mortalidad a nivel mundial y es la principal causa de muerte de pacientes infectados con VIH. El centro de control de enfermedades (CDC) de los E.U.A. estima que afecta a cerca de una cuarta parte de la población mundial¹.

En el año 2017, se registraron alrededor de 10 millones de casos de TB activa y 1.3 millones de defunciones derivadas de la enfermedad. De acuerdo con datos reportados a la organización mundial de la salud (WHO), ese mismo año, en México se presentaron 23,520 casos y una tasa de mortalidad de 1.6 por cada 100 mil habitantes (excluyendo los casos de TB-VIH)².

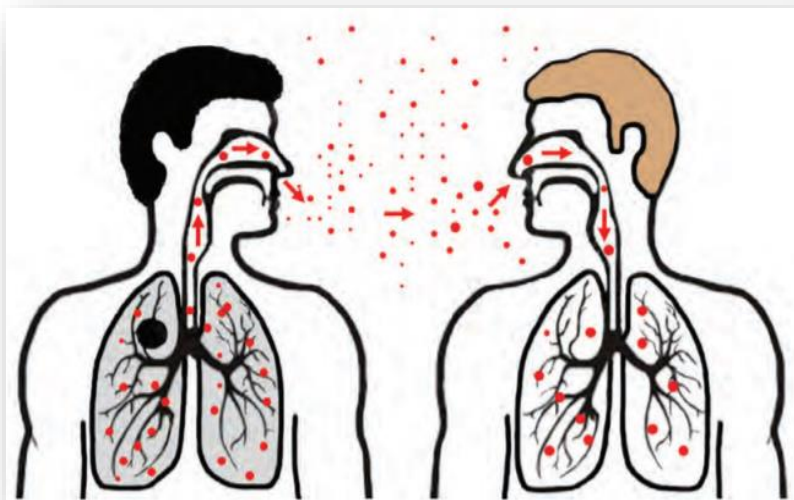


Figura 1-1. Representación del mecanismo de transmisión de *M. tuberculosis*.

Tomada y modificada de: CDC – Core curriculum on tuberculosis. What the clinician should know. 6th edition, 2013. Web: <https://www.cdc.gov/tb/education/corecurr/index.htm>. Obtenida el 30-01-2019.

¹ CDC – Tuberculosis (TB) Data and Statistics (<https://www.cdc.gov/tb/statistics/>). Obtenida el 30-01-2019.

² WHO – Tuberculosis country profiles – Mexico, 2017 (<https://www.who.int/tb/country/data/profiles/en/>). Data are as reported to WHO. Estimates of TB and MDR-TB burden are produced by WHO in consultation with countries. Obtenida el 30-01-2019.

1.1.2. *M. tuberculosis* y su ciclo biológico

Mycobacterium tuberculosis, el agente causal de TB, es un bacilo Gram-positivo intracelular obligado. De forma general, la infección comienza cuando finas partículas de aerosoles que contienen micobacterias (microgotas generadas por individuos con enfermedad activa) son depositadas en los pulmones de un hospedero sano (Figura 1-1) [Cambier *et al.*, 2014]. Una vez que han llegado a los alveolos, las micobacterias son fagocitadas y secuestradas (dentro de un fagosoma) por macrófagos y otras células fagocíticas (p.ej., neumocitos tipo II y células dendríticas). De manera usual, ahí son eliminadas por las condiciones intracelulares prevalentes: alta concentración de especies reactivas de oxígeno (ERO) y nitrógeno (ERN), péptidos antimicrobianos, acidificación del medio y privación de nutrientes, las cuales representan un medio con propiedades bactericidas [Botella *et al.*, 2017]. Sin embargo, en situaciones excepcionales, *M. tuberculosis* evade ese mecanismo de defensa del sistema inmune del hospedero y persiste dentro de las células fagocíticas [Biswas *et al.*, 2010], lo que permite su multiplicación y posterior liberación (cuando la célula infectada muere), favoreciendo la diseminación bacteriana.

1.1.3. Patogenia celular y molecular

En el alveolo del hospedero, el principal sistema de defensa contra la enfermedad es la fagocitosis de la micobacteria por macrófagos. Este proceso inicia mediante contacto directo del patógeno con receptores de membrana celular (p.ej., de manosa, del complemento, o del tipo *Toll*). Una vez fagocitada, la micobacteria reside dentro de una vesícula denominada fagosoma [Smith, 2003], donde es neutralizada por el microambiente subcelular prevalente. Sin embargo, con el tiempo y por acción de una habilidad aun no descifrada, la micobacteria altera el estado de maduración del fagosoma y subsiste de manera indefinida [Glickman & Jacobs, 2001].

Una vez establecida la infección, inicia el proceso de formación del granuloma tuberculoso: los macrófagos infectados producen y secretan citocinas, las cuales actúan como sistema de señalización e inducen la migración de monocitos, neutrófilos y linfocitos hacia el sitio de la infección. Sin embargo, esta respuesta celular es incapaz de eliminar a la micobacteria de forma efectiva. Aún más, resisten la acción bactericida de los macrófagos, previenen la fusión fagosoma-lisosoma, y logran multiplicarse de manera eficiente, conduciendo a la necrosis celular. Una vez liberados, los bacilos continúan multiplicándose en el ambiente extracelular y son recapturados por macrófagos no infectados, los cuales (eventualmente) también serán destruidos. En esta etapa, las micobacterias también son fagocitadas por células dendríticas. Una vez cargadas, viajan hacia los nódulos linfáticos locales y participan tanto en la activación de células T como en el transporte de la micobacteria a tejidos extrapulmonares. Ante esto, las células T activadas migran a la

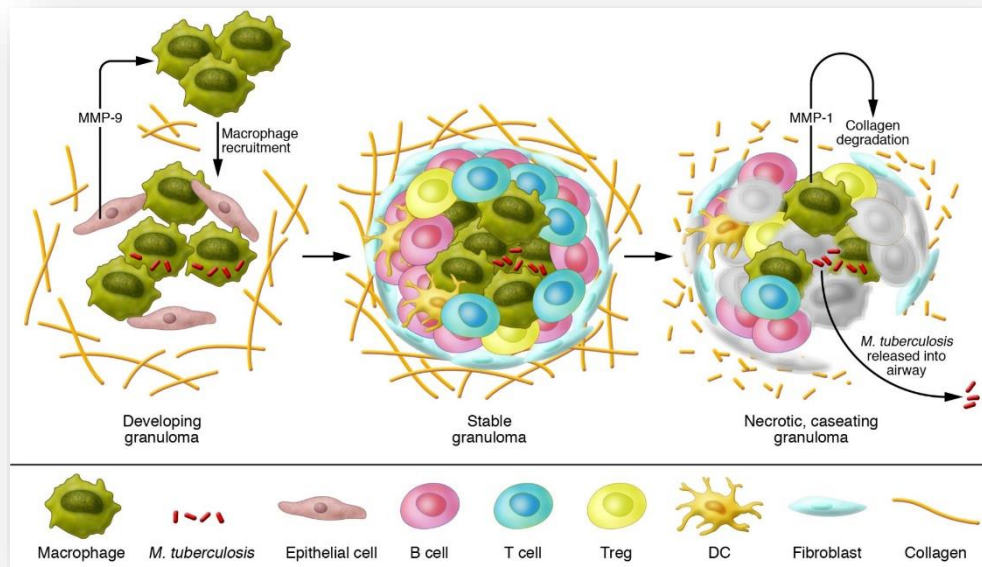


Figura 1-2. Formación del granuloma tuberculoso.

Tomada y modificada de: Salgame, 2011.

zona de infección. De manera general, la acumulación de células del sistema inmune en el sitio de infección bacilar lleva a la formación del granuloma tuberculoso (Figura 1-2) [Ahmad, 2011; Salgame, 2011].

1.1.4. Diagnóstico y tratamiento

El diagnóstico de TB inicia con la evaluación médica del historial clínico y exploración física del paciente. La sintomatología básica de TB pulmonar incluye: tos persistente por más de 3 semanas (con o sin esputo), hemoptisis, dolor en el pecho, pérdida del apetito, pérdida de peso, sudoraciones nocturnas, fiebre y fatiga. En los casos de TB extrapulmonar, la sintomatología depende de los tejidos y órganos afectados. En la mayoría de los casos, la exploración física no es suficiente para confirmar la enfermedad, por lo que diferentes herramientas diagnósticas son utilizadas para el diagnóstico específico de TB.

De acuerdo con los lineamientos recomendados por la CDC, la selección de los métodos de análisis debe basarse tanto en los motivos, contexto y disponibilidad como en el índice costo-beneficio de las pruebas diagnósticas. El análisis radiográfico y la tomografía computarizada son utilizadas para identificar anomalías en la cavidad torácica, en busca de las lesiones típicas asociadas a TB. De manera común, la prueba de la tuberculina (TST) es utilizada como apoyo para el diagnóstico presuntivo. Asimismo, la determinación cuantitativa de interferón-gamma, por métodos estándar (p.ej., *QuantiFERON®-TB Gold*), y la detección del agente infeccioso, mediante exámenes bacteriológicos, representan dos herramientas diagnósticas de apoyo confirmatorio.

De manera específica, la detección de *M. tuberculosis* demanda la disponibilidad de un espécimen clínico (p.ej., esputo, exudado, o líquido biológico), el cual debe ser obtenido y procesado por personal capacitado. La detección microscópica de bacilos acido-alcohol resistentes (BAAR) provee la primera evidencia bacteriológica de TB. Para este fin, dos métodos se aplican de manera típica: uno cromogénico, que utiliza a carbol-fucsina como agente de contraste colorido, y otro fluorogénico, que emplea a auramina-rodamina como agente fotoluminiscente. Cabe destacar que estas pruebas presentan una baja sensibilidad, por lo que habitualmente se consideran como exámenes de tamiz inicial. En casos de pacientes con cuadro clínico presuntivo de TB y resultados negativos de baciloscopía se recomiendan las pruebas moleculares, mediante técnicas de amplificación de ácidos nucleicos, para identificar de manera rápida y confiable a la micobacteria. Como consenso internacional, el estándar de oro para la confirmación de TB es el cultivo bacteriano y la consecuente tipificación de *M. tuberculosis*. Además, esta prueba permite la identificación y caracterización de cepas resistentes a los antibióticos utilizados en el tratamiento de TB.

Una vez diagnosticada, el tratamiento quimioterapéutico debe iniciar a la brevedad posible. De acuerdo con la CDC, en la actualidad existen 10 fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de TB. Aunque no se han incorporado al cuadro típico, algunas fluoroquinolonas (levofloxacino, moxifloxacino y gatifloxacino) se utilizan para el tratamiento de pacientes infectados con cepas multirresistentes o en pacientes intolerantes a los fármacos de primera línea (aprobados por la FDA): isoniazida, rifampina, etambutol y pirazinamida. El tratamiento anti-TB es prolongado, con una duración mínima de 6 meses, de tal manera que se asegure la eliminación de la micobacteria y se reduzcan los índices de transmisión. En caso de incumplimiento del esquema terapéutico, la infección puede reaparecer con altas probabilidades de haber generado cepas resistentes a los fármacos utilizados.

En la actualidad, las opciones de tratamiento farmacológico contra cepas de *M. tuberculosis* resistentes a fármacos (p.ej., MDR y XDR) son limitadas; por tal motivo, es prevalente la necesidad de diseñar estrategias experimentales que permitan el desarrollo de vacunas o la identificación de moléculas anti-TB, capaces de prevenir, detener, o curar la infección [Elkington & Friedland, 2015].

1.2. Proteólisis, plegamiento y secreción de proteínas en procariotas

1.2.1. Proteólisis de proteínas

Las proteasas son polipéptidos que probablemente surgieron durante los estadios tempranos de la evolución como simples enzimas destructivas necesarias para el catabolismo de proteínas y la generación de aminoácidos. Por muchos años, las propiedades proteolíticas han sido el principal objeto de estudio. Sin embargo, su papel como tijeras moleculares que catalizan reacciones altamente específicas representa un área de investigación promisorio [López-Otín & Bond, 2008].

Las proteasas bacterianas representan una colección extensa de enzimas que juegan papeles esenciales en la viabilidad celular, respuesta a estrés y patogenicidad. A pesar de que su perturbación es atractiva para el desarrollo de fármacos antimicrobianos, en la actualidad no son dianas terapéuticas de aplicación clínica [Culp & Wright, 2017]. El género *Mycobacterium* codifica una amplia diversidad de proteasas especializadas que le permiten subsistir dentro del hospedero (Tabla 1-1).

Tabla 1-1. Genes codificantes para proteasas anotados en los genomas de *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* (*paratuberculosis*).

Proteína	<i>M. leprae</i>	<i>M. tuberculosis</i>	<i>M. bovis</i>	<i>M. avium</i>	Comentarios sobre la función
AmiA1	ML0709	Rv3305c	Mb3333c	*	<i>Aminohidrolasas</i>
AmiB1	ML0708	Rv3306c	Mb3334c	*	
MapA	ML1831c	Rv0734	Mb0755	MAP4200	<i>Aminopeptidasas</i>
MapB	ML1576c	Rv2861c	Mb2886c	MAP2934c	
DacB1	ML0691c	Rv3330	Mb3363	MAP3448	<i>Probables carboxipeptidasas</i>
DacB2	*	Rv2911	Mb2935	MAP2979	
FtsH	ML0222	Rv3610c	Mb3640c	MAP0448	<i>Metaloproteasas</i>
Gcp	ML0379	Rv3419c	Mb3453c	MAP4263	
Unnamed	ML2613c	Rv0198c	Mb0204c	*	
ClpB	ML2490c	Rv0384c	Mb0391c	MAP3853	<i>Chaperoninas-proteasas</i>
ClpC	ML0235	Rv3596c	Mb3627c	MAP0461	
ClpX	ML1477c	Rv2457c	Mb2484c	MAP2278c	
ClpX'	*	Rv2667	Mb2686	MAP2787	
ClpP2	ML1479c	Rv2460c	Mb2487c	MAP0426c	
ClpP1	ML1480c	Rv2461c	Mb2488c	MAP2281c	
MycP1	ML0041	Rv3883c	Mb3913c	MAP4239c	<i>Micosinas</i>
MycP2	ML0037	Rv3886c	Mb3916c	*	
MycP3	ML2528c	Rv0291	Mb0299	MAP3787	
MycP4	*	Rv3449	Mb3479	MAP4239c	
MycP5	ML1538c	Rv1796	Mb1824	MAP1511	
HtrA3	ML1078	Rv1223	Mb1255	MAP2555c	<i>HtrAs: Proteasas de choque térmico</i>
HtrA4	ML2659	Rv0125	Mb0130	MAP3527	
HtrA2	ML0176	Rv0983	Mb1009	MAP0918	
PepB	ML0864c	Rv2213	Mb2236	MAP1953	<i>Peps: Probables peptidasas</i>
PepC	ML2213c	Rv0800	Mb0823	MAP0632	
PepE	ML1136	Rv2089c	Mb2116c	MAP1823c	
PepN	ML1486	Rv2467	Mb2494	MAP2287	
PepQ	ML0521	Rv2535c	Mb2564c	MAP1096	
PepR	ML0855	Rv2782c	Mb2805c	MAP2890	
PrcA	ML1323	Rv2109c	Mb2133c	MAP1834c	<i>Proteasomas</i>
PrcB	ML1322	Rv2110c	Mb2134c	MAP1835c	
PtrB	ML2226	Rv078(1/2)	Mb0804	MAP0615	<i>Probable proteasa II</i>
SppA	ML1839c	Rv0724	Mb0745	MAP4188	<i>Posible proteasa IV</i>
Unnamed	ML2704	Rv3915	Mb3946	MAP4341	<i>Probable proteasa</i>
Unnamed	ML2295c	Rv3668c	Mb3692c	MAP0406	
Unnamed	ML1288	Rv2141c	Mb2165c	MAP1886c	
Unnamed	ML2382c	Rv0457c	Mb0466c	*	
Unnamed	ML2298c	Rv3671c	Mb3695c	MAP0403	<i>Posible serina proteasa asociada a membrana</i>
Unnamed	ML1582c	Rv2869c	Mb2894c	MAP2939c	<i>Posible proteasa de corte intermembrana</i>
HtpX	ML2278	Rv0563	Mb0578	MAP4059	<i>Probable proteasa transmembranal de choque térmico</i>
Pip	*	Rv0840c	Mb0863c	MAP0684c	<i>Iminopeptidasas</i>
Unnamed	*	Rv1977	*	*	
Pep	*	Rv0319	Mb0327	*	<i>Pirrolidona-carboxilato peptidasa</i>
LepB	ML1612c	Rv2903c	Mb2927c	MAP2971c	<i>Probables peptidasas de señal</i>
LspA	ML1199	Rv1539	Mb1566	MAP1250	
Unnamed	ML1339c	Rv2672	Mb2691	MAP2792	<i>Probables proteasas secretadas</i>
Unnamed	ML1632c	Rv2223c	Mb2247c	MAP1967c	
Unnamed	ML1633c	Rv2224c	Mb2248c	MAP1968c	

Tomada y modificada de: Ribeiro-Guimarães & Pessolani, 2007.

