



UNIVERSIDAD  
DE LA REPÚBLICA  
URUGUAY



---

**Tesis de grado**  
**Licenciatura en Bioquímica**

***Modulación de la  
maduración del  
fagosoma por una  
quinasa de  
Mycobacterium  
tuberculosis***

**María Josefina Peña Mosca**

**Orientador: María del Rosario Durán Muñoz**

**Co-orientador: Magdalena Gil Tarán**

**Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas**

**Institut Pasteur de Montevideo**

**Octubre de 2015, Montevideo, Uruguay**



## I. PÁGINA DE APROBACIÓN

FACULTAD DE CIENCIAS

El tribunal docente integrado por los abajo firmantes aprueba la Tesis de Investigación:

Título

.....  
.....

Autor

.....  
.....

Tutor

.....

Carrera

.....

Puntaje

.....

Tribunal

Profesor.....

Fecha.....

PÁGINA DE APROBACIÓN



## II. AGRADECIMIENTOS

Quiero expresar mi agradecimiento a quienes de una u otra forma colaboraron conmigo en la realización de este trabajo:

- A Rosario por aceptar ser mi orientadora de tesis.
- A Analía y Maggie, mis co-tutoras, por contestarme inagotables preguntas, por su tiempo y dedicación a lo largo de todo el proceso.
- Quiero agradecer especialmente a Leonel, “el Coco” por sus conocimientos en fluorescencia y microscopía confocal y el tiempo dedicado.
- A todos mis compañeros de la UByPA por su buena onda y buena disposición para ayudar o dar un consejo.
- A Mario Señorale por acceder a la corrección de este trabajo.
- Agradezco también el apoyo financiero brindado por la ANII, mediante una beca de iniciación a la investigación.
- A mi familia y amigos por estar siempre.



### III. TABLA DE CONTENIDO

I. PÁGINA DE APROBACIÓN .....	ii
II. AGRADECIMIENTOS .....	iii
III. TABLA DE CONTENIDO.....	iv
IV. ABREVIATURAS.....	vii
V. RESUMEN .....	viii
1. Introducción .....	1
A. Tuberculosis .....	1
1. Forma de transmisión de la tuberculosis .....	1
2. Prevención de la tuberculosis.....	6
3. Tratamiento de la tuberculosis.....	7
B. Fagocitosis y biogénesis del fagolisosoma .....	10
1. Etapas de la fagocitosis .....	10
2. Mecanismo de maduración fagosomal .....	12
3. Bloqueo de la maduración de los fagosomas por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	16
C. Sistemas de fosforilación de proteínas en bacterias.....	17
1. Sistemas de fosforilación de dos componentes.....	17
2. Sistemas de fosforilación de tipo eucariota.....	19
D. Sistemas de fosforilación en <i>M. tuberculosis</i> .....	20
E. PknG.....	22
1. Importancia de PknG .....	22
2. Estructura de PknG .....	27
3. Inhibidores de PknG .....	30
F. Métodos para estudiar la inhibición de la maduración del fagosoma por PknG .....	32
1. Análisis proteómico de fagosomas aislados por espectrometría de masa .....	33
2. Microscopía de fluorescencia con LB y FITC-dextrano.....	41
3. Microscopía confocal con sondas fluorescentes LAURDAN y pHrodo® .....	43



VI. Objetivos .....	48
A.    Objetivo general.....	48
B.    Objetivos específicos.....	48
VII. Materiales y métodos .....	49
A.    Reactivos .....	49
B.    Métodos.....	50
1.    Producción y purificación de proteínas recombinantes.....	50
2.    Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). .....	54
3.    Ensayo colorimétrico de Bradford.....	55
4.    Preparación de la muestra para análisis por espectrometría de masa .....	56
5.    Espectrometría de masa.....	57
6.    Búsqueda en base de datos e identificación de las proteínas recombinantes.....	58
7.    Ensayos de fosforilación <i>in vitro</i> .....	58
8.    Inhibición de PknG por OA-NO <sub>2</sub> .....	59
9.    Cultivo de una línea celular de macrófagos (J774A.1).....	60
10.    Internalización de PknG en macrófagos.....	60
11.    Aislamiento de fagosomas y análisis de las proteínas identificadas .....	63
12.    Microscopía de epifluorescencia utilizando FITC-dextrano .....	69
13.    Microscopía confocal utilizando sondas fluorescentes. ....	72
VIII. Resultados .....	77
A.    Producción y purificación de proteínas recombinantes.....	77
B.    Inhibición de la actividad quinasa de PknG por tratamiento con OA-NO <sub>2</sub> .....	90
C.    Puesta a punto de una metodología para la evaluación de la maduración del fagosoma y el efecto de PknG en este proceso.....	92
1.    Aislamiento de fagosomas y análisis de las proteínas identificadas. ....	94
2.    Microscopía de epifluorescencia utilizando FITC-dextrano.....	101
3.    Microscopía confocal utilizando pHrodo <sup>®</sup> y LAURDAN.....	104
IX. Discusión de resultados .....	110



X. Conclusiones y perspectivas .....	127
XI. Bibliografía .....	129
XII. Material complementario .....	140
ANEXO A. Proteoma de fagosomas conteniendo LB.....	140



## IV. ABREVIATURAS

Abreviatura	Nombre completo
<b>CHCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinámico
<b>V-ATPasa</b>	ATPasa vacuolar
<b>DAPI</b>	4',6' diamidio-2-fenilindol
<b>DMEM</b>	Dulbecco's modified Eagle's medium
<b>FITC-dextrano</b>	Isotiocianato de fluoresceína conjugada a dextrano
<b>GEF</b>	<i>Guanine nucleotide exchange factor</i>
<b>GSH</b>	Glutación
<b>HK</b>	Histidina quinasa
<b>IPTG</b>	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido
<b>LAM</b>	Lipoarabinomanano
<b>LAURDAN</b>	6-dodecanoil-N,N-dimetil-2-naftilamina
<b>LB</b>	Partículas de látex
<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>MALDI-TOF MS</b>	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry</i>
<b>NO<sub>2</sub>-FA</b>	Ácidos grasos nitrados
<b>OA</b>	Ácido 9-octadecanoico
<b>OA-NO<sub>2</sub></b>	Mezcla de ácido 9- y 10-nitro-octadeca-9- <i>cis</i> -enoico
<b>FHA</b>	Dominio <i>forkhead-associated</i>
<b>PBS</b>	Tampón fosfato salino
<b>PI(3,4,5)P3</b>	Fosfatidilinositol-3-fosfato
<b>PI(4,5)P2</b>	Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato
<b>Rbx</b>	Rubredoxina
<b>RILP</b>	<i>Rab7-interacting lysosomal protein</i>
<b>RR</b>	Regulador de respuesta
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato sódico
<b>STPKs</b>	Quinasa de proteínas en Ser y Thr
<b>TEV</b>	Proteasa del virus del mosaico del tabaco
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TPR</b>	Repetidos de tetratricopéptidos



## V. RESUMEN

Un elemento fundamental en la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* es su capacidad de inhibir la maduración fagolisosomal y así sobrevivir en los macrófagos del hospedero. Una quinasa de proteínas en Ser y Thr de *M. tuberculosis* denominada PknG ha adquirido gran relevancia como uno de los factores que participa en este proceso. El objetivo del presente trabajo es explorar la utilidad de nuevas herramientas metodológicas para evaluar la maduración del fagosoma y su modulación por PknG, en un modelo de fagocitosis de partículas de látex utilizando macrófagos murinos. Para ello se evaluaron modelos proteómicos y de microscopía de epifluorescencia y confocal utilizando diferentes sondas fluorescentes.

Se logró poner a punto un método para estudiar el proceso de maduración fagosomal *in vivo* mediante microscopía confocal utilizando las sondas fluorescentes LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup>. Esta metodología es más apropiada que la estrategia previamente utilizada en el laboratorio que emplea dextrano-FITC, ya que permite evaluar la maduración fagosomal en forma cuantitativa y objetiva. Los resultados obtenidos usando esta estrategia son coherentes con resultados previos obtenidos con otras metodologías.

## RESUMEN



Por último, se evaluó de forma preliminar la maduración fagolisosomal utilizando un inhibidor de PknG. Se utilizó un ácido graso nitrado (OA-NO<sub>2</sub>), que vía una reacción de adición de Michael modifica cisteínas críticas del dominio rubredoxina de PknG. Nuestros resultados preliminares indican que la actividad quinasa de PknG no es fundamental para la inhibición de la maduración del fagosoma aunque este resultado deber ser validado.

**Palabras clave:** tuberculosis; PknG; macrófago; maduración del fagosoma; microscopía de epifluorescencia; microscopía confocal y espectrometría de masa.



## 1. Introducción

### A. Tuberculosis

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), una enfermedad infectocontagiosa que afecta al ser humano y constituye un problema mundial a nivel de la salud pública. La TB representa la segunda causa de mortalidad por un agente infeccioso a nivel mundial, después del virus de la inmunodeficiencia humana. De acuerdo a las cifras aportadas por la Organización Mundial de la Salud, en 2013 nueve millones de personas se enfermaron y 1,5 millones murieron a causa de esta enfermedad, 360 mil de los cuales eran HIV-positivos [1].

#### 1. Forma de transmisión de la tuberculosis

La tuberculosis es habitualmente transmitida por secreciones respiratorias generadas por un enfermo con tuberculosis activa al toser, estornudar o hablar. Los pulmones son el blanco principal de la bacteria, sin embargo, *M. tuberculosis* es capaz de diseminarse afectando a otras partes del cuerpo. La fuente de la transmisión de la TB son principalmente las personas con tuberculosis pulmonar activa [2], sin embargo estudios recientes han demostrado que la capacidad infectiva de los pacientes con TB extrapulmonar (XPTB) ha sido subestimada [3].



La transmisión se produce cuando una persona inhala los bacilos presentes en los aerosoles de una persona infectada. El pequeño tamaño de los aerosoles facilita su llegada a los alvéolos pulmonares sin ser eliminados por acción del sistema mucociliar [4].

Los microorganismos que alcanzan los pulmones son fagocitados por macrófagos alveolares residentes donde a menudo son destruidos. La destrucción de las micobacterias depende de la capacidad microbicida intrínseca de los macrófagos del hospedero y de los factores de virulencia de las micobacterias [5]. Alternativamente, las micobacterias que logran escapar de la destrucción intracelular inicial, continúan multiplicándose, llevando eventualmente a la lisis de la célula infectada [4]. A continuación los macrófagos alveolares y las células epiteliales del pulmón liberan quimioquinas, que reclutan monocitos sanguíneos y otras células inflamatorias al pulmón.

Los monocitos reclutados se diferencian en macrófagos inmaduros que son incapaces de destruir o inhibir el crecimiento de *M. tuberculosis* [5]. Como consecuencia, el ciclo de multiplicación bacilar se repite dentro de los mismos. Micobacterias del sitio de lesión inicial son transportadas a ganglios linfáticos de drenaje, donde se multiplican, formando el llamado complejo primario [4]. Algunas veces, durante este período de intensa multiplicación, en individuos inmunocomprometidos algunos micobacterias

## 1. Introducción



pueden ingresar en la circulación sanguínea o linfática diseminándose así a otras partes del cuerpo [2].

La patogenicidad de *M. tuberculosis* está íntimamente relacionada con su capacidad de sobrevivir dentro de macrófagos del hospedero deteniendo la maduración normal del fagosoma en un estadio temprano [6], caracterizado por una baja cantidad de las proteínas de membrana asociadas al lisosoma-1 y 2 (LAMP-1 y LAMP-2) [7], de hidrolasas lisosomales activas, y un pH de 6,4 debido a la limitada cantidad de ATPasas vacuolares [6].

*M. tuberculosis* logra modular el sistema de transporte endosomal y el metabolismo de su célula hospedera para su beneficio [6] y [8]. Uno de los beneficios de residir en un endosoma temprano que no madura es que puede acceder a las vías de importación de hierro de su célula hospedera, satisfaciendo así sus necesidades para el hierro [8]. Por otra parte, este agente estimula la diferenciación de los macrófagos en células espumosas, que se caracterizan por la acumulación de lípidos que proporcionan de nutrientes a la micobacteria [9].

Una característica prominente de la respuesta inmune a *M. tuberculosis* es el retraso en el inicio de una respuesta inmune adaptativa, que ocurre frecuentemente 42 días después de la infección inicial [10].

## 1. Introducción



Los linfocitos T estimulados por antígenos específicos de las micobacterias, proliferan y secretan citoquinas, principalmente interferón gamma (IFN- $\gamma$ ) que activa a los macrófagos, causando una respuesta celular frente a la tuberculosis. Aunque este bacilo es capaz de sobrevivir dentro de macrófagos no activados, éste es destruido cuando los mismos se activan [11].

Más del 90% de las personas que contraen una tuberculosis primaria no enferman, debido a que los macrófagos activados fagocitan las bacterias y las aíslan en el interior de una estructura denominada granuloma (ver Figura 1) [12]. Estableciendo así una simbiosis estable, de duración indefinida que mantiene a las bacterias aisladas del resto del organismo [12]. No obstante, en individuos con un sistema inmune comprometido la inmunidad celular es incapaz de controlar la infección primaria, por lo que la misma evoluciona hacia una tuberculosis primaria progresiva.

En su nivel más básico, un granuloma es un agregado organizado de macrófagos maduros que surge en respuesta a un estímulo persistente. Los macrófagos maduros del granuloma pueden fusionarse en células gigantes multinucleadas o diferenciarse en células espumosas. En particular, en los granulomas tuberculosos, los macrófagos maduros pueden sufrir una transformación a células epitelioides, que tienen sus membranas celulares fuertemente entrelazadas en forma de cremallera. El granu-

## 1. Introducción

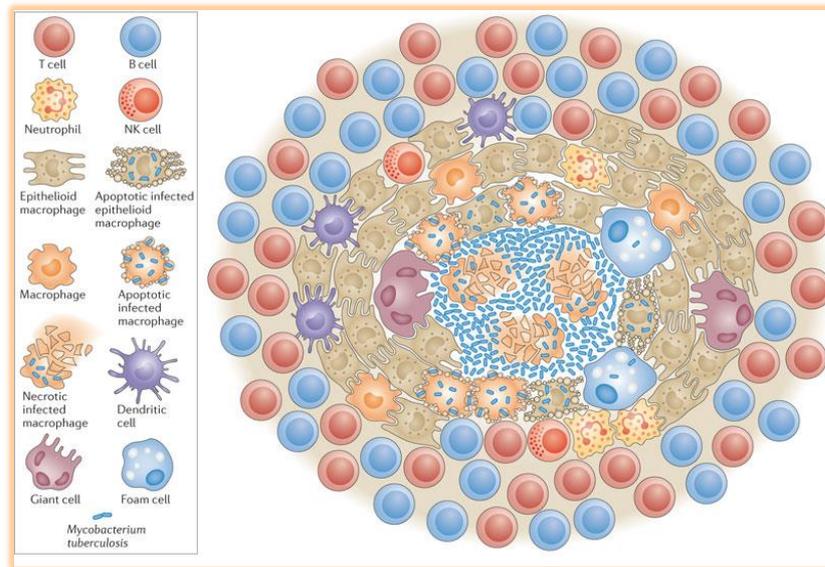


loma también es habitado por otros tipos celulares como neutrófilos, células dendríticas, linfocitos B y T, células asesinas naturales (*natural killer*), fibroblastos y células que secretan los componentes de la matriz extracelular. Se cree que las células epiteliales que lo rodean participan en su formación [9].

El granuloma tuberculoso posee una zona de necrosis tisular caseosa en su centro como consecuencia de la pérdida de la vascularización, donde algunas micobacterias viables permanecen en un estado de quiescencia por muchos años, desarrollando una tuberculosis latente [2]. Se calcula que alrededor de un tercio de la población mundial padece de tuberculosis latente [13].

Sin embargo, las personas con tuberculosis latente pueden desarrollar la enfermedad meses o años más tarde si los bacilos infectivos que se encuentran en el interior de los tubérculos salen al exterior. Se estima que entre un 5 y un 10% de las personas con infección latente desarrollará la enfermedad activa en algún momento de sus vidas, provocando la diseminación del patógeno [14]. Una mala nutrición, la edad avanzada y la existencia de otras infecciones, como el SIDA, convierten a estas personas inmunodeprimidas en hospederos especialmente susceptibles a una reactivación de la tuberculosis.