* No se identificó homólogo alguno.

1.2.2. Plegamiento de proteínas

El proceso mediante el cual un polipéptido nascente adquiere su estructura tridimensional nativa se conoce como plegamiento [Feldman & Frydman, 2000]. Para algunas proteínas, como la ribonucleasa, este proceso puede ocurrir de forma espontánea, ya que el estado nativo demanda un mínimo de energía global para su conformación. Sin embargo, la mayoría requiere de la asistencia de otras proteínas, denominadas chaperonas moleculares, que facilitan el proceso. El conocimiento sobre el plegamiento de proteínas es clave en la comprensión de diversas patologías en humanos, p.ej., la enfermedad de Alzheimer, ya que mejora la habilidad de manipular o intervenir a nivel celular [Chen *et al.*, 2007].

A nivel fisiológico, el plegamiento correcto es esencial para la función de las proteasas, ya que juegan un papel clave en los mecanismos de procesamiento y activación de otros polipéptidos que participan en diversas funciones celulares, p.ej., procesamiento de insulina y activación de caspasas. Además, son fundamentales en la degradación de intermediarios polipeptídicos mal plegados.

1.2.3. Chaperonas moleculares

Las chaperonas moleculares, como facilitadoras del plegamiento, no transmiten información adicional a los polipéptidos asistidos para que logren su estructura nativa correcta, la cual depende de la secuencia primaria (residuos de aminoácidos) que la conforma. Su función principal es catalizar el plegamiento de proteínas favoreciendo el ensamblado estructural que demande menor energía global. Para este fin, ejercen su función uniéndose y estabilizando a polipéptidos parcialmente plegados (o mal plegados) que aparecen como intermediarios a lo largo del proceso. En ausencia de chaperonas moleculares, los intermediarios del plegamiento son inestables y frecuentemente se agregan formando complejos insolubles, los cuales son potencialmente tóxicos para la célula [Cooper *et al.*, 2000].

Los estudios en modelos bacterianos proporcionaron la base para comprender la maquinaria molecular y el mecanismo de la biosíntesis de proteínas. Las proteínas recién sintetizadas que emergen del ribosoma se enfrentan a un entorno que alberga una amplia diversidad molecular y, en estas condiciones, son particularmente vulnerables al plegamiento incorrecto y agregación. Además del posible efecto tóxico *per se*, la agregación proteica representa un deterioro adicional para la célula, ya que reduce el reciclaje de aminoácidos, bloquea la acción de las chaperonas moleculares y de las proteasas, secuestra a proteínas funcionales no relacionadas, y afecta la función asociada a la proteína agregada. Como respuesta, las células evolucionaron un mecanismo general para reducir el plegamiento anómalo: la asistencia de chaperonas moleculares (Figura 1-3) [Sabate *et al.*, 2010]. En bacterias, tres chaperonas altamente conservadas: DnaK, GroEL y TF, son las principales responsables de prevenir tanto el plegado incorrecto o prematuro como las interacciones no nativas de proteínas citosólicas durante su biosíntesis [Phan & Houben, 2018].

1.2.4. Secreción de proteínas

Para exportar proteínas, las bacterias evolucionaron distintos sistemas de secreción. Mientras que algunos están conservados en la mayoría de las bacterias estudiadas, p.ej., los sistemas Sec y Tat, otros sólo están presentes en especies que secretan un número limitado de proteínas. Esta especialización incluye los sistemas del tipo I al tipo VI, presentes en bacterias Gram-negativas donde son críticos para la patogénesis, ya que participan en la secreción de factores de virulencia [Phan & Houben, 2018].

Las micobacterias utilizan una maquinaria Sec como sistema clásico para la secreción de proteínas (etiquetadas con una secuencia señal en el extremo N-terminal) a través de la membrana citoplásmica, el cual consta de los componentes de membrana SecY, SecE, SecG, SecD y SecF, y la ATPasa SecA (que reconoce a la secuencia señal). En *Mycobacterium*, todo indica que el mecanismo funciona de manera equivalente al establecido en otras bacterias. De forma similar, las micobacterias también utilizan una vía de exportación de doble arginina (Tat), una máquina independiente que posee la capacidad única de translocar proteínas plegadas a través de la membrana citoplásmica. Los clientes de este sistema son dirigidos a la maquinaria de transporte mediante una secuencia señal (de estructura parecida a la requerida por Sec) que incluye un motivo RRXX cercano al extremo N-terminal (donde XX corresponden a dos residuos no cargados) [Champion & Cox, 2007].

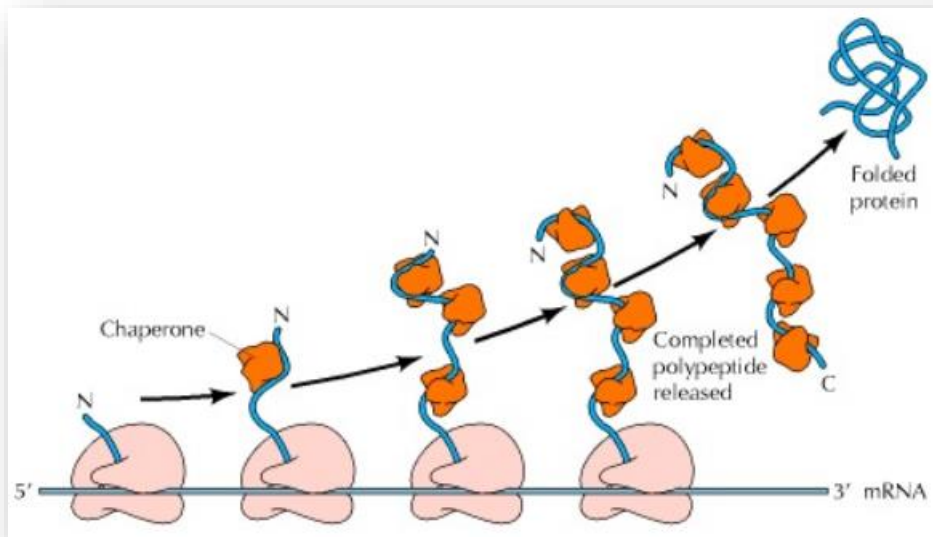


Figura 1-3. Acción de chaperonas moleculares durante la biosíntesis de proteínas.

Tomada y modificada de: Cooper *et al.*, 2000.

Una diferencia biológica de las micobacterias es la presencia de una capa externa compuesta de ácidos grasos poco usuales, denominados ácidos micólicos, que funciona como segunda barrera hidrofóbica (después de la membrana citoplásmica). Ante esta particularidad, emerge la interrogante ¿qué mecanismo utilizan para exportar y retener proteínas hacia la superficie celular? Recientemente, se describió el sistema de tipo VII (SST7), también conocido como el mecanismo ESX, que conforma la vía de secreción más importante para las micobacterias. De manera breve, después de ser reconocidos en el citosol, los clientes de SST7 son guiados hacia la membrana citoplásmica y transportados a través de la envoltura celular. Este proceso es mediado por los componentes de membrana EccB, EccC, EccD, EccE y MycP, los cuales están altamente conservados y son esenciales para SST7 (Figura 1-4) [Houben *et al.*, 2014].

De manera general, tanto los componentes de los diversos sistemas de secreción como aquellos de los sistemas de plegamiento y degradación de proteínas representan blancos atractivos para el diseño de nuevos antibióticos, ya que los mecanismos involucrados son esenciales para la supervivencia y virulencia del patógeno.

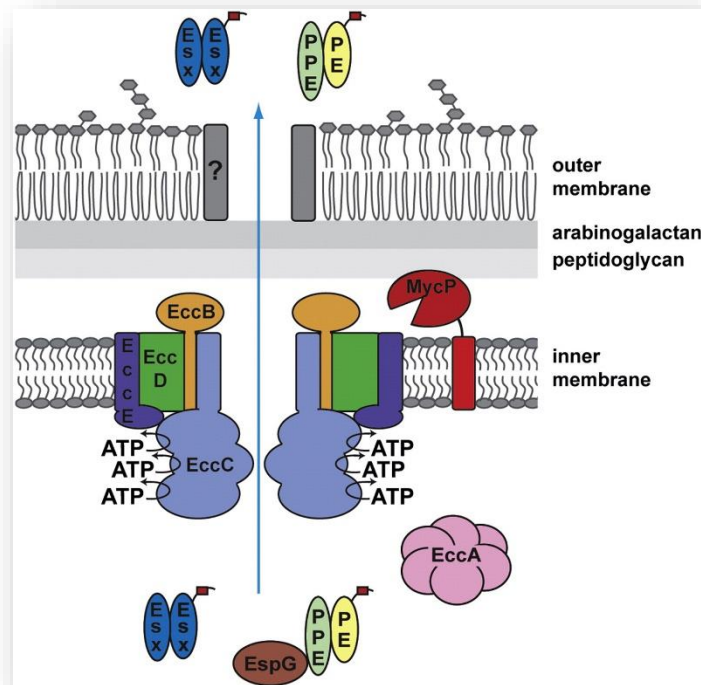


Figura 1-4. Modelo del sistema de secreción tipo VII (SST7).

Las proteínas Esx y PE/PPE son exportadas en forma dimérmica por SST7. El reconocimiento de clientes ocurre mediante un motivo de secreción presente en el C-terminal. El componente citosólico EspG reconoce a los clientes y los conduce hacia un canal de membrana (hipotético), conformado por EccB, EccC, EccD y EccE.

Tomada y modificada de: Houben *et al.*, 2014.

1.3. Familia de enzimas serina proteasas

1.3.1. Estructura y función

Cerca de una tercera parte de todas las proteasas se pueden clasificar dentro de la familia de enzimas serina proteasas, las cuales reciben esta nomenclatura debido al residuo de serina (Ser) presente en el sitio activo. Estas proteasas se distinguen por la presencia de una tríada catalítica: Asp-His-Ser, la cual se encuentra en cuatro contextos estructurales diferentes (clases), tipificadas de acuerdo con enzimas modelo: quimotripsina, subtilisina, carboxipeptidasa Y, y proteasas del tipo Clp [Hedstrom, 2004].

Como modelo de enzimas serina proteasas, la estructura de quimotripsina consta de dos barriles β y una hendidura catalítica ubicada entre ambos (Figura 1-5), la cual incluye la triada Ser-His-Asp, la cavidad del oxoanión y el sitio de interacción con el sustrato (cavidad S1) [Hedstrom, 2004].

Las enzimas serina proteasas son codificadas por diferentes organismos (eucariotas y procariotas) y por algunos virus, y surgieron durante la evolución como un grupo abundante y diverso [Ruiz-Perez & Nataro, 2013]. Una amplia variedad de procesos biológicos depende de la actividad hidrolítica de las proteasas. Independiente a la complejidad del organismo, estas enzimas son esenciales en todo momento (a

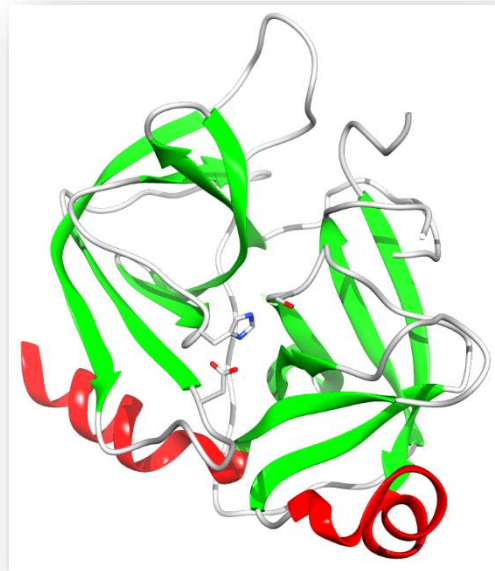


Figura 1-5. Estructura del cristal de α -quimotripsina.

PDB ID: 2CHA. Imagen obtenida mediante visualización con UCSF Chimera 1.12 Package.

nivel celular), ya que todas las proteínas producidas deben procesarse con fines de reciclado de aminoácidos [Władyka & Pustelny, 2008]. De manera específica, las proteasas similares a quimotripsina participan en muchos procesos fisiológicos críticos, tales como digestión, hemostasia, apoptosis, transducción de señales, reproducción y respuesta inmune.

1.3.2. Mecanismo catalítico

El mecanismo de reacción generalmente aceptado para las enzimas serina proteasas (Figura 1-6) consiste en la formación de un nucleófilo alcóxido, generado a partir de la deprotonación de la serina catalítica, a través de un distribuidor de cargas conformado por la triada catalítica Asp-His-Ser. Este sistema transfiere los protones en dirección de Asp y los electrones en dirección de Ser, donde His participa como un intermediario. Una vez activado, por acción de las condiciones del medio (p.ej., pH) o la unión a sustratos, el alcóxido realiza un ataque nucleofílico al enlace peptídico susceptible a hidrólisis. De manera específica, ataca al carbono del carbonilo, formando un nuevo enlace covalente y desplazando los electrones del doble enlace, lo que conduce a la conformación de una estructura intermedia tetraédrica (la cual es estabilizada por los grupos amino presentes en la cavidad del oxoanión). Enseguida, el electrón libre del oxoanión regresa a reformar el doble enlace del carbonilo, rompiendo el enlace peptídico y liberando (como grupo saliente) la porción C-terminal del polipéptido hidrolizado, auxiliado por el grupo amino en la posición épsilon de His, que participa como un ácido que dona su protón al grupo amino saliente. Por otro lado, la acil-enzima es hidrolizada mediante la asistencia de His, que deprotona una molécula de agua y

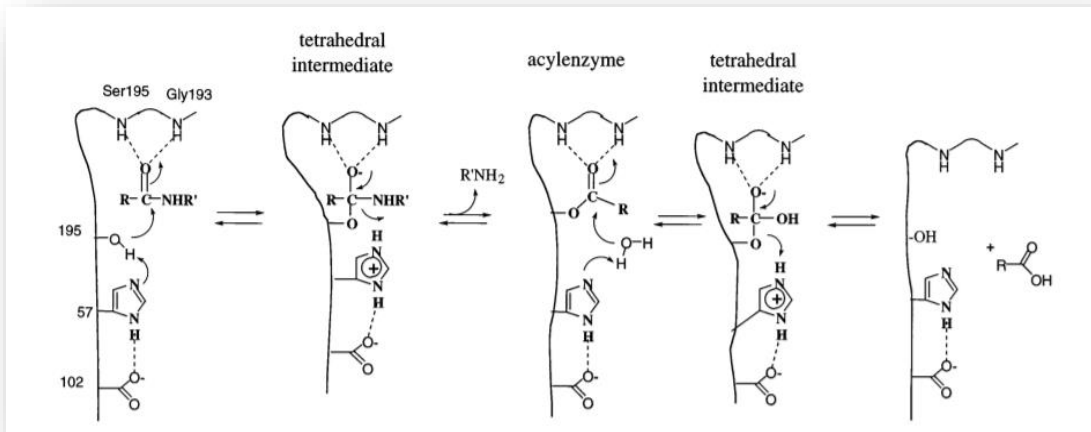


Figura 1-6. Mecanismo de acción de las enzimas serina proteasas.

Tomada y modificada de: Hedstrom, 2002.

genera una base capaz de atacar de nuevo al carbono del carbonilo, desplazando el doble enlace y generando una estructura tetraédrica intermedia. Una vez reformado el doble enlace del carbonilo, se libera tanto la enzima como la porción N-terminal del polipéptido hidrolizado.

1.3.3. Regulación de la actividad proteolítica

La regulación de la actividad bioquímica de las proteasas ocurre en diferentes niveles: expresión y síntesis del producto génico, ensamblaje de complejos proteolíticos, activación de la actividad catalítica, interacciones con moduladores enzimáticos, y control de la distribución espacial-temporal de enzimas y sustratos [Bai & Pfaff, 2011]. La proteólisis específica produce sustratos activos o inactivos; en tanto, la proteólisis inespecífica resulta en la degradación proteica. Por lo tanto, las proteasas son potencialmente peligrosas para la funcionalidad celular. Para evitar esto, los organismos evolucionaron una amplia gama de mecanismos con el fin de controlar la actividad proteolítica (Figura 1-7). Por ejemplo, agrupan los genes en operones (en bacterias), modulan la expresión génica en diferentes niveles, realizan modificaciones postraduccionales, y codifican para inhibidores específicos [Władyka & Pustelny, 2008].

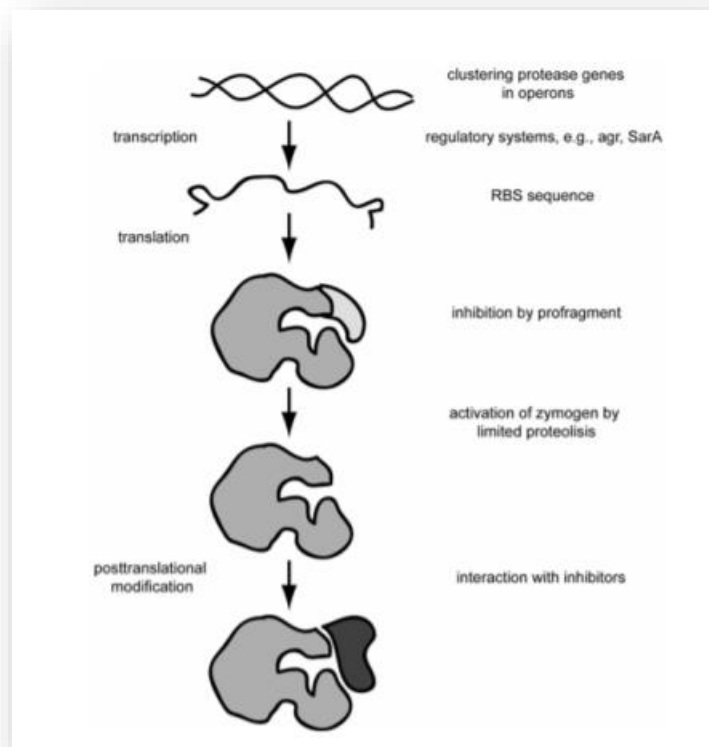


Figura 1-7. Regulación de la actividad y expresión de proteasas.

Tomada y modificada de: Władyka & Pustelny, 2008.

1.4. La proteína MarP de *M. tuberculosis*

1.4.1. Estructura

El polipéptido (397 residuos) codificado por el gen Rv3671c de *M. tuberculosis* es una enzima serina proteasa de la familia de las quimiotripsinas. Esta proteína de membrana también es conocida como MarP (*Mycobacterium acid-resistant Protein*). Su organización consta de dos dominios estructurales: uno N-terminal transmembrana (de 4 pasos helicoidales) y otro C-terminal catalítico (serina proteasa), unidos por una secuencia *linker* (aprox. 62 residuos). El dominio catalítico muestra homología con proteasas del tipo HtrA, pero carece del dominio PDZ.

En el año 2010, se reportó la resolución (1.3 Å) de la estructura tridimensional del dominio catalítico (PDB ID: 3K6Y) (Figura 1-8) [Biswas *et al.*, 2010], resaltando características estructurales de

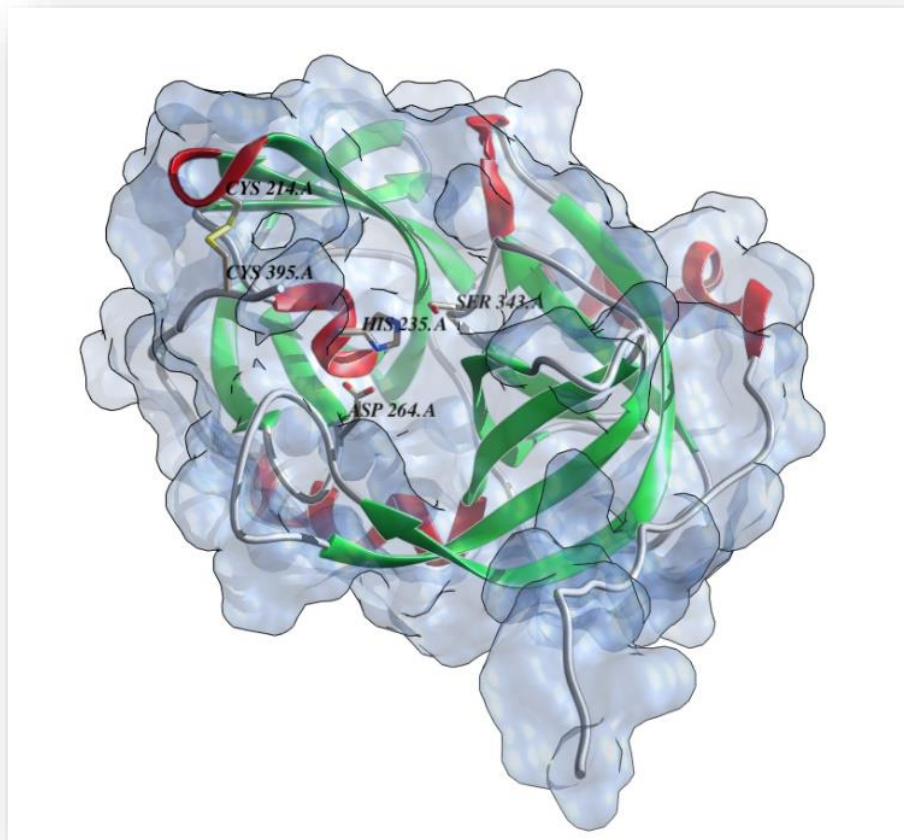


Figura 1-8. Representación de la estructura 3D del dominio catalítico de MarP de *M. tuberculosis*.

PDB ID: 3K6Y. Imagen obtenida mediante visualización con UCSF Chimera 1.12 Package.

importancia funcional. Con base en el plegamiento, se parece a quimotripsina, presenta dos subestructuras tipo barril β (conformados por seis hojas β -plegadas antiparalelas) y una triada catalítica: His235, Asp264 y Ser343. Además, contiene un enlace disulfuro (Cys214-Cys395) que es clave para la estabilidad funcional, ya que es requerido para la actividad catalítica (estudios *in vitro*).

1.4.2. Función

La primera evidencia de la función de la proteína MarP de *M. tuberculosis* se reportó en el año 2008. Mediante mutagénesis asistida por transposones, se identificó como un producto génico asociado a la resistencia micobacteriana a un medio ambiente ácido. De manera específica, mutantes con interrupción del gen Rv3671c mostraron sensibilidad a pH ácido y fueron incapaces de mantener un pH intracelular neutro, tanto en cultivos bacterianos como en macrófagos activados. Asimismo, se observó una atenuación de la proliferación de tales mutantes en modelos murinos [Vandal *et al.*, 2008].

Gracias a la expresión recombinante y una apropiada estrategia de cristalización, fue posible determinar la estructura del dominio catalítico y la especificidad de sustratos (Tabla 1-2). Los primeros indicios de actividad proteasa se obtuvieron mediante análisis de los productos de auto-proteólisis (SDS-

Tabla 1-2. Sustratos del dominio catalítico (serina proteasa) de MarP de *M. tuberculosis*.

Sustrato ¹	Especificidad ² y corte (↓)	Referencia
Rv3671c/MarP [§] (auto-proteólisis)	PKRL↓SALL* LARV↓NEAA KRLS↓ALLN RLSA↓LLNT LSAL↓LNTS SALL↓NTSG LLNT↓SGLP IRSL↓APRC PRCQ↓KVLE VFGA↓AIDD	Biswas <i>et al.</i> , 2010
β -Caseína [¶]	ND	Biswas <i>et al.</i> , 2010
Banco de péptidos [¶]	KRFn↓AHWV* nTDR↓GWYL* PSLI↓AKWV* YRnI↓RQE* IFYL↓NGD IGLQ↓VHnR ILWR↓TEHH RNTF↓Y nY↓FKYI YIWY↓VQTA YPI n↓A YSWV↓ARG	Small <i>et al.</i> , 2013
Rv1477/RipA [§]	ARLV↓AWSS	Botella <i>et al.</i> , 2017

¹ Sustrato fisiológico (§) o no fisiológico (¶).

² No determinado (ND); los aminoácidos típicos se muestran en código de una letra, incluyendo norleucina (n); las secuencias prototipo se indican con un asterisco (*).

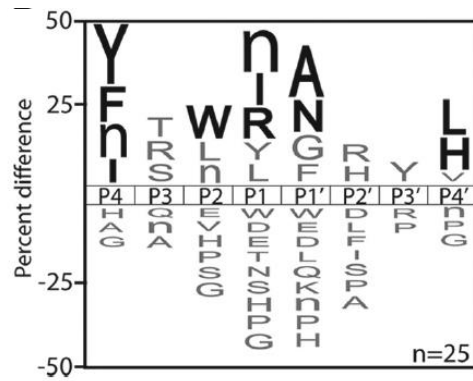


Figura 1-9. Análisis de especificidad de sustrato del dominio catalítico (serina proteasa) de MarP de *M. tuberculosis*.

Tomada y modificada de: Small *et al.*, 2013.

PAGE y MALDI-TOF). De manera interesante, los resultados indicaron que MarP hidroliza varios sitios del *linker*. Por esta razón, se especula que la auto-escisión es un posible mecanismo de liberación del dominio catalítico de MarP hacia el periplasma micobacteriano [Biswas, *et al.*, 2010].

En el periplasma bacteriano, HtrA y DegP participan en la degradación de proteínas mal plegadas o desnaturalizadas. La homología de secuencias (con respecto a MarP) sugiere una función similar, por lo que se sospecha que participa en la degradación de proteínas afectadas por estrés oxidativo y pH dentro del fagosoma. Un hecho que apoya esta hipótesis es su habilidad para degradar β -Caseína [Biswas *et al.*, 2010]. Estudios colaterales en busca de una secuencia de corte específica, usando técnicas de exploración de bibliotecas de péptidos sintéticos y la caracterización de múltiples sustratos mediante espectrometría de masas, revelaron que MarP prefiere residuos voluminosos en la posición P4, Trp o Leu en P2, Arg o residuos hidrófobos en P1, y Ala o Asn en P1' (Figura 1-9) [Small *et al.*, 2013].

De manera desacorde a los ensayos *in vitro*, donde se determinó que el enlace disulfuro es esencial para la actividad catalítica, los estudios *in vivo* revelaron que la función no depende completamente de tal enlace, ya que los ensayos de complementación de la mutante Δ MarP con las variantes proteicas Cys214Ala y Cys214Ala/Cys395Ala mostraron restablecimiento total del fenotipo de resistencia a medio ácido, aunque se observó una reducción significativa de la viabilidad celular. Por lo tanto, se considera que el enlace disulfuro de MarP es importante para la actividad catalítica, pero dispensable para la resistencia a pH ácido [Small *et al.*, 2013].

1.4.3. Operatividad

Aunque siempre se consideró como una proteasa ácida, por su origen y descubrimiento, la mayoría de los estudios funcionales de MarP se realizaron en condiciones de pH entre 7.4 y 8.0. Sin embargo, para comprender su operatividad fisiológica, es importante que los ensayos de funcionalidad se lleven a cabo en condiciones similares a las que prevalecen dentro del fagolisosoma (pH menor a 5.0) [Levitte *et al.*, 2016].

En un estudio reportado en el año 2017, se analizaron las alteraciones morfológicas de las mutantes Δ MarP de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* después de la proliferación celular en condiciones ácidas. Los resultados revelaron que las micobacterias exhiben una elongación significativa, con un aumento en la proporción de células septadas. Este fenotipo sugiere un efecto negativo sobre los procesos de división y separación celular. Sobre esta base, es factible suponer que MarP desempeña un papel clave en la separación celular cuando la micobacteria se encuentra sometida a un estrés ácido [Botella *et al.*, 2017].

La separación celular es un proceso que requiere de la participación de diversas enzimas líticas, incluyendo endopeptidasas del peptidoglucano. RipA es una endopeptidasa conformada por dos dominios estructurales: uno N-terminal que muestra un plegamiento de hélice enrollada (*coiled coil*) y otro C-terminal catalítico (NlpC/p60), unidos por una secuencia *linker*. RipB, otra endopeptidasa, posee solo el dominio catalítico (NlpC/p60), con alta homología al equivalente de RipA [Böth *et al.*, 2011]. De manera individual, RipA y RipB no son esenciales para *M. smegmatis* [Martinelli & Pavelka, 2016], lo que implica que ejercen actividades redundantes y que sólo una endopeptidasa del peptidoglucano es requerida para la viabilidad celular.

En un estudio reciente, se reportó que MarP de *M. tuberculosis* activa (mediante proteólisis) a la endopeptidasa RipA, presentando una mejor eficiencia de reconocimiento e hidrólisis en condiciones ácidas (pH 4.5) [Botella *et al.*, 2017]. Además, se identificó la secuencia específica de corte (ARLV↓AWSS) en RipA, la cual presenta diferencias significativas con respecto a las identificadas mediante escrutinio *in vitro* usando bibliotecas de péptidos sintéticos (Figura 1-9) [Small *et al.*, 2013]. En conjunto, estos resultados indican que MarP activa a RipA mediante la remoción del dominio N-terminal.

1.4.4. RipA, un sustrato fisiológico

La función del dominio N-terminal de RipA es controversial. Por un lado, concebido como un inhibidor natural del dominio catalítico [Ruggiero *et al.*, 2010]; y por otro, irrelevante para la función, esto apoyado por los resultados de un análisis *in vitro* que reveló actividades catalíticas comparables para las proteínas RipA (completa) o RipAC (variante que comprende sólo el dominio C-terminal) [Böth *et al.*, 2011]. Esta última postura es secundada por un estudio reciente, donde los resultados estructurales mostraron que la accesibilidad de la cisteína catalítica no está limitada por el dominio N-terminal [Steiner *et al.*, 2018]. Pero, de manera secundaria, señalaron la posible participación de un módulo de la secuencia

linker (inter-dominio), que exhibe potencial para actuar como tapa estructural de la hendidura de unión al péptido. En otro sentido, la homología de RipA de *M. tuberculosis* y PcsB de *S. pneumoniae* sugiere que el dominio N-terminal funciona como un módulo rígido, similar al tallo típico de las proteínas de construcción de andamios, y que puede ser la estructura responsable, vía dimerización, de la localización del dominio catalítico dentro del divisoma (aparato de división celular) [Steiner, *et al.*, 2018].