## 1. Introducción



**Figura 1 El granuloma de tuberculosis.** El granuloma tuberculoso es un agregado compacto y organizado de macrófagos que se diferenciaron a células epitelioides, células espumosas, o que se fusionaron formando las células gigantes multinucleadas. Las micobacterias se encuentran en las áreas centrales necróticas. Además otros tipos celulares habitan el granuloma como células dendríticas, fibroblastos, linfocitos B, T y *natural killer*. Extraído de referencia [9].

## 2. Prevención de la tuberculosis

Las medidas preventivas en la lucha contra la TB incluyen la vacunación y el diagnóstico y tratamiento de los individuos infectados evitando así que transmitan la enfermedad a otras personas.

La única vacuna antituberculosa disponible consiste en una cepa de *Mycobacterium bovis* (bacilo de Calmette y Guérin, BCG) atenuada irreversiblemente. Esta cepa se replica en los macrófagos y expresa antígenos compartidos con *M. tuberculosis* antes de ser destruida. BCG pre-

## 1. Introducción



viene contra la tuberculosis meníngea y formas diseminadas en los niños. Sin embargo, las estimaciones de la protección contra la tuberculosis pulmonar varían de cero a 80%. Por lo tanto, se estima que BCG tiene poco impacto para limitar la propagación de esta enfermedad [15].

### 3. *Tratamiento de la tuberculosis*

El tratamiento antituberculoso estandarizado consiste en una fase intensiva de dos meses; seguida de una fase de tratamiento continuo de cuatro meses de duración. La fase intensiva está caracterizada por una actuación agresiva sobre la bacteria, en la que se utilizan simultáneamente cuatro fármacos isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol o estreptomycin. Por otra parte, en la fase de tratamiento continuo se utilizan únicamente isoniazida y rifampicina. En ambos casos los fármacos son consumidos diariamente bajo supervisión directa del personal de salud [16].

Este esquema terapéutico de seis meses de duración alcanza tasas de curación de hasta 95% en zonas donde la existencia de tuberculosis farmacorresistente es mínima o nula [17]. Sin embargo, el uso inapropiado o incorrecto de los agentes antimicrobianos, la interrupción



prematura del tratamiento o el uso de formulaciones de drogas no efectivas pueden causar resistencia a las drogas utilizadas [18].

Varios factores comprometen la eficiencia de los tratamientos farmacológicos actualmente disponibles, incluidos la emergencia de cepas multirresistentes (MDR) y extremadamente resistentes (XDR), la falta de nuevas drogas y la capacidad del bacilo para persistir en un estado de latencia.

Una cepa MDR es aquella que desarrolló resistencia a isoniazida y rifampicina, las drogas más poderosas utilizadas en el tratamiento de la tuberculosis. MDR-TB representa el 3,5% de los casos de TB [1]. Dentro de las cepas MDR, se distinguen a las XDR quienes responden aún menos a los medicamentos disponibles, incluyendo a múltiples fármacos anti-tuberculosos de primera línea, así como a cualquiera de las fluoroquinolonas y para al menos uno de los tres fármacos de segunda línea inyectables (amikacina, capreomicina o kanamicina) [19]. Se estima que en el 2013 480 mil personas desarrollaron una MDR-TB, causando 210 mil muertes. En ese mismo año XDR-TB fue reportado en 100 países, y se estima que el 9% de los casos de MDR-TB tenían XDR-TB [1].

Para el tratamiento de pacientes infectados con una cepa farmacoresistente se deben utilizar drogas de menor efectividad, mayor toxicidad

## 1. Introducción



y costo, denominadas drogas de segunda línea. Los principales fármacos de segunda línea utilizados son amikacina, protionamida/etionamida, capreomicina, kanamicina, cicloserina, fluoroquinolonas, ácido r-aminosalicílico y tioacetazona. Las mismas deben ser administradas con mayor frecuencia que las drogas de primera línea y el promedio de duración del tratamiento recomendado es de dos años, haciendo más difícil el cumplimiento de la terapia completa por parte del paciente [19].

Es de crucial importancia lograr una mejora en las estrategias terapéuticas disponibles para combatir esta enfermedad. En particular, se busca reducir la duración y el costo de los tratamientos actuales, así como identificar drogas capaces de actuar sobre el bacilo en estado de latencia. Un mayor entendimiento de la fisiopatología de esta bacteria, así como de sus complejas relaciones con el hospedero permitiría descubrir y validar nuevos blancos terapéuticos para mejorar el tratamiento de la tuberculosis. Evidencias recientes sugieren que los elementos de señalización, en particular los que involucran la fosforilación de proteínas en residuos de Ser/Thr pueden representar una prometedora nueva clase de blanco terapéutico [20] y [21].

Un elemento central en la patogenicidad de *M. tuberculosis* es su capacidad para sobrevivir en los macrófagos del hospedero, inhibiendo el proceso de maduración fagosomal. En este proceso participan tanto mo-

## 1. Introducción



léculas del hospedero como del patógeno [22]. Entre estas últimas, ha cobrado gran relevancia una quinasa de proteínas de *M. tuberculosis*, denominada PknG, como uno de los factores de virulencia fundamentales que participa en la inhibición de la maduración fagolisosomal [23]. Su rol esencial hace de PknG un blanco terapéutico atractivo, sin embargo, el modo de acción de PknG se desconoce [24] y [25].

## B. Fagocitosis y biogénesis del fagolisosoma

### 1. Etapas de la fagocitosis

La fagocitosis, es el proceso por el cual células especializadas, predominantemente neutrófilos, macrófagos y células dendríticas internalizan partículas de más de 0,5  $\mu\text{m}$  de diámetro de material destinado a ser degradado por enzimas lisosomales. Es un evento central en la inmunidad innata y en la remodelación de los tejidos, mediando la eliminación de patógenos invasores para resolver una infección así como de cuerpos apoptóticos contribuyendo a la limpieza de células dañadas o senescentes [26].

La fagocitosis se inicia con unión de ligandos a receptores de superficie, lo que desencadena una compleja cascada de señalización que induce una redistribución de los elementos corticales del citoesqueleto y

### 1. Introducción



de la membrana plasmática, que conduce a la extensión de pseudópodos y culmina con la internalización de la partícula [27].

Los fagosomas recientemente formados muestran una composición similar a la de la membrana plasmática de la cual se originaron [28] y su contenido soluble es una muestra del espacio extracelular. El lumen del fagosoma naciente contiene entonces un ambiente benigno, incapaz de eliminar los microorganismos invasores o los cuerpos apoptóticos. Sin embargo, a medida que transcurre el tiempo, estas capacidades son sucesivamente adquiridas.

El lumen de los fagosomas adquiere propiedades microbicidas y digestivas a través de múltiples ciclos de fisión y fusión con endosomas tempranos, tardíos y finalmente con lisosomas en una secuencia de eventos coordinados que colectivamente se conocen como “maduración” [29] y [30]. Durante este proceso ocurre la adquisición secuencial de proteínas específicas que le confieren nuevas funciones al fagosoma en maduración [31], siendo éste gradualmente transformado en un fagolisosoma funcional (ver Figura 2).



## 2. Mecanismo de maduración fagosomal

Los fagosomas adquieren sus propiedades microbicidas paulatinamente en un proceso unidireccional de cambios bioquímicos denominado maduración. Los procesos implicados en la transformación de los fagosomas son el reciclaje de proteínas a la membrana [32] y [33]; la adquisición de nuevas proteínas vía su síntesis o reclutamiento desde el citoplasma y la constante remodelación mediante eventos de fusión secuencial primero con endosomas tempranos, y luego con endosomas tardíos y con lisosomas [31].

Los lípidos, particularmente los fosfoinosítoles están involucrados en múltiples funciones que dirigen el proceso de fagocitosis. Son críticos a la hora de transducir señales fagocíticas, en remodelar el citoesqueleto de actina y en atraer motores moleculares que determinan el tránsito vesicular. Además, interaccionan con las proteínas Rab dictando la fusión y fisión de las membranas durante la maduración del fagosoma [26] y [34].

Las proteínas Rab son miembros de una familia de pequeñas GTPasas presentes en todo el dominio *Eukaryota*. Funcionan como interruptores moleculares que ciclan entre un estado inactivo unido a GDP, y un estado activo unido a GTP [35].



Las principales proteínas Rab asociadas a la vía endocítica son Rab5, Rab7, Rab4 y Rab11. Rab5 está involucrada en el tráfico de vesículas endocíticas a endosomas tempranos y en fusiones homotípicas entre endosomas tempranos [34]. Rab7 controla el tráfico de vesículas endocíticas tempranas a tardías y a los lisosomas [35]. Mientras que Rab4 y Rab11 funcionan facilitando el reciclaje de proteínas a la membrana.

Luego de su reclutamiento a la membrana del endosoma temprano, Rab5 es activada por su factor GEF (*guanine nucleotide exchange factor*). Subsecuentemente, GTP-Rab5 interacciona con su efector Rabaptin5 quien se une a GEF e incrementa su actividad sobre Rab5 [36]. Este ciclo de retroalimentación positiva mantiene a Rab5 en un estado activo, asegurando que GTP-Rab5 permanezca unido a la membrana de endosomas tempranos el tiempo suficiente para reclutar otros efectores.

Uno de los efectores reclutados es la quinasa de fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PI(4,5)P<sub>2</sub>), hVPS34/p150 [37], produciendo la acumulación de fosfatidilinositol-3-fosfato PI(3,4,5)P<sub>3</sub>(PIP<sub>3</sub>) en la membrana de endosomas tempranos [26].

Ambas señales, PIP<sub>3</sub> y GTP-Rab5, son requeridas para el reclutamiento de efectores de Rab5 adicionales, como EEA1 y Rabenosyn5 [38].

## 1. Introducción



Estos dos últimos son factores esenciales para la fusión homotípica de endosomas tempranos y la fusión de vesículas a los mismos [37] y [38].

Los fagosomas luego adoptan las características de un endosoma tardío, transición acompañada por la inactivación gradual de Rab5 y sus efectores, la concomitante activación de Rab7 y adquisición del receptor de manosa-6-fosfato [33]. La proteína RILP (*Rab7-interacting lysosomal protein*), interacciona con Rab7 activada en los endosomas tardíos y lisosomas e induce el reclutamiento del complejo motor dineína/dinactina. Consecuentemente, estas vesículas son transportadas por las proteínas motoras a los extremos menos de los microtúbulos [39], inhibiendo eficazmente su transporte hacia la periferia de la célula, y promoviendo la fusión homotípica y heterotípica de los fagosomas.

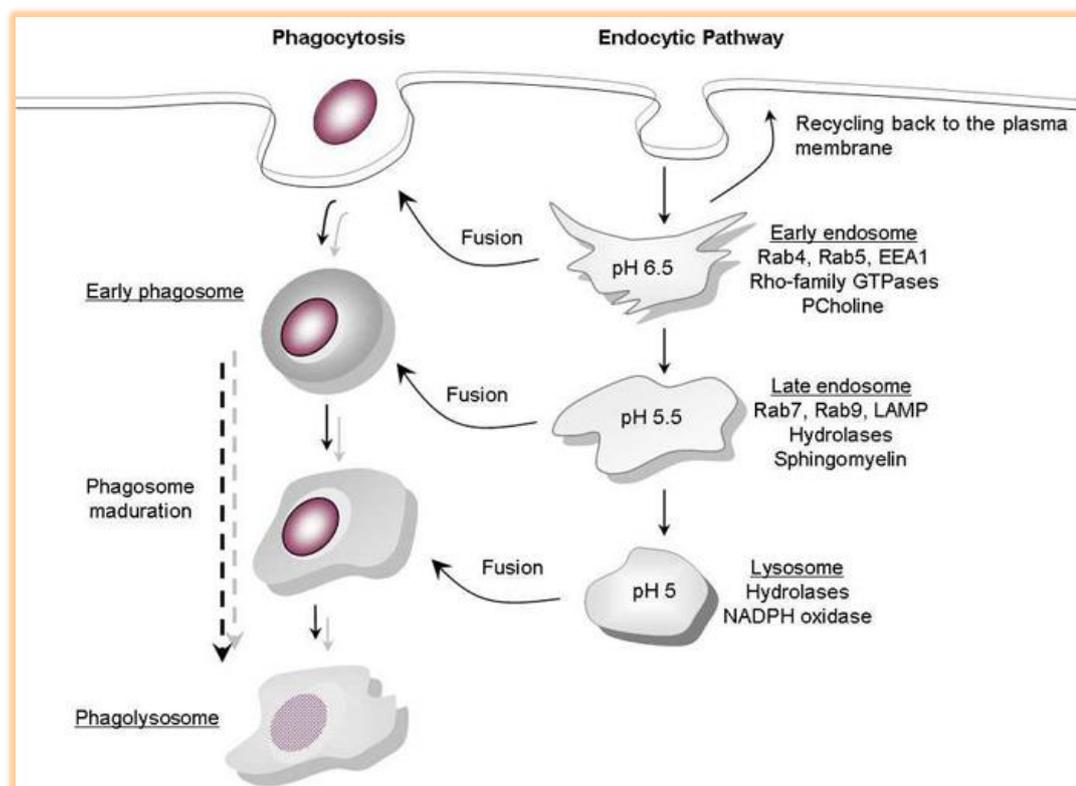
Finalmente, el proceso de maduración del fagosoma culmina en la formación del fagolisosoma, caracterizado por su intensa actividad hidrolítica, bajo pH, presencia de péptidos antimicrobianos, intermediarios reactivos del oxígeno como peróxido de hidrógeno y el ion superóxido e intermediarios reactivos del nitrógeno como óxido nítrico y nitritos [34] y [40].

La maduración de los fagosomas en fagolisosomas es un proceso crítico para destruir los agentes infecciosos. Sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado la capacidad de modular dicho proceso de-

## 1. Introducción

• • •

teniendo la maduración fagosomal, evitando de este modo ser destruidos en un fagolisosoma. En particular, el éxito de *M. tuberculosis* como patógeno intracelular depende, básicamente, de esta habilidad.



**Figura 2 Fagocitosis y biogénesis de un fagolisosoma.** Los macrófagos internalizan en fagosomas a una partícula. Luego, ocurre la maduración del fagosoma como un proceso secuencial que implica la fusión con componentes de la vía endocítica (endosomas tempranos, endosomas tardíos y lisosomas), que en última instancia, forman el fagolisosoma. En el fagolisosoma los materiales ingeridos son finalmente degradados. La maduración está acompañada por cambios en el contenido luminal y de membrana, entre ellos marcadores vesiculares, y cambios en la composición de fosfolípidos. Mientras que los primeros fagosomas se enriquecen con fosfatidilcolina, los fagosomas tardíos son preferentemente enriquecidos con esfingomielina. Extraído de [41].

## 1. Introducción



### 3. Bloqueo de la maduración de los fagosomas por *M. tuberculosis*

El proceso de inhibición de la maduración del fagosoma durante la infección con *M. tuberculosis* es un proceso multifactorial, que hasta el día de hoy no se conoce completamente, e involucra factores tanto de la bacteria como del hospedero. Diversos aspectos de la maduración del fagosoma son modificados por este bacilo, incluyendo eventos de fusión y fisión vesicular y el reclutamiento de la V-ATPasa, que permite la acidificación del fagosoma, un evento crucial para la actividad hidrolítica del mismo. Se conocen diversos factores de virulencia que participan en este proceso. Entre ellos: el lipoarabinomanano (LAM); la fosfatasa ácida de lípidos SapM; la nucleósido difosfato quinasa (Ndk); dos fosfatasa de proteínas fosforiladas en residuos Tyr (PtpA y PtpB); la lipoamida deshidrogenasa C (LpdC); una metaloproteasa zinc-dependiente (Zmp1); la trehalosa 6'6'-dimicolato (TDM) y la Ser/Thr-quinasa PknG [42].