En consideración a que la dimerización del dominio N-terminal de RipA es inhibida en condiciones de pH menores a 5.0 [Steiner *et al.*, 2018], es factible postular que MarP funciona como mecanismo enzimático de liberación del dominio catalítico en condiciones ácidas, ante la imposibilidad de una localización exitosa (vía dimerización) hacia el divisoma bacteriano. Cabe resaltar que las condiciones ácidas no afectan al dominio catalítico de RipA, el cual preserva el 100% de su actividad a pH 4.5 [Böth *et al.*, 2011], lo que justifica el papel fisiológico de MarP: activar a RipA dentro del fagolisosoma.

1.4.5. Blanco farmacológico anti-TB

Ante la prevalencia y constante aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos anti-TB que se utilizan en la actualidad [Lange *et al.*, 2014], es importante identificar y caracterizar nuevos blancos farmacológicos que favorezcan el desarrollo de alternativas terapéuticas para el tratamiento de la enfermedad. En la actualidad, ambas proteínas (MarP y RipA) son reconocidas como blancos de alta confianza, debido a que juegan un papel crucial en la evasión de los mecanismos bactericidas de los macrófagos. Además, como las mutantes Δ MarP son hipersensibles a antibióticos lipofílicos [Small *et al.*, 2013], aunado a una atenuación de su proliferación en modelos *in vivo* [Vandal, *et al.*, 2008], es razonable considerar que moléculas inhibitoras de la función de MarP tienen potencial terapéutico como fármacos adyuvantes anti-TB.

1.5. GFP como sustrato

El desarrollo y aplicación de las proteínas auto-fluorescentes en ensayos biológicos revolucionó la investigación biomédica en las últimas décadas. De manera interesante, su amplia gama de aplicaciones, tanto en ensayos *in vitro* como *in vivo*, las sitúan como herramientas moleculares de primera mano para la biología celular moderna. Inclusive, su aplicación como biosensor en tiempo real de pH, iones, segundos mensajeros y otros analitos es altamente apreciada [Haggie & Verkman, 2005].

La proteína verde fluorescente (GFP), identificada en la medusa *Aequorea victoria* en la década de los años 1960's, se aisló y caracterizó en el año de 1992 [Liu *et al.*, 2015]. La proteína nativa es un polipéptido de 238 residuos que emite una señal verde (506 nm) cuando se expone a luz en el rango azul (395 nm) a violeta (475 nm).

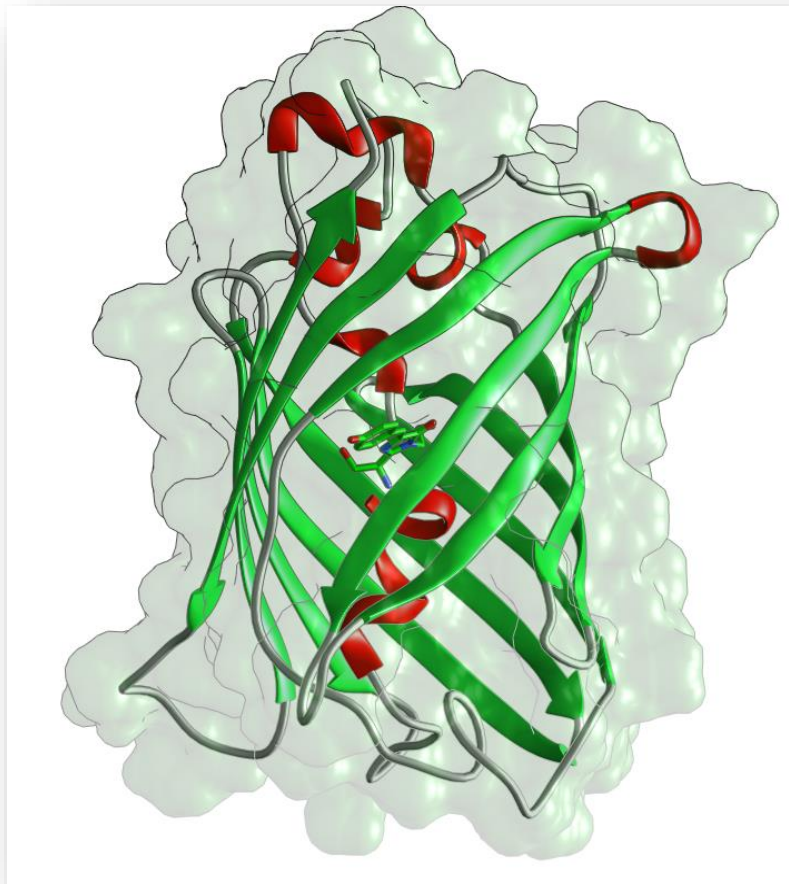


Figura 1-10. Representación de la estructura 3D de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*.

PDB ID: 1GFL. Imagen obtenida mediante visualización con UCSF Chimera 1.12 Package.

La fluorescencia de GFP proviene de un fluoróforo único (*p*-hidroxibencilideno imidazolinona) derivado de la auto-ciclación de los residuos Ser-Tyr-Gly en las posiciones 65 a 67. La estructura cristalográfica reveló una conformación del tipo barril β , que consiste en 11 hojas β -plegadas unidas por horquillas estructurales (*loops*), donde el fluoróforo se localiza en una hélice- α al centro de la estructura (Figura 1-10). Es conveniente destacar que la proteína no plegada pierde la fluorescencia, ya que el fluoróforo queda expuesto al solvente [Chiang *et al.*, 2001].

En consideración a que exhibe un alto nivel de resistencia a proteasas [Chiang *et al.*, 2001], GFP fue elegida como esqueleto estructural para portar la secuencia de corte ARLV↓AWSS (derivada de RipA) y así actuar como sustrato específico y biosensor fluorescente para determinar la actividad proteolítica de la enzima (serina proteasa) MarP de *M. tuberculosis*.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

Variantes de GFP modificadas con la secuencia de corte ARLV↓AWSS (derivada de RipA) en las horquillas *h3* (C48–W57) y *h9* (P187–H199) serán susceptibles a degradación proteolítica por acción de la enzima (serina proteasa) MarP de *M. tuberculosis*.

2.2. Objetivo general

Determinar la actividad proteasa de MarP mediante hidrólisis de una variante de GFP, en ensayos de catálisis e inhibición enzimática, para establecer las condiciones de un posible bioensayo fluorogénico de evaluación de moduladores específicos.

2.3. Objetivos específicos

- A. Obtener variantes de la proteína GFP susceptibles a degradación por MarP, basadas en el sitio de corte de la proteína RipA, mediante mutagénesis dirigida.
- B. Evaluar la actividad proteolítica de MarP sobre variantes de GFP mediante ensayos fluorogénicos de hidrolisis y análisis de productos de digestión.
- C. Determinar el efecto de la concentración de sustrato y enzima mediante ensayos de actividad proteolítica de MarP sobre un sustrato GFP susceptible específico para establecer parámetros bioquímicos.
- D. Evaluar el efecto de inhibidores específicos para enzimas serina proteasas (PMSF) y agentes reductores (DTT) sobre la actividad proteolítica de MarP utilizando una GFP susceptible como sustrato.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Becton Dickinson: agar bacteriológico, extracto de levadura, y triptona. *Biorad*: agarosa, 4X Laemmli *sample buffer*, acrilamida al 30%, azul brillante de Coomassie R250, y azul brillante de Coomassie G250. *Fermont*: etanol. *Spectrum*: metanol. *EM Science*: 2-mercaptoetanol. *IBI*: DTT, SDS, IPTG, urea, y Tris. *JT Baker*: ácido clorhídrico (HCl), persulfato de amonio, cloruro de sodio (NaCl), e hidróxido de sodio (NaOH). *Shelton Scientific*: glicerol. *INC*: glicina. *Nestle*: leche en polvo Svelty™. *Productos Químicos Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂), isopropanol, y EDTA. *BDH*: ácido tricloroacético. *Qiagen*: agarosa-NTA-níquel. *Scientific Industries*: perlas de cristal de 0.1 mm. *Sigma*: *Cellytic*® B, *Cellytic*® IB, ácido acético, azul de bromofenol, TEMED, DPBS 1X, bromuro de etidio, *Tween*® 20, PMSF, ampicilina, imidazol, y *cOmplete*™ protease inhibitor cocktail.

3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

Agilent: ADN-polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ADN-pol), solución amortiguadora 10X para *Pfu* ADN-pol. *New England Biolabs*: endonucleasas (BamHI y HindIII), soluciones amortiguadoras 10X para endonucleasas (NEB2 y CutSmart), albumina sérica bovina (BSA), ADN-ligasa del bacteriófago T4 (T4 ADN-lig), solución amortiguadora 10X para T4 ADN-lig, mezcla de deoxirribonucleótidos (dNTPs), marcadores de peso molecular para ADN (*100-bp Ladder* y λ DNA-HindIII), y marcador de peso molecular para proteínas (*Blue Prestained Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*). *Rockland*: anticuerpo policlonal de cabra dirigido contra IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (anti-Ratón/AP). *Sigma*: anticuerpo monoclonal dirigido contra el epítoto c-Myc (anti-Myc). *Boehringer Mannheim*: BCIP (fosfatasa alcalina). *Roche Biochemicals*: proteinasa K.

3.1.3. Estuches comerciales

La purificación de productos de *PCR* se realizó empleando el estuche *QIAquick PCR Purification Kit*; la purificación de ADN plasmídico se llevó a cabo utilizando el estuche *QIAprep Spin Miniprep Kit*, ambos de *Qiagen*. La inmuno-detección se reveló usando el estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit* de *Bio-Rad*. Los procedimientos de ultrafiltración se realizaron utilizando columnas *NANOSEP 10K* de *Pall*. La desalación y permeación en gel de muestras proteicas se llevó a cabo haciendo uso de las columnas *PD-10* de *GE Healthcare*.

Tabla 3-1. Cepas de *Escherichia coli* utilizadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo	Fuente
ER2738	<i>F' proA+B+ lacIq Δ(lacZ)M15 zcf::Tn10(Tet^R)/fhuA2 glnV Δ(lac-proAB) thi-1 Δ(hsdS-mcrB)5</i>	NEB
SHuffle Express	<i>fhuA2 [lon] ompT ahpC gal λatt::pNEB3-r1-cDsbC (Spec^R, lacIq) ΔtrxB sulA11 R(mcr-73::miniTn10--Tet^S)2 [dcm] R(zgb-210::Tn10 --Tet^S) endA1 Δgor Δ(mcrC-mrr)114::IS10</i>	NEB

3.1.4. Células y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* (NEB, New England Biolabs) empleadas durante este proyecto se enlistan en la Tabla 3-1. La cepa ER2738 se utilizó de forma rutinaria para protocolos de clonación molecular y para la producción recombinante de las proteínas GFP y GFPCC4. La cepa SHuffle Express se empleó para la producción recombinante del dominio catalítico de la proteína MarP (MarP-SP).

Las bacterias se cultivaron en medio Luria Bertani (LB) líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl) o sólido (LB más 1.7% de agar bacteriológico). Cuando fue requerido, el medio se suplementó con ampicilina (0.15 mg/mL). Después de la transformación, las bacterias se recuperaron en medio 2X YT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de NaCl).

3.1.5. Plásmidos

El plásmido comercial pQE30 (*Qiagen*) y los plásmidos recombinantes pQMtMarP(SP)-Myc [Jiménez Niebla, Tesis de licenciatura, 2017] y pQHGF301 [Mares *et al.*, 2011], derivados de pQE30, se obtuvieron de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

3.2. Equipo y programas computacionales

La proliferación de células bacterianas se condujo en una incubadora de agitación con ambiente controlado (*Incubator Shaker Series 25* de *New Brunswick Scientific*). Las reacciones enzimáticas se incubaron en un termobloque (VWR) o en una incubadora (*Incubator 132000* de *Boeckel Industries*). El mezclado vaivén se ejecutó en un agitador de plataforma (VWR). La separación celular se realizó en centrifugas de mesa (*Allegra™ X-22R* de *Beckman Coulter*; *Biocentrifuge Fresco* de *Heraeus*, y *MiniSpin® Plus* de *Eppendorf*), considerando el volumen de la muestra. Las reacciones de amplificación se completaron en un equipo *Gradient Thermal Cycler Multigene* (*Labnet International, Inc*). La visualización y digitalización de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio se realizaron con el fotodocumentador *Gel Doc™ EZ Imager* (*Biorad*). Los registros colorimétricos en microplaca se realizaron en un equipo *Microplate Reader 680* (*Biorad*), en tanto los registros en celda se analizaron en un espectrofotómetro

SmartSpect™ Plus (Biorad). Las mediciones de fluorescencia se determinaron en un equipo *Cary Eclipse Fluorescence Spectrophotometer (Agilent)*. El programa de análisis bioestadístico *Graphpad™ Prism® v4.0* se utilizó para el tratamiento de los datos. El programa *SnapGene® Viewer 4.2.9* se empleó para la visualización, análisis y diseño de secuencias nucleotídicas/polipeptídicas. El sistema computacional *UCSF Chimera 1.12 Package* se utilizó para la visualización estructuras 3D de proteínas.

3.3. Protocolos generales

3.3.1. Amplificación de la secuencia GFPc

El *mega-primer* se amplificó en una mezcla de reacción (50 µL en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol) conteniendo: 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM de cada oligonucleótido (GFPPS02F: 5´- CAT TAT CAA CAA AAT ACT CCA ATT GGC GCC AGG TTG GTT GCC TGG AGC TCG AAC CAT TAC CTG TCC ACA CA -3´, y QE_RV: 5´- CGC CAA GCT AGC TTG GAT TCT -3´), ±2 pg de pQHGF301, y 2.5 U de *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min), 10 ciclos de amplificación inicial (94 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 30 seg), 25 ciclos de amplificación prolongada (94 °C durante 20 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 30 seg), y 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto se mantuvo a 12 °C hasta ser retirado del equipo.

El *mega-primer* se utilizó para amplificar GFPc en una mezcla de reacción (50 µL en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol) conteniendo: 0.2 mM de dNTPs, 0.4 µM del oligo QE_FW (5´- CCC TTT CGT CTT CAC CTC GAG -3´), 5 µL del *mega-primer* purificado, ±2 pg de pQHGF301, y 2.5 U de *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min), 10 ciclos de amplificación inicial (94 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 1 min), 25 ciclos de amplificación prolongada (94 °C durante 20 seg, 65 °C durante 20 seg, 72 °C durante 1 min), y 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto se mantuvo a 12 °C hasta ser retirado del equipo.

3.3.2. Construcción del plásmido pQGFC

Los componentes para la ligación: producto de *PCR* (GFPc) y pQE30, se prepararon mediante digestión con 20 U de las endonucleasas BamHI y HindIII (10 µL en solución amortiguadora NEB2 1X, suplementada con BSA 1X) durante 2 h a 37 °C. Para el plásmido, a 1.5 h de reacción se agregó 1 µL de BCIP (fosfatasa alcalina) para reducir la tasa de auto-ligación

La ligación vector-inserto se llevó a cabo en una mezcla de reacción (10 µL en solución amortiguadora 1X para T4 ADN-lig) conteniendo: 7 µL de inserto (GFPc/BamHI-HindIII), 1 µL de vector

(pQE30/BamHI-HindIII defosforilado) y 400 U de T4 ADN-lig. La reacción se completó durante la noche (± 16 h) en refrigeración (± 4 °C). El producto se utilizó para transformar células ER2738 competentes.

3.3.3. Preparación de bacterias competentes

Las células bacterianas competentes se prepararon siguiendo el protocolo estándar de laboratorio [Sambrook, *et al.*, 1989]. La pastilla bacteriana de 1 mL de cultivo joven (DO_{600} de 0.4-0.6) se aisló mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 2 min. Después de dos lavados en frío: (i) 0.5 mL de agua destilada estéril y (ii) 0.5 mL de solución 100 mM de $CaCl_2$ estéril, las células se resuspendieron en 0.1 mL de solución 100 mM de $CaCl_2$ estéril frío. Posterior a 5 min de reposo en hielo, las células se encuentran competentes para transformación mediante choque térmico.

3.3.4. Transformación bacteriana

1-5 μ L de plásmido o ligación (0.1-10 ng) se mezclaron con 0.1 mL de la suspensión de bacterias competentes. Después de 30 min de reposo en hielo, el choque térmico se realizó mediante dos cambios súbitos de temperatura: (i) 1.5 min a 42 °C, seguidos de (ii) 5 min en hielo. De manera inmediata, las células se recuperaron en 1 mL de medio 2X YT y se incubaron a 37 °C durante 1 h. Las transformantes estables se seleccionaron en medio LB sólido suplementado con ampicilina (LB-Amp).

3.3.5. Purificación de ADN plasmídico

El ADN plasmídico se purificó siguiendo el protocolo típico proporcionado por el fabricante del estuche comercial *QIAprep[®] Spin Miniprep Kit* (Qiagen).

3.3.6. Secuenciación automática de ADN

La autenticidad de los genes clonados se verificó mediante secuenciación automática de ADN, utilizando el servicio externo proporcionado por el Instituto de Biotecnología de la UNAM.

3.3.7. Expresión proteica a mini-escala

El cultivo semilla se preparó inoculando 20 μ L de la suspensión bacteriana en 2 mL de medio LB-Amp. La proliferación celular se desarrolló durante la noche (± 16 h), mediante incubación a 30 °C con agitación constante (300 rpm). Los subcultivos para análisis de expresión se prepararon inoculando 20 μ L de cultivo semilla en 2 mL de medio LB-Amp. Después de 2 h de proliferación celular a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción), se añadieron 2 μ L de una solución 1 M de IPTG (inductor, 1 mM final). La producción recombinante se sostuvo durante 4 h adicionales de proliferación celular (fase de inducción). Una vez concluida, se prepararon pastillas celulares a partir de 1 mL del subcultivo, mediante centrifugación (2 min a 10,000 rpm y 10 °C), y se conservaron en congelación hasta su análisis.

3.3.8. Electroforesis en gel de poliacrilamida (*SDS-PAGE*)

Las muestras analíticas se prepararon mezclando 1 volumen de muestra (0.1 mL) con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado en *SDS-PAGE* (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Las muestras se calentaron a 95 °C durante 10 min (desnaturalización térmica). Una alícuota (10-20 µL) se cargó en gel para *SDS-PAGE* al 13.5/15 %. La migración y concentración de proteínas se llevó a cabo durante 15-30 min a 80 V, y la separación durante 60-90 min a 120 V. Una vez concluida, el gel se tiñó durante la noche con solución de *Coomassie* (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie* R-250) y desteñido durante 12-18 h con solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético).

3.3.9. Inmuno-detección (*western blot*)

Después de la separación mediante *SDS-PAGE*, las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, utilizando el sistema *Criterion™ Blotter* (*Biorad*) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Una vez concluida, la membrana se bloqueó durante la noche con solución de bloqueo (5% de leche *Svelty™*; 50 mM de NaCl; 0.05% de *Tween®* 20; 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0). A partir de este punto, la membrana se lavó 3 veces (10 min cada uno) con solución TBST (50 mM de NaCl; 0.05% de *Tween®* 20; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0) después de cada tratamiento. Para el reconocimiento primario, la membrana se trató durante 1 h con una solución 1:5,000 de anticuerpo anti-Myc (diluido en TBST). Para el reconocimiento secundario, la membrana se trató durante 1 h con una solución 1:5,000 del anticuerpo anti-Ratón-AP (diluido en TBST). La inmuno-detección se reveló utilizando un estuche comercial de sustrato para fosfatasa alcalina (*AP Conjugate Substrate Kit* de *Biorad*).

3.3.10. Cuantificación de proteínas mediante micro-Bradford

En una microplaca de 96 pocillos, se prepararon mezclas (50 µL) de concentración conocida de BSA: 0, 10, 20, 30, 40, 50 µg/mL (curva patrón), y diluciones 1:5-1:10 de la proteína de interés (duplicado). La reacción cromogénica se preparó mezclando el contenido de cada pocillo con 0.1 mL del reactivo de Bradford (Sigma). Después de 5 min de incubación a temperatura ambiente (desarrollo de color), los valores de absorbancia a 595 y 450 nm (A_{595} y A_{450}) se registraron usando un lector colorimétrico de microplacas. La concentración de la proteína de interés se determinó a partir de la curva patrón, extrapolando los valores de absorbancia obtenidos para la dilución correspondiente.

3.4. Producción recombinante de MarP-SP a midi-escala

La producción de MarP-SP se realizó en 5 lotes (100 mL) de cultivo bacteriano: *E. coli* SHuffle Express portadora de pQMtMarP(SP)-Myc.

3.4.1. Inducción de la expresión recombinante

El cultivo semilla se preparó inoculando 0.1 mL de la suspensión bacteriana en 4 mL de medio LB-Amp. La proliferación celular se desarrolló durante la noche (± 16 h), mediante incubación a 30 °C con agitación constante (300 rpm). Los subcultivos se prepararon inoculando 2 mL de cultivo semilla en 100 mL de medio LB-Amp. Después de 2 h de proliferación celular a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción), se añadieron 50 μ L de una solución 1 M de IPTG (inductor, 0.5 mM final). La producción recombinante se sostuvo durante 16 h de proliferación celular a 30 °C y 300 rpm (fase de inducción). Una vez concluida, se prepararon pastillas celulares, mediante centrifugación (15 min a 9,500 rpm y 10 °C), y se conservaron en congelación (-20 °C) hasta su análisis.

3.4.2. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas

La pastilla celular se resuspendió en 5 mL del reactivo *Cellytic*[®] *B* (Sigma). Después de 5 min de agitación tipo vórtex, la extracción se facilitó mediante mezclado tipo vaivén durante 15 min. El extracto total (sobrenadante) se aisló mediante 15 min de centrifugación a 9,500 rpm (10 °C). La clarificación del extracto total se realizó mediante 15 min de centrifugación a 13,000 rpm (10 °C). Previo a la purificación, el extracto total (LBST) se mezcló con un volumen de solución NPD (40 mM de imidazol, pH 8.0; 600 mM de NaCl; 40 mM de Tris-HCl, pH 8.0).

3.4.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel

La columna cromatográfica, conteniendo 1 mL de resina del tipo agarosa-NTA-Ni, se equilibró con 5 mL de solución NPW (20 mM de imidazol, pH 8.0; 300 mM de NaCl; 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0). El LBST se cargó a la columna mediante tres pasadas consecutivas. La columna se lavó con 15 mL de solución NPW. La proteína recombinante, etiquetada con un hexámero de histidinas (6xHis), se separó mediante elución con 7 mL de solución NPE (250 mM de imidazol, pH 8.0; 300 mM NaCl; 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Las fracciones de elución (1 mL) con mayor cantidad de la proteína recombinante se identificaron mediante *SDS-PAGE*. Después de mezclar las fracciones de interés, la concentración de la proteína recombinante MarP-SP se cuantificó mediante *micro-Bradford*.

3.4.4. Desalación mediante cromatografía de exclusión molecular

La desalación y reducción de componentes de la solución amortiguadora se realizó mediante una cromatografía de exclusión molecular. La columna de permeación en gel (PD-10) se lavó con 25 mL de una solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0). La proteína recombinante MarP-SP (pura) se cargó en un volumen exacto de 2.5 mL y se recuperó mediante elución con 3.5 mL de la solución 20 mM de Tris-HCl (pH 8.0). La concentración de MarP-SP se determinó mediante *micro-Bradford*.

3.5. Producción recombinante de GFPCC4 a midi-escala

La producción de la variante GFPCC4 realizó en 10 lotes (100 mL) de cultivo bacteriano: *E. coli* ER2738 portadora de pQGFCC4.

3.5.1. Inducción de la expresión recombinante

El cultivo semilla se preparó inoculando 40 µL de la suspensión bacteriana en 2 mL de medio LB-Amp. La proliferación celular se desarrolló durante la noche (± 16 h), mediante incubación a 25 °C con agitación constante (300 rpm). Los subcultivos se prepararon inoculando 1 mL de cultivo semilla en 100 mL de medio LB-Amp. Después de 2 h de proliferación celular a 37 °C y 300 rpm (fase de pre-inducción), se añadieron 50 µL de una solución 1 M de IPTG (inductor, 0.5 mM final). La producción recombinante se sostuvo durante 4 h de proliferación celular a 37 °C y 300 rpm (fase de inducción). Una vez concluida, se prepararon pastillas celulares, mediante centrifugación (15 min a 9,500 rpm y 10 °C), y se conservaron en congelación (-20 °C) hasta su análisis.

3.5.2. Extracción de proteínas totales en condiciones desnaturizantes

La pastilla celular se resuspendió en 5 mL de solución DPU (7.2 M de urea; 300 mM de NaCl; 90 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Después de 5 min de agitación tipo vórtex, la extracción se facilitó mediante mezclado tipo vaivén durante 10 min. El extracto total (sobrenadante) se aisló mediante 15 min de centrifugación a 9,500 rpm (10 °C). La clarificación del extracto total se realizó mediante 15 min de centrifugación a 13,000 rpm (10 °C). Previo a la purificación, el extracto total de proteínas bacterianas obtenidas en condiciones desnaturizantes (LBST-U) se mezcló con un volumen de solución 7.2 M de urea.

3.5.3. Purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel

La columna cromatográfica, conteniendo 0.5 mL de resina del tipo agarosa-NTA-Ni, se equilibró con 2.5 mL de solución DPU. El LBST-U se cargó en la columna mediante tres pasadas consecutivas. La columna se lavó con 7.5 mL de solución DP10 (8 M de urea; 10 mM de imidazol, pH 8.0; 300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0) y 7.5 mL de solución DP20 (2 M de urea; 20 mM de imidazol, pH 8.0; 300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0). La proteína recombinante, etiquetada con hexámero de histidinas (6xHis), se separó mediante elución con 3.5 mL de solución DP250 (2 M de urea; 250 mM de imidazol, pH 8.0; 300 mM de NaCl; 100 mM de Tris-HCl, pH 8.0). Las fracciones de elución (0.5 mL) con mayor cantidad de proteína recombinante se identificaron mediante *SDS-PAGE*. Después de agrupar las fracciones de interés, la concentración de la proteína recombinante GFPCC4 se determinó mediante micro-*Bradford*.

3.6. Evaluación de la actividad proteolítica de MarP-SP

3.6.1. FITC-gelatina como sustrato

La actividad proteolítica de MarP-SP sobre FITC-gelatina (sustrato fluorogénico universal) se valoró en mezclas de reacción (0.2 mL en solución 20 mM de Tris-HCl, pH 8.0) conteniendo: 8 µg/mL del sustrato y diferentes concentraciones de proteasa. La proteólisis se realizó a 37 °C durante 4 h. La reacción se detuvo adicionando 0.05 mL de ácido tricloroacético al 20%. Después de 5 min en hielo, el sustrato no digerido se precipitó mediante 15 min de centrifugación a 13,000 rpm (10 °C). Alícuotas (0.125 mL) del sobrenadante se colocaron en pocillos de una microplaca para fluorescencia y la señal emitida por los péptidos solubles (resultantes de la digestión de FITC-gelatina) se registró en un espectrofluorómetro, usando las longitudes de onda apropiadas para fluoresceína (excitación a 490 nm y emisión a 525 nm).

3.6.2. GFPCC4 como sustrato

La actividad proteolítica de MarP-SP sobre GFPCC4 (sustrato específico) se ensayó en presencia de urea (2 M) bajo dos condiciones diferentes de pH: (i) 7.4, en solución DPBS 1X, y (ii) 4.5, en solución 100 mM de amortiguador citratos-fosfatos. Las mezclas de reacción (0.2 mL) conteniendo: 33 µg de GFPCC4 y diferentes concentraciones de proteasa, se incubaron a 37 °C durante la noche (±16 h). Los productos de digestión se analizaron mediante *SDS-PAGE*.

3.6.3. Ensayos de inhibición

La acción inhibitoria de DTT, PMSF y *cOmplete™ protease inhibitor cocktail* sobre la actividad proteolítica de MarP-SP se determinó mediante ensayos de digestión de GFPCC4. Las reacciones se realizaron en presencia de urea (2 M) bajo dos condiciones diferentes de pH: (i) 7.4, en solución DPBS 1X, y (ii) 4.5, en solución 100 mM de amortiguador acetatos. Las mezclas (0.2 mL) conteniendo: 29.5 µg de GFPCC4, 4 µg de MarP-SP y diferentes concentraciones de inhibidor, individual (DTT a 20 mM; PMSF a 1 mM; *cOmplete™* a 1X), se incubaron a 37 °C durante la noche (±16 h). Los productos de digestión se analizaron mediante *SDS-PAGE*.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Racionalización: GFP como sensor-sustrato para MarP

GFP es una proteína auto-fluorescente que presenta un plegamiento 3D tipo barril β (Figura 1-10). El análisis de topología facilitó la nomenclatura de las hojas β -plegadas (Figura 4-1): desde $\beta 1$ hasta $\beta 11$ [Shahzad, 2018]. La resistencia a proteasas comunes, como tripsina o pronasa, es un rasgo estructural de este polipéptido [Chiang *et al.*, 2001], concediéndole potencial como biosensor para la caracterización y detección de enzimas proteolíticas de interés biomédico, adaptando secuencias del sustrato específico mediante modificación genética [Aoki *et al.*, 2008; Callahan *et al.*, 2010; Askin *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013]. Diversos reportes señalan la existencia de subregiones con mayor susceptibilidad a proteólisis [Chiang *et al.*, 2001; Madan *et al.*, 2016]. De forma específica, la horquilla 3 (*h3*: C48–W57), que une a $\beta 3$ con α , y la horquilla 9 (*h9*: P187–H199), que une a $\beta 9$ con $\beta 10$, sobresalen por su sensibilidad estructural (asociada con el abatimiento parcial o total de la auto-fluorescencia). En consideración a sus bondades estructurales, el presente trabajo se desarrolló con el propósito de generar y utilizar una variante de GFP, portadora de la secuencia ARLVAWSS en una horquilla (p.ej., *h3* o *h9*), como sensor fluorescente y sustrato específico para analizar la actividad proteolítica de la enzima MarP de *M. tuberculosis*.