Dos de ellos convergen en la exclusión de PIP<sub>3</sub> de la membrana del fagosoma [43]. El glucolípid LAM, interfiere con el reclutamiento/activación de PI3K hVPS34 [44]. Mientras que SapM, una fosfatasa ácida secretada por *M. tuberculosis* hidroliza PIP<sub>3</sub> localizado en la cara citoplasmática de la membrana del fagosoma evitando su acumulación [43].

## 1. Introducción



Ndk desfosforila Rab7-GTP y Rab5-GTP e inhibe el reclutamiento de los efectores de Rab5 y Rab 7 a los fagosomas [45]. La fosfatasa PtpA desfosforila VPS33B, una proteína del macrófago involucrada en la regulación de la fusión de membranas, y se une a la subunidad H de la V-ATPasa [45], interfiriendo en la acidificación del lumen fagosomal [46].

Por otra parte, PknG ha cobrado relevancia por su papel esencial en el proceso de inhibición de la maduración del fagosoma [23] (ver más adelante). Si bien se ha postulado que esta enzima interfiere con vías de señalización del hospedero a través de la fosforilación de proteínas, al día de hoy se desconocen los mecanismos moleculares responsables de esta inhibición.

## C. Sistemas de fosforilación de proteínas en bacterias

### 1. *Sistemas de fosforilación de dos componentes*

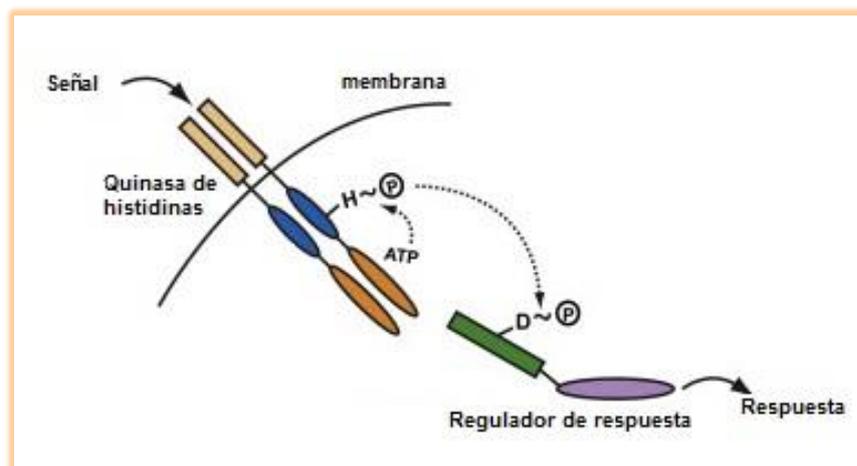
Los mecanismos de transducción de señales que involucran la fosforilación reversible de proteínas en procariontes son principalmente llevados a cabo por sistemas de dos componentes. En su forma más simple estos sistemas comprenden una quinasa de histidinas (HK) integral de membrana y una proteína citoplasmática que consiste en el regulador de respuesta asociado (RR) [47]. Como se puede observar en la Figura 3, la

## 1. Introducción



HK, en respuesta a estímulos ambientales, se autofosforila en un residuo histidina, creando un grupo fosforilo de alta energía. Subsecuentemente, este grupo es transferido a un residuo aspartato conservado en el RR. La fosforilación del RR induce un cambio conformacional que resulta en la activación de su dominio transmisor que efectúa la respuesta específica asociada [48].

Los genomas de micobacterias contienen una cantidad relativamente baja de genes que codifican para sistemas de dos componentes comparados con genomas de otras bacterias del mismo tamaño. Este número reducido de quinasas de histidina y sus reguladores de respuesta asociados está compensado por mecanismos de señalización alternativos que involucran la fosforilación de residuos de serina y treonina [20].



**Figura 3 Sistemas de fosforilación de dos componentes:** Mecanismo de transducción de señales que involucra una proteína integral de membrana quinasa de histidinas y el regulador de respuesta asociado. Adaptado de [48].

## 1. Introducción



## 2. *Sistemas de fosforilación de tipo eucariota*

Durante mucho tiempo se pensó que la adición covalente de grupos fosfato a las proteínas en residuos de serina, tirosina o treonina estaba restringido a organismos eucariotas. Sin embargo, hoy en día se sabe que la fosforilación en Ser/Thr/Tyr está directamente involucrada en procesos bacterianos diversos [49] como la regulación del desarrollo, el control del crecimiento celular, etc. Asimismo, pueden funcionar como factores de virulencia estando involucradas en la infectividad, y la supervivencia en las células del hospedero [50] y [51].

Estudios recientes están empezando a resolver el importante rol de las quinasas de proteínas en Ser y Thr (STPKs) y de las fosfatasas en la fisiología y virulencia de las micobacterias. Estas proteínas representan una prometedora nueva clase de blancos terapéuticos, y la baja identidad de secuencia con sus homólogos eucariotas (menor al 30%) puede ser explotada para incrementar la selectividad de compuestos antimicobacterianos [52].



#### D. Sistemas de fosforilación en *M. tuberculosis*.

El genoma de *M. tuberculosis* codifica para once quinasas de proteínas en serinas y treoninas, y cuenta con un número equivalente de sistemas de dos componentes completos y funcionales [53]. Los genes que codifican para STPKs se denominan *pknA* a *pknL* [53] y todas las proteínas codificadas tienen la capacidad de autofosforilarse. Dos de estas (PknG y PknK), son proteínas citosólicas; mientras que las otras nueve son proteínas integrales de membrana [24], con su dominio quinasa N-terminal conectado a través de una única hélice transmembrana con uno o más dominios C-terminales que sirven como sensores de señales [20].

Las quinasas pueden ser clasificadas en quinasas RD y quinasas no-RD, basándose en la presencia o ausencia de una arginina (R) adyacente a un aspartato catalítico (D) conservado en el bucle catalítico del dominio quinasa. Dicha arginina interacciona con el bucle de activación fosforilado y controla su plegamiento, resultando en la activación de la actividad quinasa [54]. La mayoría de las quinasas micobacterianas son de tipo RD, siendo la autofosforilación necesaria para la regulación de la actividad catalítica.

PknG es única entre las quinasas de micobacterias ya que no cuenta con el residuo de arginina crítico, siendo así una quinasa tipo no-



RD. La autofosforilación de PknG no juega un rol clave en su activación y se le atribuye un posible rol de reclutamiento de su sustrato (GarA) [55].

Además de las STPKs, el genoma de *M. tuberculosis* también incluye tres genes que codifican fosfatasa de proteínas tipo eucariota [56]. Una fosfatasa de proteínas fosforiladas en Ser/Thr (PstP) [53] y dos fosfatasa de proteínas fosforiladas en residuos Tyr (PtpA y PtpB) [20].

Estudios genómicos comparativos sugieren que muchas STPKs controlan procesos fisiológicos redundantes. De hecho, solo cuatro de las once quinasas de *M. tuberculosis* (PknA, PknB, PknG y PknK) están conservadas en *Mycobacterium leprae*, micobacteria cercana filogenéticamente a *M. tuberculosis* que ha sufrido un extenso decaimiento de genes pero mantiene el grupo mínimo de genes necesarios para la virulencia [57]. En concordancia con estos resultados, análisis de mutágenesis insercional mediante transposones sugieren que la mayoría de las STPKs y las tres fosfatasas no son esenciales para el crecimiento de *M. tuberculosis* tanto *in vivo* como *in vitro*, mientras que PknA, PknB y PknG son individualmente requeridas [58] y [59]. PknA y PknB son dos proteínas esenciales que están involucradas en la regulación de la forma celular [60] y [61], están codificadas en un mismo operón junto con *pstP*, *rodA* y *pbpA*. La importancia de PknG, así como sus funciones y estructura serán discutidas en la sección siguiente.

## 1. Introducción



Debido a que la esencialidad de los genes es un criterio importante para el diseño de drogas antibacterianas, los resultados previos indican que solo unas pocas STPKs representarían blancos terapéuticos prometedores para el desarrollo de nuevos antibióticos. En este trabajo nos centraremos en el estudio de PknG.