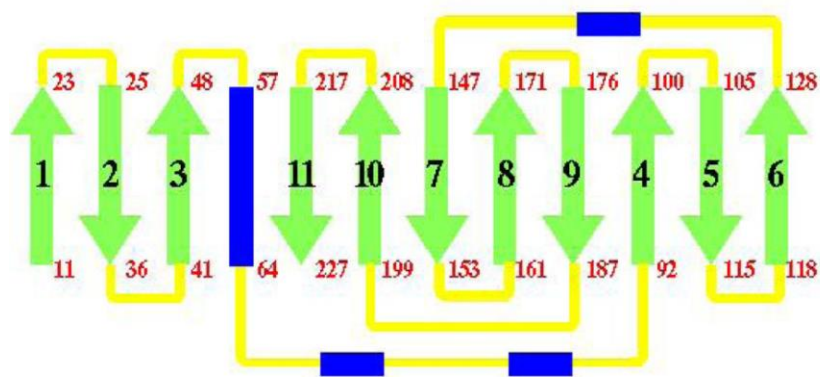


Figura 4-1. Representación de la topología de plegamiento de la proteína verde fluorescente (GFP) de *Aequorea victoria*.

Las hojas β -plegadas se muestran en color verde, las hélices- α en azul y las horquillas en amarillo. La posición en la secuencia donde inicia y finaliza cada componente de la estructura secundaria se indica con números rojos. Tomada y modificada de: Shahzad, 2018.

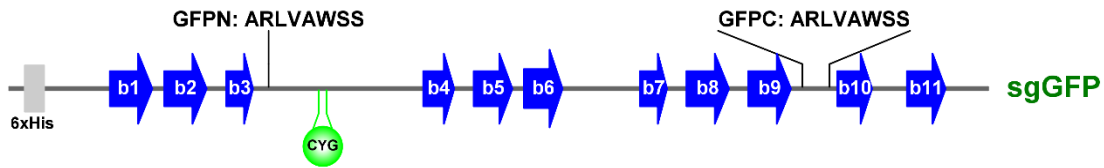


Figura 4-2. Representación de la topología de plegamiento de la GFP recombinante (GFPsg).

Las hojas β -plegadas (b) se muestran en color azul y la etiqueta 6xHis se indica en color gris. La posición relativa del fluoróforo (CYG) y las correspondientes para la inserción (GFPN) y la sustitución (GFPC) se indican con líneas.

4.2. Obtención de pQGFCC4, codificante de la variante GFPC

Como estrategia inicial, se propuso obtener dos variantes de GFP mediante mutagénesis dirigida: una por inserción en *h3* [GFPN] y otra por sustitución de *h9* [GFPC] (Figura 4-2). Para este fin, se diseñaron dos oligonucleótidos específicos, uno para cada variante, que incluyen los codones para el octapéptido ARLVAWSS.

Cabe mencionar que se empleó la secuencia codificante de RipA de *M. tuberculosis* para el diseño del sustrato, incorporando una mutación neutra en favor de la generación de un sitio corte para SacI (funcional como polimorfismo de restricción para la selección de variantes) y la secuencia codificante para la GFP *superglow* (GFPsg) como molde para el diseño del sensor. Cabe señalar que GFPsg es el polipéptido recombinante utilizado para los fines del presente estudio.

La primera reacción de amplificación (*PCR* inicial) se realizó usando los oligonucleótidos sintéticos (específicos para la variante) como iniciadores para la síntesis de *mega-primers*. Enseguida, una segunda amplificación (*PCR* mutagénico) se llevó a cabo utilizando los *mega-primers* correspondientes en combinación con los iniciadores específicos para el vector de clonación (*primers* QE). Para obtener mayor cantidad (en masa) de los productos de interés, se practicó una tercera amplificación (*PCR* enriquecido) empleando sólo *primers* QE. Los fragmentos amplificados, GFPn y GFPc, corresponden al tamaño esperado, ± 1 Kb (Figura 4-3).

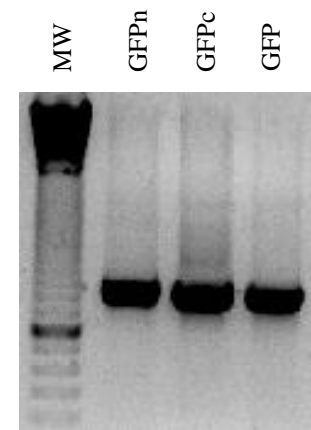


Figura 4-3. Amplificación de los fragmentos GFPn y GFPC.

Análisis de los productos de *PCR* enriquecido mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio. MW, Marcador de 100 pb; GFP, control (± 1 Kb).

El plásmido comercial pQE30, vector para expresión inducida de proteínas recombinantes en el citosol de *E. coli*, sirvió como recipiente para la clonación de GFPn y GFPc mediante inserción direccional en los sitios BamHI y HindIII.

De manera aleatoria, se analizaron 20 clones pQGfN y 13 pQGfC mediante polimorfismos de restricción. Como primer escrutinio, usando BamHI como enzima de linealización, se descartaron 3 clones pQGfN y 2 pQGfC, ya que carecían de inserto.

Las clones portadoras de inserto con la mutación de interés se identificaron mediante polimorfismos de restricción con las enzimas BamHI y SacI para pQGfN, o HindIII y SacI para pQGfC.

El análisis de 4 clones pQGfN (Figura 4-4, carriles NC1–NC4) mostró que ninguna porta el inserto GFPn, ya que no liberaron el fragmento esperado (± 0.55 Kb). Caso contrario, el análisis de 4 clones pQGfC (Figura 4-4, carriles CC1–CC4) reveló que las clones CC2 y CC4 portan el inserto GFPc, ya que ambos liberaron el fragmento esperado (± 0.55 Kb).

De manera poco afortunada, el análisis posterior de las clones pQGfN indicó que sólo una porta el inserto GFPn (Figura 4-5, carril NC16). Por otro lado, con mayor éxito, se identificaron de manera adicional tres clones pQGfC: CC8, CC10 y CC13 (Figura 4-6).

En resumen, se identificaron 6 clones: 1 con plásmido pQGfN y 5 con plásmido pQGfC.

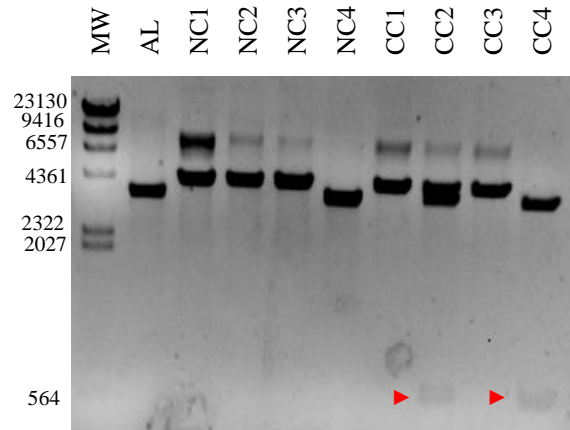


Figura 4-4. Caracterización de 4 clones (C1-C4) de las construcciones pQGfN y pQGfC mediante polimorfismo de restricción.

Análisis de fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio. MW, Marcador λ -HindIII; AL, control de autoligación (▶) producto de digestión con SacI (esperado).

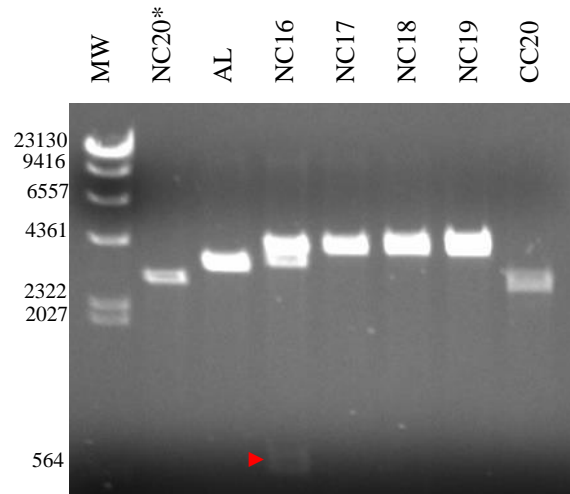


Figura 4-5. Caracterización de 5 clones (C16-C20) de la construcción pQGfN mediante polimorfismo de restricción.

Análisis de fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio. MW, Marcador λ -HindIII; NC20*, control de digestión: NC20 con BamHI; AL, control de autoligación (▶) producto de digestión con SacI (esperado).

De estas, pQGFNC16, pQGFCC2, pQGFCC4 y pQGFCC8 se enviaron a secuenciación de ADN para comprobar su autenticidad.

Como dato destacable, los cultivos que hospedan a pQGFNC16, pQGFCC8 y pQGFCC2 presentan un fenotipo celular fluorescente (notorio a simple vista), a diferencia de pQGFCC4, que permanece con fenotipo silvestre.

Este rasgo bioquímico diferencial generó dos especulaciones, en aras de explicar tal fenotipo: (1) de manera poco probable, pero posible, el alojamiento de dos plásmidos, uno silvestre y uno mutante, en las células con pQGFNC16, pQGFCC8 o pQGFCC2, y (2) contrario a lo esperado, la mutación introducida en GFP perturba la estructura 3D y ocasiona abatimiento de la fluorescencia en las células con pQGFNC16, pQGFCC2 y pQGFCC8.

El resultado de la secuenciación de ADN disipó (de manera parcial) las incertidumbres generadas en torno al evento detectado. Los análisis de secuencia nucleotídica y polipeptídica deducida revelaron que pQGFCC4 es el único plásmido que codifica para una variante de interés: GFPC (a partir de ese momento designada como GFPC4). Por otro lado, los resultados y análisis de la secuencia obtenida para los otros plásmidos (pQGFNC16, pQGFCC2 y pQGFCC8) muestran alteraciones genéticas no deseadas, p.ej., mutaciones indel y corrimiento del marco de lectura, que se atribuyen a rearrreglos del material analizado (de forma posible por recombinación con el cromosoma bacteriano o con otro plásmido). Ante esto, se determinó no utilizarlos y así evitar conclusiones de origen dudoso.

Una característica distintiva de la proteína codificada por el plásmido pQGFCC4 (Figura 4-7) es la ausencia de auto-fluorescencia (visible); es decir, es una variante de GFP no fluorescente. Aunque los ensayos bioinformáticos indicaron que la conformación de barril β permanece estable, la pérdida de auto-fluorescencia se consideró como factible, ya que el análisis fino de las hojas β -plegadas que flanquean a la horquilla modificada (*h9*) determinó que contienen residuos importantes para la maduración del fluoróforo y, por ende, demandan estabilidad estructural.

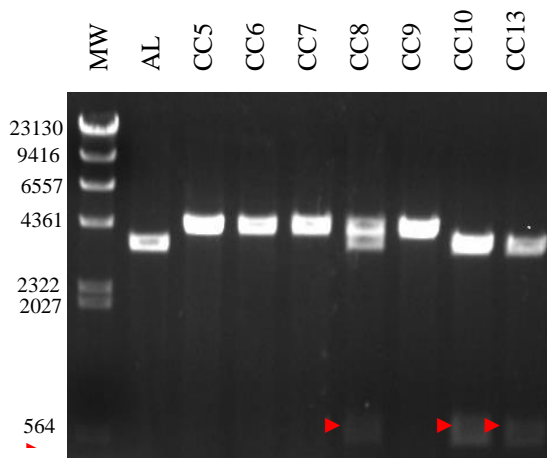


Figura 4-6. Caracterización de 7 clones (C5-C10, C13) de la construcción pQGFC mediante polimorfismo de restricción.

Análisis de fragmentos mediante electroforesis en gel de agarosa (1.5%) teñido con bromuro de etidio. MW, Marcador λ -HindIII; AL, control de autoligación (►) producto de digestión con SacI (esperado).

Contrario a la propuesta inicial, que supuso la generación de un sistema de detección del tipo *switch-off*, los resultados obtenidos obligaron una reorientación de la propuesta: desarrollar un sistema de tipo *switch-on*, suponiendo que la proteólisis de GFPCC4 permita una relajación estructural y recuperación de la auto-fluorescencia.

4.3. Análisis de producción a mini-escala

Con fines confirmatorios, y para establecer el nivel de expresión en condiciones típicas de inducción, se realizaron ensayos de producción recombinante a mini-escala. El análisis de los resultados reveló el patrón esperado (Figura 4-8), caracterizado por la sobreexpresión de una proteína del tamaño calculado para las GFPs (± 28 kDa).

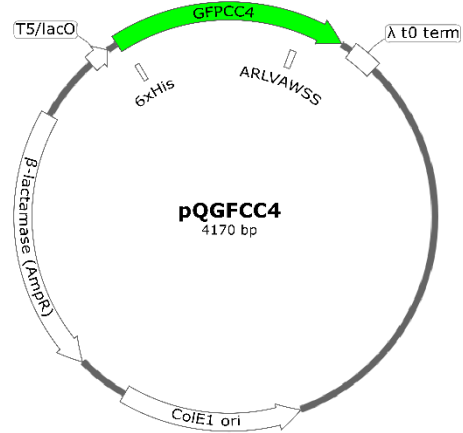


Figura 4-7. Representación gráfica del plásmido recombinante pQGFCC4.

Derivado del vector pQE30 (Qiagen), contiene la secuencia codificante para GFPCC4 [flecha verde] bajo el control del promotor quimérico T5/lacO y del terminador t0 del fago λ . La posición relativa de la etiqueta 6xHis y de la secuencia sustrato para MarP [ARLVAWSS] se indica como cajas blancas. El origen de replicación ColE1 y la secuencia codificante para β -lactamasa (marcador de resistencia a ampicilina) se muestran como flechas blancas.

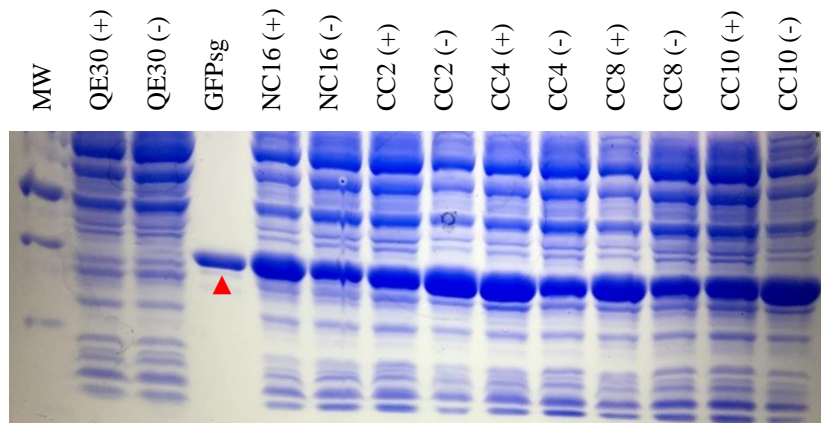


Figura 4-8. Producción recombinante de GFPN (clona NC16) y GFPC (clonas CC2, CC4, CC8 y CC10) a mini-escala, en condiciones típicas de inducción.

Análisis de extractos bacterianos (proteínas totales) mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) teñido con azul de *Coomassie*. MW, Marcador de PM. La condición específica: (+) inducción con 1 mM de IPTG o (-) sin inducción, el control de vector vacío (QE30) y el control interno para el peso molecular esperado (GFPsg), se indican en la parte superior. La punta de flecha (\blacktriangle) señala la movilidad esperada.

4.4. Producción recombinante de GFPCC4

En congruencia con el diseño: GFPCC4 se expresa como proteína recombinante etiquetada con un hexámero de histidinas (en el extremo N-terminal). El primer ensayo de producción se realizó considerando un protocolo típico de expresión proteica a midi-escala y purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel. De manera inesperada, los resultados revelaron que la proteína recombinante es insoluble en condiciones nativas y forma cuerpos de inclusión en el citosol bacteriano. Ante esta situación, se practicó un análisis de solubilidad empleando dos agentes caotrópicos: urea (solución 8 M) y cloruro de guanidinio (reactivo *CellLytic*[®] *IB* de Sigma).