## E. PknG

### 1. Importancia de PknG

PknG es una de las once quinasas de proteínas en Ser y Thr de tipo eucariota codificadas por el genoma de *M. tuberculosis* [53], y a diferencia de la mayoría de los miembros de este grupo que son proteínas de membrana, PknG es una enzima soluble. Su importancia radica en la regulación de procesos críticos para la supervivencia de la micobacteria en el hospedero. Los roles funcionales postulados para PknG incluyen la regulación de procesos metabólicos [55] y la interferencia en vías de señalización de la célula hospedera infectada [23]. La inactivación del gen *pknG* disminuye la viabilidad celular y la virulencia en modelos animales y sugiere un control central en el metabolismo regulando los niveles de glutamato/glutamina [62].

### 1. Introducción



a) *Roles de PknG en la patogenicidad de M. tuberculosis*

PknG juega un rol crucial en la supervivencia de las micobacterias patogénicas. Se ha demostrado que la delección génica o inhibición química de este factor de virulencia es suficiente para revertir el bloqueo de la maduración del fagosoma ejercido por *M. tuberculosis*, haciendo que el macrófago recupere sus capacidades degradativas en el cual las micobacterias son eficientemente eliminadas [23].

Walburger y colaboradores [23] analizaron el tráfico intracelular de *Mycobacterium bovis* BCG deficientes en PknG en macrófagos infectados. Mientras que la micobacteria salvaje es capaz de sobrevivir en el macrófago infectado, las micobacterias fagocitadas deficientes en PknG fueron rápidamente degradadas en lisosomas. En concordancia con estos resultados, demostraron que el tratamiento de macrófagos infectados con una cepa salvaje de *M. bovis* BCG con un inhibidor específico de PknG (AX20017 [54]) (ver Figura 5 b), aumenta el número de bacterias que se localizan en los lisosomas de forma dosis dependiente [21] y [23].

La sobreexpresión de PknG en una micobacteria no patógena (*Mycobacterium smegmatis*) permite que ésta sobreviva en el macrófago mientras que la cepa salvaje o cepas que sobreexpresan una mutante inactiva de PknG son rápidamente destruidas [23].

## 1. Introducción



Ha sido postulado que PknG es secretada al citosol de los macrófagos infectados, donde interfiere con vías de señalización del hospedero facilitando la sobrevivencia intracelular de las micobacterias por la inhibición de la fusión fagolisosomal [23].

Si bien el rol de PknG en la supervivencia de las micobacterias en el hospedero a través de la interferencia con los procesos de maduración fagosomal ha sido demostrado, aún se desconocen las bases moleculares de este efecto. Teniendo en cuenta que muchos de los factores involucrados en la regulación del tráfico intracelular están controlados por reacciones de fosforilación/desfosforilación, se ha postulado que el mecanismo de acción de PknG sería a través de la fosforilación de proteínas blanco en el hospedero. Hasta el momento se desconocen los blancos en el hospedero involucrados y la etapa específica de la maduración donde la quinasa interfiere.

#### *b) Rol de PknG en el metabolismo de la bacteria*

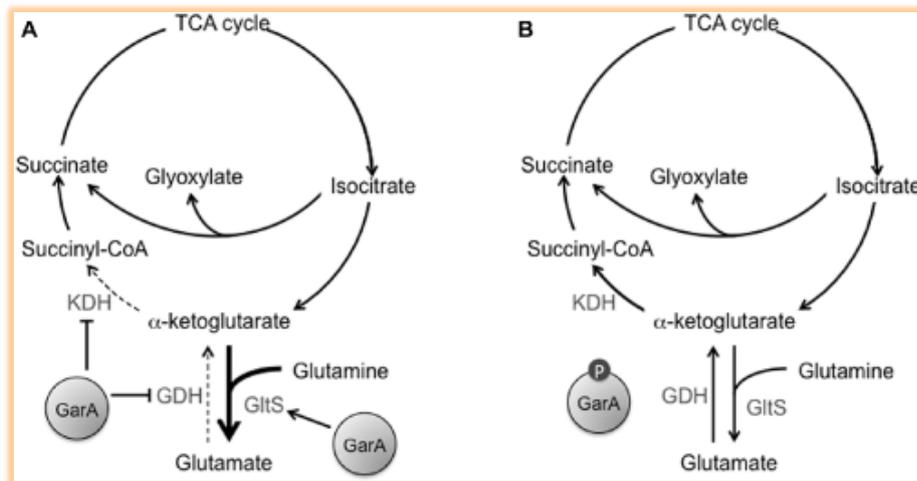
Si bien la función de PknG en el fagosoma es aún poco conocida, su papel en la fisiología de la bacteria ha sido mejor caracterizado. PknG participa en la regulación de la síntesis de glutamato y regulación del ciclo de Krebs vía la fosforilación de GarA, un sustrato endógeno [63]. GarA es una proteína que consiste de un dominio *Forkhead-associated* (FHA), con una extensión N-terminal que contiene un motivo conservado ETTS. Se

## 1. Introducción



ha demostrado mediante resonancia de plasmones superficiales que un complejo estable entre PknG y GarA es formado únicamente cuando PknG se encuentra autofosforilada y GarA en una forma no fosforilada. Como consecuencia, se cree que la autofosforilación de PknG permite el reclutamiento de una forma no fosforilada de GarA vía su dominio FHA, que reconoce treoninas fosforiladas presentes en la región N-terminal de PknG [55].

En la micobacteria, GarA está presente como una mezcla de formas fosforiladas y no fosforiladas cuyos niveles de fosforilación pueden ser controlados por más de una quinasa [55]. Una forma no fosforilada de GarA interacciona vía su dominio FHA con  $\alpha$ -cetoglutarato descarboxilasa (KGD), una subunidad del complejo  $\alpha$ -cetoglutarato deshidrogenasa (KDH) y con Rv2476c, la única glutamato deshidrogenasa (GDH) codificada en el genoma de *M. tuberculosis*, inhibiendo la actividad de ambas enzimas [55]. Asimismo, se une y activa el glutamato sintasa (GltS). El efecto neto es la inhibición del ciclo de Krebs y la promoción de la síntesis de glutamato (ver Figura 4A) [63]. Cuando PknG fosforila GarA, ésta ya no es capaz de unirse a cualquiera estas enzimas. Por lo que la inhibición del ciclo de Krebs es eliminada [63] (ver Figura 4B).



**Figura 4 Modelo de regulación del ciclo de Krebs y síntesis de glutamato por GarA. Extraído de [63].**

De las once STPKs de *M. tuberculosis*, cuatro se conoce que fosforilan GarA en la T<sub>22</sub>, la segunda treonina del sitio ETTS (PknB, D, E y F) [64], pero PknG es la única quinasa conocida que fosforila GarA en la T<sub>21</sub>, la primer treonina del sitio ETTS [55]. La fosforilación de estos residuos es mutuamente excluyente, evidenciando que GarA es un intermediario de más de una vía de señalización [55].

Debido a los procesos celulares críticos que controla, la inhibición de PknG ha emergido como un blanco atractivo para el descubrimiento de drogas. El principal desafío es alcanzar la inhibición selectiva de PknG, ya que el mecanismo catalítico y el plegamiento proteico de las STPKs activas está conservado desde procariontas a eucariotas. Para alcanzar dicho objetivo es necesario conocer su estructura en profundidad.

## 1. Introducción



## 2. Estructura de PknG

PknG es una enzima de 82 kDa, que consiste de tres dominios estructurales cuya combinación no ha sido encontrada en ninguna otra quinasa. Tiene un dominio rubredoxina N-terminal, un dominio quinasa central, y un motivo TPR en C-terminal [54] (ver Figura 5).

### a) Secuencia N-terminal

La secuencia N-terminal, que precede al dominio quinasa contiene los sitios de autofosforilación [55] y un pequeño dominio globular tipo rubredoxina (Rbx) [54]. Este último, está definido por la presencia de cuatro residuos de cisteínas conservadas, presentes en dos motivos Cys-X-X-Cys-Gly (siendo X un aminoácido cualquiera) responsables de coordinar un ion metálico [65]. La estructura cristalográfica de PknG confirma que este interacciona con los dos lóbulos del dominio quinasa, situándose sobre el sitio activo sin ocluir la accesibilidad al mismo [54]. En bacterias se ha visto que este dominio participa en reacciones de transferencia de electrones [66].