El análisis de los resultados mostró que GFPCC4 se solubiliza en las condiciones desnaturalizantes propiciadas por urea 8 M y por el reactivo *CellLytic*[®] *IB* (Figura 4-9). En consideración al potencial efecto nocivo para la estructura 3D de proteínas, se descartó el empleo de cloruro de guanidinio como sistema de extracción. Ante esto, se propuso mejorar las condiciones de extracción de GFPCC4 de tal manera que mantuviera su estado soluble y, a la vez, que no afectara la estructura y función de la proteína MarP-SP recombinante.

Mediante una búsqueda bibliográfica, se identificó que tripsina (proteasa control) retiene un alto porcentaje de su actividad catalítica en valores de concentración de urea menores a 2 M. Este dato alentó el diseño de un ensayo semicuantitativo de mantenimiento del estado soluble, vía dilución-reducción de la concentración de urea y análisis mediante *SDS-PAGE*. Los resultados revelaron que la proteína recombinante se mantiene soluble hasta la concentración 1.8 M de urea.

Sobre esta base, se implementó un protocolo de extracción y purificación de GFPCC4 en presencia de urea: 8 M para solubilización y 2 M para mantenimiento. Como el ensayo de prueba mostró resultados positivos: la proteína recombinante se mantiene soluble a lo largo del procedimiento (Figura 4-10), se realizaron varias corridas de purificación a midi-escala bajo las condiciones planteadas.

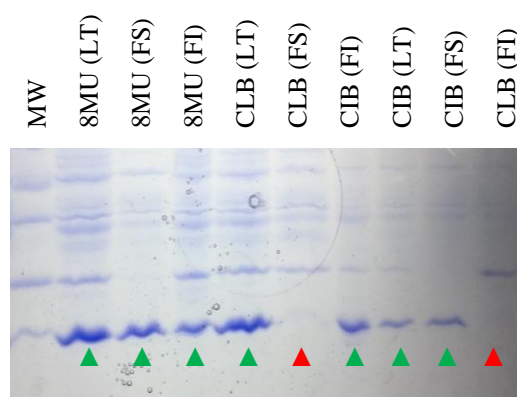


Figura 4-9. Producción recombinante de GFPCC4 a mini-escala y ensayo de solubilidad.

Análisis de extractos proteicos mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) teñido con azul de *Coomassie*. MW, Marcador de PM de proteínas. La condición de solubilidad específica: (8MU) urea a 8 M, (CLB) *CellLytic*[®] *B* y (CIB) *CellLytic*[®] *IB*, y la fracción analítica: (LT) total, (FS) soluble e (FI) insoluble, se indican en la parte superior. Las puntas de flecha señalan: (▲) soluble o (▲) insoluble.

4.5. Producción recombinante de MarP-SP

El plásmido pQMtMarP(SP)-Myc codifica MarP-SP etiquetada con un hexámero de histidinas (N-terminal) y el epítipo c-Myc (C-terminal). En atención a la importancia del enlace disulfuro para la actividad proteolítica *in vitro* de MarP-SP, el plásmido se transformó en células de *E. coli* SHuffle Express. Esta cepa expresa constitutivamente a la oxidorreductasa DsbC, la cual, en conjunto con las condiciones fisiológicas del citosol, cataliza la formación de enlaces disulfuro en polipéptidos nacientes.

Los resultados obtenidos mediante ensayos de expresión a mini-escala (procedimiento típico), extracción en condiciones nativas (*CellLytic*[®] B) y análisis de proteínas (*SDS-PAGE* y *western blot*) mostraron que la proteína recombinante se produce en niveles moderados. Además, revelaron la presencia de fragmentos con peso molecular parecido al esperado en caso de auto-proteólisis. Aunque no se descartó la posible acción de proteasas bacterianas, se calificó como el primer indicio de actividad hidrolítica de MarP-SP.

Con esta base, se realizaron varias corridas de producción a midi-escala, en condiciones nativas, siguiendo los procedimientos típicos de inducción de la expresión y purificación mediante dos procesos cromatográficos consecutivos: afinidad a níquel (Figura 4-11) y exclusión molecular.

4.6. MarP-SP exhibe actividad proteolítica sobre FITC-gelatina

De manera inicial, la actividad enzimática de la proteína MarP-SP recombinante se valoró mediante un ensayo de actividad proteolítica sobre el sustrato fluorogénico FITC-gelatina. Como testigo de la

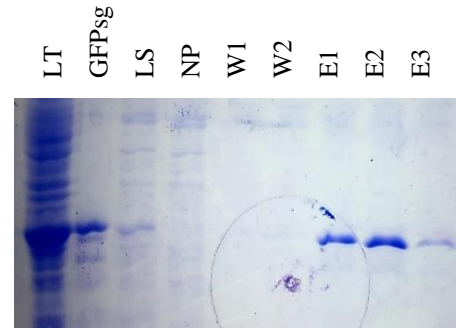


Figura 4-10. Purificación de GFPCC4 mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Análisis de fracciones mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) teñido con azul de *Coomassie*. Carriles: LT, lisado total; GFPsg, control; LS, lisado soluble en 8 M de urea; NP, fracción no pegada; W1 y W2, lavados en 2 M de urea; E1-E3, eluciones en 2 M de urea.

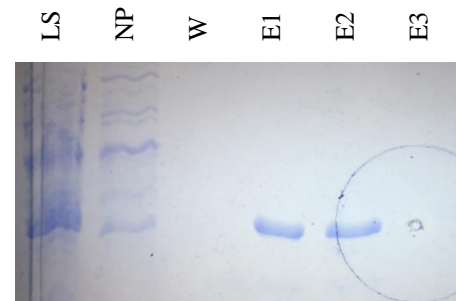


Figura 4-11. Purificación de MarP-SP mediante cromatografía de afinidad a níquel.

Análisis de fracciones mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) teñido con azul de *Coomassie*. Carriles: LS, lisado soluble total; NP, fracción no pegada; W, lavado; E1-E3, eluciones.

reacción (proteasa control) se utilizó a tripsina. La gelatina acoplada a isotiocianato de fluoresceína (FITC-gelatina) funciona como sustrato universal en ensayos fluorométricos de actividad proteasa.

La reacción enzimática se desarrolló en un ambiente alcalino (Tris-HCl, pH 8.0) durante 4 h a 37 °C. La enzima y el sustrato no digerido se precipitaron por la acción del ácido tricloroacético (TCA a 4%). Este tratamiento detiene la reacción y aísla los FITC-péptidos solubles (sobrenadante). El análisis de los resultados de fluorimetría corroboró que la proteína MarP-SP recombinante es una enzima activa (Figura 4-12).

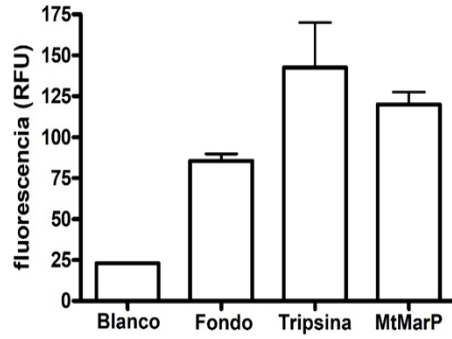


Figura 4-12. Actividad proteolítica de MarP-SP recombinante sobre FITC-gelatina.

Ensayo en condiciones alcalinas (pH 8.0), 4 h a 37 °C. FITC-gelatina a 8 µg/mL, Tripsina a 10 µg/mL, MarP-SP a 20 µg/mL. Fluorescencia: 490 nm (excitación) y 525 nm (emisión). Media y D.E. de tres experimentos independientes.

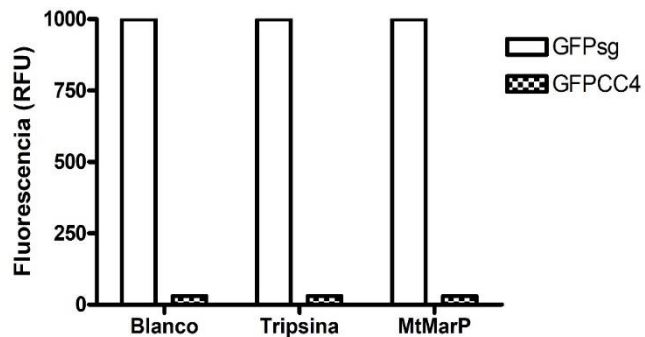
A la luz del conocimiento generado, se consideró adecuado realizar ensayos empleando a GFPCC4 como sustrato específico.

4.7. MarP-SP exhibe actividad proteolítica sobre GFPCC4

La actividad proteolítica de MarP-SP sobre GFPsg y GFPCC4, utilizando a tripsina como testigo, se analizó de manera inicial mediante fluorimetría. La reacción se incubó a 37 °C durante la noche (± 16 h) en un ambiente alcalino (pH 7.4). Los resultados indicaron que GFPCC4 no emite señal fluorescente en los parámetros fluorométricos usados para GFPsg (Figura 4-13), sugiriendo que la mutación por sustitución en la horquilla *h9* perturba la estructura de la subregión $\beta 9$ - $\beta 10$ y afecta la maduración del fluoróforo. Además, de forma no advertida, se prevé una limitación operacional para el desarrollo del sistema de detección

Figura 4-13. Actividad proteolítica (pH 7.4) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis fluorométrico).

Ensayo en condiciones alcalinas, ± 16 h a 37 °C. GFPCC4 y GFPsg a 20 µg/mL, Tripsina a 10 µg/mL, MarP-SP a 20 µg/mL. Fluorescencia: 475 nm (excitación) y 510 nm (emisión). Datos de un experimento independiente.



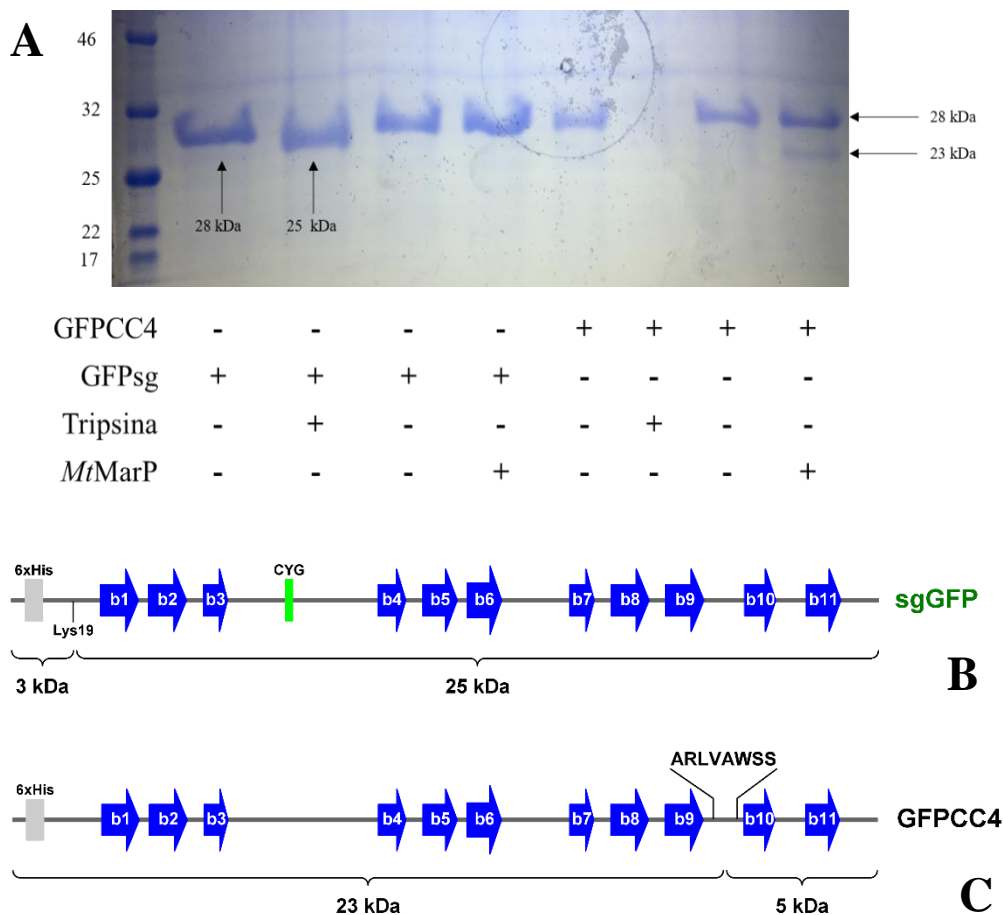


Figura 4-14. Actividad proteolítica (pH 7.4) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis electroforético).

Ensayo en condiciones alcalinas, ± 16 h a 37 °C. GFPCC4 y GFPsg a 20 $\mu\text{g/mL}$, Tripsina a 10 $\mu\text{g/mL}$, MarP-SP a 20 $\mu\text{g/mL}$. (A) Análisis de fragmentos de digestión mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (13.5%) teñido con azul de *Coomassie*. El marcador de PM de proteínas se muestra en la parte izquierda. Las condiciones de cada reacción se indican en la parte inferior. Los fragmentos con tallas moleculares de interés están señalados con flechas. (B) Los fragmentos de GFPsg obtenidos de la supuesta digestión con tripsina se indican en la parte inferior. (C) Los fragmentos esperados de la acción proteolítica de MarP-SP sobre GFPCC4 se muestran en la parte inferior.

propuesto (*switch-on*), ya que la reacción GFPCC4/MarP-SP no emitió señal. Por otro lado, se observó que la digestión con tripsina no afecta la auto-fluorescencia de GFPsg, lo que corrobora la supuesta resistencia a proteólisis.

De manera paralela, se analizó el corte proteolítico mediante SDS-PAGE (Figura 4-14A). Tal como se esperaba, GFPsg mostró el perfil de resistencia a MarP-SP, preservando su peso molecular. Caso contrario, presentó una reducción en su talla molecular por acción hidrolítica de tripsina, perdiendo ± 3 kDa. Este resultado se aclaró mediante un análisis bioinformático, que predijo un corte en el enlace peptídico

posterior al residuo Lys19 (Figura 4-14B), el cual se ubica en una subregión desordenada (de fácil acceso para la proteasa) y está alejado del barril β . Con esto, es factible suponer que la remoción de tal segmento N-terminal no afecta la maduración del fluoróforo. Además, es conveniente destacar que la reacción se llevó a cabo en presencia de urea (2 M), condición que favorece estados desnaturalizados en subregiones de inestabilidad estructural. Por otro lado, de manera sorprendente, GFPCC4 exhibe una alta sensibilidad a proteólisis mediada por tripsina, sugestivo de un estado desnaturalizado que permite su degradación total. Sin embargo, la digestión con MarP-SP presentó un patrón alentador: un fragmento de 23 kDa, indicativo de la remoción de un segmento de ± 5 kDa, consistente con el tamaño esperado para el corte específico de la secuencia sustrato (Figura 4-14C). Es importante señalar que MarP-SP mostró actividad proteolítica limitada.

Con base en la información obtenida, se examinó la actividad proteolítica de MarP-SP sobre GFPsg y GFPCC4 en condiciones de pH ácidas (5.5 ± 0.5). Utilizando a tripsina como testigo, la reacción se incubó a 37 °C durante la noche (± 16 h). Los resultados se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 4-15). Los resultados revelaron que GFPsg pierde su resistencia intrínseca a tripsina, mostrando un patrón de degradación parcial. En contraste, exhibe resistencia ante MarP-SP, lo que sugiere una especificidad de sustrato. Por otro lado, prevalece la alta sensibilidad de GFPCC4 a proteólisis catalizada por tripsina (degradación total). Entretanto, el corte parcial, pronunciado y específico, mediado por MarP-SP, valida la autenticidad del sustrato diseñado en el presente estudio.