El mutante de PknG resultante de sustitución simultánea de las cuatro cisteínas que coordinan el ion metálico (C<sub>106</sub>, C<sub>109</sub>, C<sub>128</sub>, y C<sub>131</sub>) por serinas presenta una disminución significativa de la actividad enzimática [67], demostrando que el dominio Rbx tiene un rol funcional o estructural

## 1. Introducción



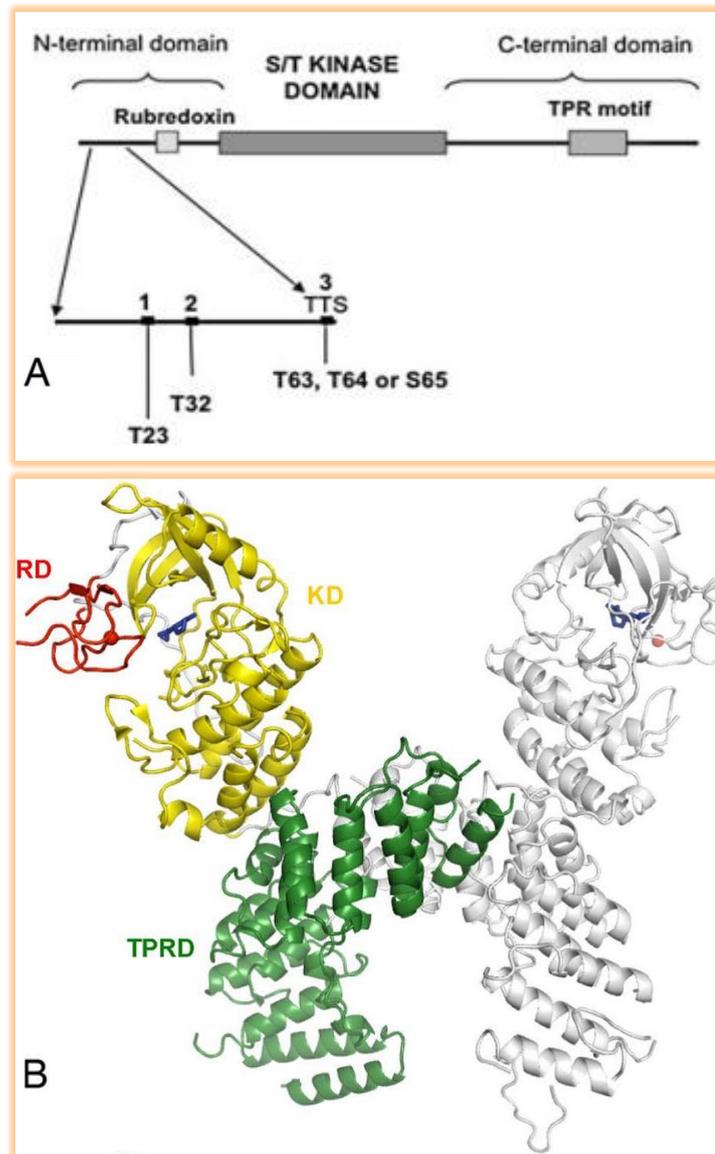
clave en la proteína. Posiblemente, permita la modulación de la actividad de PknG de acuerdo al ambiente redox [67].

*b) Dominio quinasa*

El dominio quinasa de PknG exhibe una organización de dos lóbulos conservada entre las STPK. El lóbulo N-terminal contiene el sitio de unión al ATP, mientras que el lóbulo C-terminal está involucrado en formar interacciones estabilizantes con el sustrato [54], [68] y [69].

*c) C-terminal*

El dominio C-terminal de PknG contiene un motivo repetidos de tetratricopéptidos (TPR), dominio encargado de mediar interacciones proteína-proteína [54]. Este dominio interacciona con el lóbulo C-terminal del dominio quinasa de PknG, y forma un extensivo contacto lateral con el dominio TPR de la segunda molécula de PknG del dímero.



**Figura 5 Estructura de PknG. (a) Dominios de PknG y sus sitios de fosforilación:** se muestran la región N-terminal que contiene el dominio rubredoxina y los sitios de fosforilación; el dominio quinasa y la región C-terminal que incluye el dominio TPR que contiene repetidos de tetratricopéptidos. Extraído de [55]. **(b) Estructura cristalográfica de rayos X de PknG y un inhibidor (AX20017) (código PDB 2PZI):** los tres dominios de la subunidad izquierda están marcados en diferentes colores (RD, dominio rubredoxina con su metal unido, (cadmio en la estructura presente); KD, dominio quinasa; TPRD, dominio TPR). Extraído de [54].



### 3. Inhibidores de PknG

Existen muy pocos inhibidores de PknG reportados, todos ellos dirigidos hacia el sitio activo de la enzima y de potencia moderada [21], [54], y [70]. Debido a que el plegamiento del dominio quinasa es altamente conservado incluso entre diferentes reinos, pueden existir problemas de especificidad en la inhibición de PknG dirigida al sitio activo. Una estrategia alternativa consiste en apuntar a otros dominios de la proteína, explotando sus características estructurales únicas para inhibir selectivamente la actividad quinasa de PknG *in vitro*.

Entre los posibles sitios blancos ha cobrado relevancia el dominio Rbx, debido a que puede ser modificado específicamente por la adición de una molécula electrofílica que reaccione con las cisteínas de ese dominio.

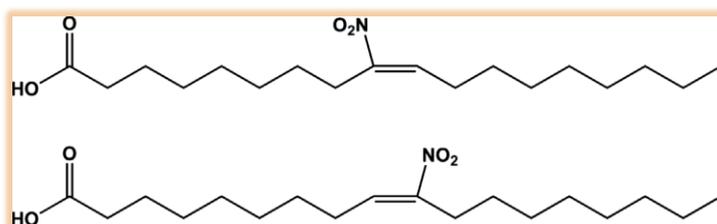
Derivados electrofílicos de ácidos grasos insaturados son intermediarios de señalización que inducen respuestas antiinflamatorias y quimioterapéuticas. En particular, la nitración confiere a los ácidos grasos insaturados una fuerte reactividad electrofílica que media la nitroalquilación reversible de proteínas blanco. El grupo nitro (NO<sub>2</sub>) olefínico de los ácidos grasos nitrados (NO<sub>2</sub>-FA), funciona como un sustituyente aceptor de electrones que media la reactividad electrofílica del carbono β al NO<sub>2</sub>. Esta configuración promueve la nitroalquilación de residuos nucleofílicos críti-

## 1. Introducción



cos de histidina o cisteína [71], vía reacciones de adición de Michael, que son típicamente revertidas por tioles [71], [72] y [73], modulando tanto la función como la distribución subcelular de sus proteínas blanco [72].

Recientemente, la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analíticas del Institut Pasteur de Montevideo a la que pertenezco, reportó la inhibición irreversible de PknG por un ácido graso nitrado (el ácido nitro-oleico; OA-NO<sub>2</sub> cuya estructura se observa en la Figura 6) a través de un mecanismo novedoso que involucra la liberación de ion metálico del dominio rubredoxina de PknG [74]. Este hallazgo, que fue patentado [75], pone de manifiesto una estrategia innovadora para inducir la inhibición específica de este importante factor de virulencia de *M. tuberculosis*.



**Figura 6 Estructura de ácido oleico nitrado (OA-NO<sub>2</sub>).** El ácido nitro-oleico (OA-NO<sub>2</sub>), fue sintetizado por nitrosilación del ácido oleico y constituye una mezcla de dos isómeros ácido 9- y 10-nitro-9-*cis*-octadecaenoico. Extraído de [76].



## F. Métodos para estudiar la inhibición de la maduración del fagosoma por PknG

Resultados previos de nuestro laboratorio apuntan a que PknG aislada es capaz de inhibir la maduración del fagosoma en un modelo de fagocitosis de partículas de látex (LB) [77].

El modelo de fagocitosis utilizando partículas inertes de látex fue introducido por Weisman y Korn en 1969 en *Acanthamoeba* [78] y fue redescubierto en 1994 por Desjardins [31] para analizar las funciones fagosomales en macrófagos murinos de la línea J774A.1. Este versátil sistema permite realizar un análisis bioquímico completo y ensayos funcionales para estudiar los mecanismos moleculares que regulan la función fagosomal.