4.8. Inhibición de la actividad proteolítica de MarP-SP

Por último, la actividad proteolítica de MarP-SP sobre GFPCC4 se examinó en ausencia y presencia de posibles inhibidores, en dos condiciones de pH (ácidas: 4.5; alcalinas: 7.4). Las reacciones se incubaron a 37 °C durante la noche (± 16 h) y se analizaron mediante SDS-PAGE (Figura 4-16). De manera global, los resultados muestran mejor eficiencia enzimática en condiciones ácidas. Aunque PMSF (inhibidor específico de enzimas serina proteasas) provocó precipitación de GFPCC4 en ambas condiciones de pH, es posible apreciar inhibición enzimática en condiciones ácidas. Por otro lado, el agente reductor (DTT) indujo inhibición total, en ambas condiciones de pH, lo cual comprueba la dependencia funcional de MarP-SP al enlace disulfuro Cys214-Cys395. De manera adicional, se evaluó el efecto de la mezcla comercial de

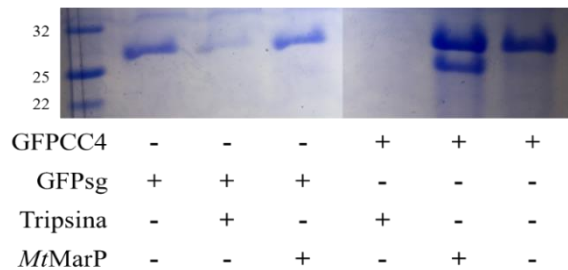


Figura 4-15. Actividad proteolítica (pH 5.5 ± 0.5) de MarP-SP sobre GFPCC4 (análisis electroforético).

Ensayo en condiciones ácidas, ± 16 h a 37 °C. Análisis de fragmentos de digestión mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (15%) teñido con azul de *Coomassie*. El marcador de PM de proteínas se muestra en la parte izquierda. Las condiciones de cada reacción se indican en la parte inferior.

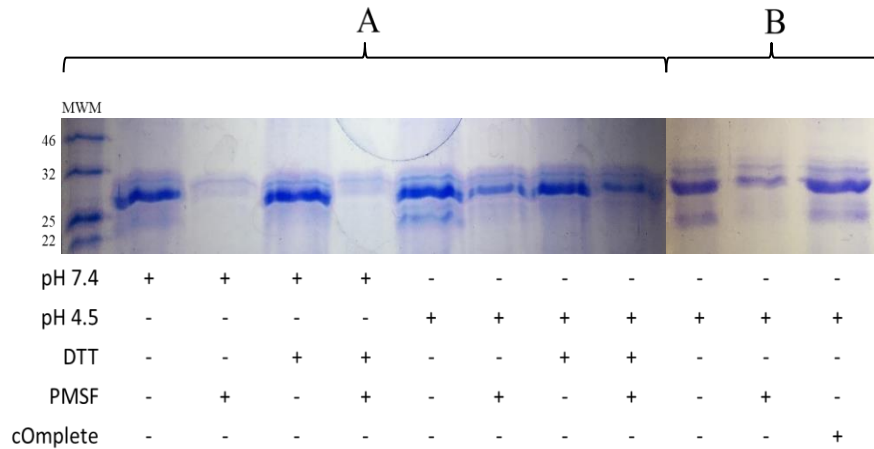


Figura 4-16. Inhibición de la actividad proteolítica de MarP-SP (análisis electroforético).

Ensayo a 37 °C durante ± 16 h. Análisis de fragmentos de digestión mediante electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida (15%) teñido con azul de *Coomassie*. El marcador de PM de proteínas se muestra en la parte izquierda. Las condiciones de cada reacción se indican en la parte inferior.

inhibidores de proteasas *cOmplete*TM sobre la actividad de MarP-SP. Inesperadamente, no se observó inhibición, a pesar de la presencia de PMSF en la mezcla, resultado que puede ser explicado por la presencia de concentraciones subóptimas del inhibidor, lo cual no se descartó.

En conjunto, los resultados muestran que GFPCC4 representa un sustrato específico para la caracterización bioquímica de la enzima MarP de *M. tuberculosis*. Además de la determinación de parámetros cinéticos, un ensayo optimizado será de gran utilidad para la búsqueda, diseño y desarrollo de inhibidores de la actividad proteolítica con potencial como agentes terapéuticos anti-TB. Además, se vislumbra la posibilidad de evaluar la hipótesis que postula a MarP como un probable sustrato de la oxidoreductasa DsbA (disulfuro oxidasa) de *M. tuberculosis*, la cual, al igual que MarP, fue identificada y caracterizada recientemente como un buen blanco farmacológico anti-TB. Más aún, existe la posibilidad de emplear a GFPCC4 como un biosensor para la detección de la micobacteria en muestras clínicas.

No obstante, el desarrollo de tales propuestas demanda que la hidrolisis del sustrato sea valorada de forma cuantitativa. Por tal motivo, se requieren esfuerzos experimentales adicionales, por ejemplo, la obtención de GFPCC4 correctamente plegada y preferentemente fluorescente. Para este fin, se proponen las siguientes estrategias: (1) co-expresión *in vivo* de chaperonas moleculares, (2) utilización de agentes promotores del plegamiento *in vitro*, y (3) optimización de las condiciones de expresión, extracción y purificación. Por otro lado, como hecho no previsto, se observó que *E. coli* BL21(DE3) transformada con pQGFCC4 presentan colonias con fenotipo fluorescente después de ± 2 meses de mantenimiento en

refrigeración (4-5 °C), lo que sugiere que el plegamiento de GFPCC4 y la maduración del fluoróforo dependen de la temperatura.

5. CONCLUSIONES

El plásmido recombinante pQGFCC4, que porta la secuencia codificante para la proteína GFPCC4 en fase con la etiqueta de hexahistidinas (6xHis) N-terminal, se obtuvo mediante una estrategia de mutación dirigida utilizando *mega-primers* seguida de clonación molecular en el vector comercial pQE30.

En condiciones típicas de inducción, la proteína GFPCC4 se expresa de forma adecuada en *E. coli* ER2738; sin embargo, muestra insolubilidad y ausencia de auto-fluorescencia en condiciones nativas de extracción, lo cual sugiere un plegamiento no adecuado y una restricción estructural que impide la maduración del fluoróforo.

La proteína GFPCC4 se aísla de manera soluble, pero no fluorescente, en condiciones desnaturizantes moderadas, en urea 2 M. Esta condición no afecta la purificación mediante cromatografía de afinidad a níquel, por lo que se logró obtener en niveles de pureza mayores a 90%.

La proteína MarP-SP se expresa de forma soluble y activa en el citosol de *E. coli* SHuffle Express portadora del plásmido pQMtMarP(SP)-Myc. La proteína MarP-SP se obtuvo empleando protocolos típicos de expresión, extracción y purificación en condiciones nativas.

La proteína MarP-SP exhibe actividad proteolítica sobre GFPCC4, tanto en condiciones ácidas (pH 4.5) como alcalinas (pH 7.4), en presencia de urea a 2 M, una concentración moderada de un agente desnaturizante.

La proteína GFPCC4, generada en el presente estudio, tiene potencial como sustrato específico para la caracterización bioquímica de la proteína MarP de *M. tuberculosis*, tal como lo muestran los ensayos de actividad proteolítica e inhibición enzimática.

Ante esto, se vislumbra el desarrollo de un bioensayo fluorométrico útil para la búsqueda, identificación o escrutinio de inhibidores de la actividad enzimática de MarP, como agentes farmacológicos con potencial terapéutico anti-TB.

6. REFERENCIAS

- Ahmad, S. (2011). Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Clinical and Developmental Immunology*, 2011, 814943.
- Aoki, T., Tsuchida, S., Yahara, T., & Hamaue, N. (2008). Novel assays for proteases using green fluorescent protein-tagged substrate immobilized on a membrane disk. *Analytical Biochemistry*, 378(2), 132-137.
- Askin, S. P., Morin, I., & Schaeffer, P. M. (2011). Development of a protease activity assay using heat-sensitive Tus-GFP fusion protein substrates. *Analytical Biochemistry*, 415(2), 126-133.
- Bai, G., & Pfaff, S. L. (2011). Protease regulation: the Yin and Yang of neural development and disease. *Neuron*, 72(1), 9-21.
- Biswas, T., Small, J., Vandal, O., Odaira, T., Deng, H., Ehrt, S., & Tsodikov, O. V. (2010). Structural insight into serine protease Rv3671c that protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress. *Structure*, 18(10), 1353-1363.
- Botella, H., Vaubourgeix, J., Lee, M. H., Song, N., Xu, W., Makinoshima, H., *et al.* (2017). *Mycobacterium tuberculosis* protease MarP activates a peptidoglycan hydrolase during acid stress. *The EMBO Journal*, 36(4), 536-548.
- Böth, D., Schneider, G., & Schnell, R. (2011). Peptidoglycan remodeling in *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of structures and catalytic activities of RipA and RipB. *Journal of Molecular Biology*, 413(1), 247-260.
- Callahan, B. P., Stanger, M. J., & Belfort, M. (2010). Cut and glow: Protease activation of split green fluorescent protein. *Chembiochem*, 11(16), 2259.
- Cambier, C. J., Falkow, S., & Ramakrishnan, L. (2014). Host evasion and exploitation schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 159(7), 1497-1509.
- Champion, P. A. D., & Cox, J. S. (2007). Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cellular microbiology*, 9(6), 1376-1384.
- Chen, Y., Ding, F., Nie, H., Serohijos, A. W., Sharma, S., Wilcox, K. C., *et al.* (2008). Protein folding: then and now. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 469(1), 4-19.
- Chiang, C. F., Okou, D. T., Griffin, T. B., Verret, C. R., & Williams, M. N. (2001). Green fluorescent protein rendered susceptible to proteolysis: positions for protease-sensitive insertions. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 394(2), 229-235.
- Cooper, G. M., Hausman, R. E., & Hausman, R. E. (2000). *The Cell: A Molecular Approach* (2nd Edition). Washington, DC: ASM press.
- Culp, E., & Wright, G. D. (2017). Bacterial proteases, untapped antimicrobial drug targets. *The Journal of Antibiotics*, 70(4), 366.
- Elkington, P. T., & Friedland, J. S. (2015). Permutations of time and place in tuberculosis. *The Lancet infectious diseases*, 15(11), 1357-1360.
- Feldman, D. E., & Frydman, J. (2000). Protein folding *in vivo*: the importance of molecular chaperones. *Current Opinion in Structural Biology*, 10(1), 26-33.
- Glickman, M. S., & Jacobs, W. R. (2001). Microbial pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: dawn of a discipline. *Cell*, 104(4), 477-485.
- Haggie, P. M., & Verkman, A. S. (2005). GFP sensors. In *Advanced Concepts in Fluorescence Sensing* (pp. 21-40). Springer, Boston, MA.
- Hedstrom, L. (2002). Serine protease mechanism and specificity. *Chemical Reviews*, 102(12), 4501-4524.
- Houben, E. N., Korotkov, K. V., & Bitter, W. (2014). Take five—Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research*, 1843(8), 1707-1716.
- Jiménez Niebla, Jorge Luis. Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en el periplasma de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Abril de 2017.
- Lange, C., Abubakar, I., Alffenaar, J. W. C., Bothamley, G., Caminero, J. A., Carvalho, A. C. C., *et al.* (2014). Management of patients with multidrug-resistant/extensively drug-resistant tuberculosis in Europe: a TBNET consensus statement. *The European Respiratory Journal*, 44(1), 23-63.
- Levitte, S., Adams, K. N., Berg, R. D., Cosma, C. L., Urdahl, K. B., & Ramakrishnan, L. (2016). Mycobacterial acid tolerance enables phagolysosomal survival and establishment of tuberculous infection *in vivo*. *Cell Host & Microbe*, 20(2), 250-258.

- Liu, S. S., Wei, X., Dong, X., Xu, L., Liu, J., & Jiang, B. (2015). Structural plasticity of green fluorescent protein to amino acid deletions and fluorescence rescue by folding-enhancing mutations. *BMC Biochemistry*, 16(1), 17.
- López-Otín, C., & Bond, J. S. (2008). Proteases: multifunctional enzymes in life and disease. *Journal of Biological Chemistry*, 283(45), 30433-30437.
- Madan, B., Thangappan, J., & Lee, S. G. (2016). Engineering a beta-turn in green fluorescent protein to a foreign loop. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 33, 330-335.
- Mares, R. E., Meléndez-López, S. G., & Ramos, M. A. (2011). Acid-denatured Green Fluorescent Protein (GFP) as model substrate to study the chaperone activity of protein disulfide isomerase. *International Journal of Molecular Sciences*, 12(7), 4625-4636.
- Martinelli, D. J., & Pavelka, M. S. (2016). The RipA and RipB peptidoglycan endopeptidases are individually nonessential to *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 198(9), 1464-1475.
- Pettersen, E. F., Goddard, T. D., Huang, C. C., Couch, G. S., Greenblatt, D. M., Meng, E. C., & Ferrin, T. E. (2004). UCSF Chimera—a visualization system for exploratory research and analysis. *Journal of Computational Chemistry*, 25(13), 1605-1612.
- Phan, T. H., & Houben, E. N. (2018). Bacterial secretion chaperones: the mycobacterial type VII case. *FEMS Microbiology Letters*, 365(18), fny197.
- Ribeiro-Guimarães, M. L., & Pessolani, M. C. V. (2007). Comparative genomics of mycobacterial proteases. *Microbial Pathogenesis*, 43(5-6), 173-178.
- Ruggiero, A., Marasco, D., Squeglia, F., Soldini, S., Pedone, E., Pedone, C., & Berisio, R. (2010). Structure and functional regulation of RipA, a mycobacterial enzyme essential for daughter cell separation. *Structure*, 18(9), 1184-1190.
- Ruiz-Perez, F., & Nataro, J. P. (2014). Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(5), 745-770.
- Sabate, R., De Groot, N. S., & Ventura, S. (2010). Protein folding and aggregation in bacteria. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 67(16), 2695-2715.
- Salgame, P. (2011). MMPs in tuberculosis: granuloma creators and tissue destroyers. *The Journal of Clinical Investigation*, 121(5), 1686-1688.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., & Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 3rd Edition. CSH Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1989.
- Sanner, M. F., Olson, A. J., & Spehner, J. C. (1996). Reduced surface: an efficient way to compute molecular surfaces. *Biopolymers*, 38(3), 305-320.
- Shahzad, M. A. (2018). Translocation of structured biomolecule through a vibrating nanopore. *bioRxiv*, 296780.
- Small, J. L., O'Donoghue, A. J., Boritsch, E. C., Tsodikov, O. V., Knudsen, G. M., Vandal, O., *et al.* (2013). Substrate specificity of MarP, a periplasmic protease required for resistance to acid and oxidative stress in *Mycobacterium tuberculosis*. *Journal of Biological Chemistry*, 288(18), 12489-12499.
- Smith, I. (2003). *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(3), 463-496.
- Steiner, E. M., Lyngsø, J., Guy, J. E., Bourenkov, G., Lindqvist, Y., Schneider, T. R., *et al.* (2018). The structure of the N-terminal module of the cell wall hydrolase RipA and its role in regulating catalytic activity. *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 86(9), 912-923.
- Vandal, O. H., Pierini, L. M., Schnappinger, D., Nathan, C. F., & Ehrt, S. (2008). A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*, 14(8), 849.
- Władyka, B., & Pustelny, K. (2008). Regulation of bacterial protease activity. *Cellular & molecular biology letters*, 13(2), 212.
- Wu, P., Nicholls, S. B., & Hardy, J. A. (2013). A tunable, modular approach to fluorescent protease-activated reporters. *Biophysical Journal*, 104(7), 1605-1614.