Las LB utilizadas están formadas a partir de poliestireno y presentan una alta densidad de grupos aldehído (que permiten un fácil acoplamiento covalente de proteínas) y de grupos sulfato que permiten la retención de la estabilidad durante el proceso de acoplamiento.

Como ventaja adicional, su densidad característica facilita la purificación de los fagosomas en un único paso, por flotación en un gradiente discontinuo de sacarosa. A diferencia de la mayoría de las metodologías basadas en el aislamiento de organelos en función de su densidad intrínseca, el aislamiento de los fagosomas que contienen LB se ve facilitado

### 1. Introducción



por la baja densidad de flotación del látex, lo que permite aislar los fagosomas en regiones del gradiente de sacarosa en los que no se detectan otros organelos celulares [31].

### 1. *Análisis proteómico de fagosomas aislados por espectrometría de masa*

Una estrategia que se puede utilizar para estudiar el proceso de maduración fagosomal se basa en el aislamiento de fagosomas y posterior identificación de marcadores de su maduración mediante el análisis de su proteoma por espectrometría de masa.

Mediante el aislamiento de fagosomas conteniendo LB a la que se le han acoplado PknG y variantes de la misma, y posterior identificación de las proteínas presentes en los mismos será posible evaluar el estado de maduración fagosomal en diferentes condiciones.

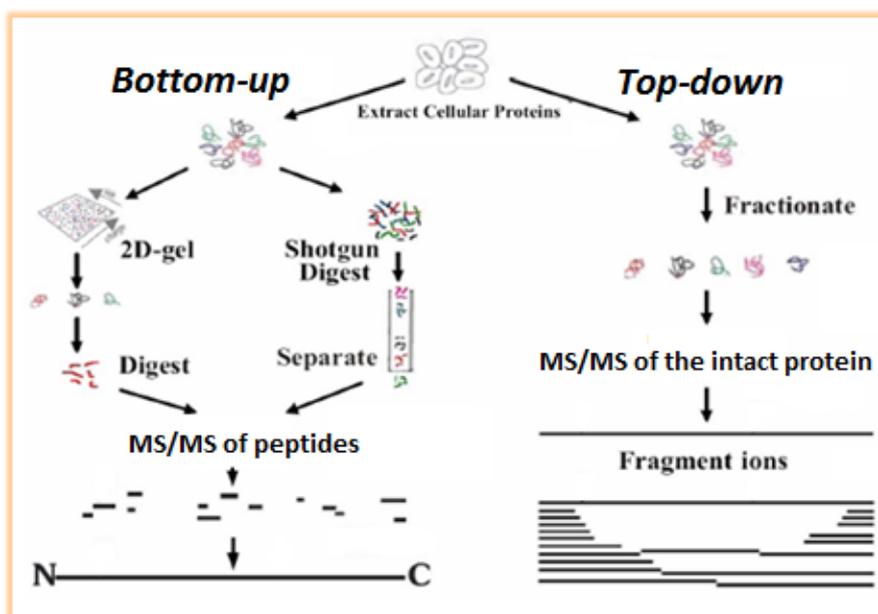
La espectrometría de masa es una técnica analítica que mide la relación masa/carga ( $m/z$ ) de iones moleculares en fase gaseosa, generados a partir de moléculas neutras. Involucra la generación de iones en fase gaseosa; su análisis de acuerdo a su relación  $m/z$ , y su posterior detección. Como resultado se obtiene una representación de la relación masa/carga en función de la intensidad de señal detectada [79]. Las estrategias fundamentales para la identificación de proteínas por espectrometría de masa se clasifican en *top-down* y *bottom-up* en función de si las pro-

## 1. Introducción



teínas son fragmentadas o no previo a su introducción al espectrómetro de masa. En el primer caso, los analitos introducidos en el analizador son péptidos generados por hidrólisis enzimática de una o más proteínas. Mientras que en una aproximación tipo *top-down* se introducen los iones moleculares de proteínas intactas (ver Figura 7) [79].

Dentro de las estrategias proteómicas comparativas *bottom-up* se diferencian dos aproximaciones: una aproximación clásica y una aproximación tipo *shotgun*.



**Figura 7 Estrategias proteómicas *bottom-up* y *top-down* utilizadas para la identificación de proteínas por espectrometría de masa. En la primera estrategia, las proteínas son identificadas a partir de MS/MS de los péptidos generados de la hidrólisis enzimática. La misma se puede realizar una aproximación clásica con geles 2D o una aproximación tipo *shotgun*. Por otra parte, en una aproximación tipo *top-down*, las proteínas son identificadas a partir de MS/MS de los iones moleculares de proteínas intactas. Adaptado de [80].**



a) *Aproximación clásica*

En la aproximación clásica de la proteómica *bottom-up*, las proteínas son separadas por su punto isoelectrico y su masa molecular mediante electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (2D-PAGE). Una vez resueltas las proteínas, generalmente los geles se tiñen con azul de Coomassie o nitrato de plata. La 2D-PAGE es una técnica de gran resolución, sin embargo, es laboriosa, de baja reproducibilidad y poco automatizada.

Existe una variante de la electroforesis bidimensional, denominada electroforesis diferencial en gel (DIGE) que evita los problemas de reproducibilidad asociados a un 2D estándar. A diferencia del 2D-PAGE en el que las proteínas son teñidas en el gel, en el DIGE primero se marcan las proteínas de cada muestra con diferentes fluoróforos, permitiendo así la comigración de muestras en un mismo gel [81]. La utilización de un sistema de detección de fluorescencia permite obtener una mayor sensibilidad que una tinción convencional y la comigración en un mismo gel reduce la variabilidad asociada a la técnica de 2D convencional. El DIGE incluye un estándar interno que permite que todas las muestras, incluso aquellas que corren en otros geles puedan ser fácilmente comparadas y cuantificadas. El estándar interno consiste en una mezcla de todas las muestras analizadas durante el experimento, y se corre en cada gel hasta con dos

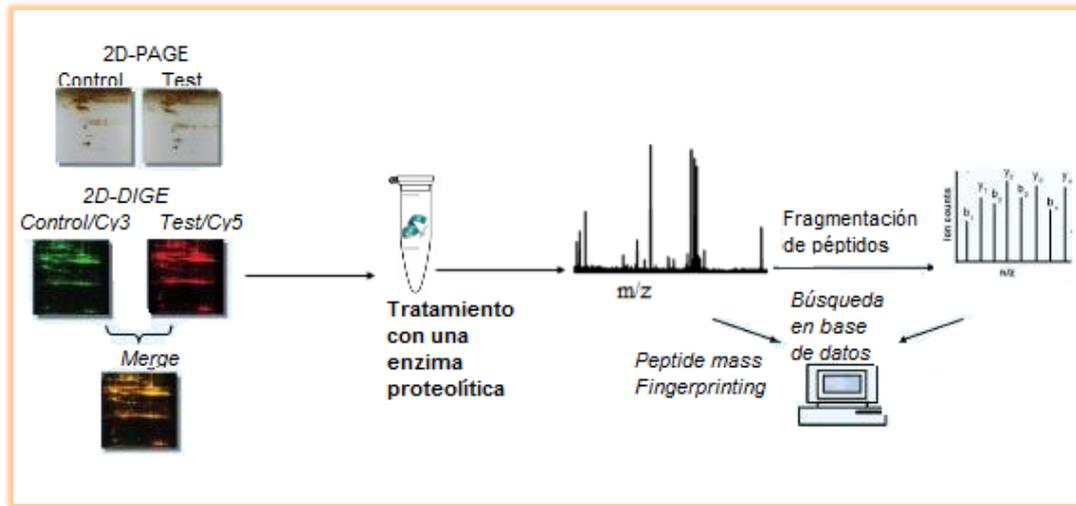
## 1. Introducción



muestras. Este hecho implica que existe un estándar para cada punto en el gel, y que todos los geles dentro del mismo experimento están cuantitativamente ligados [81].

Luego de la separación de las proteínas, ya sea por 2D-PAGE o por DIGE, se procede a escanear los geles y a realizar un análisis mediante un *software* adecuado. Se escinden las bandas de gel correspondientes a las proteínas de interés. Se extraen los péptidos por una hidrólisis enzimática y se analizan los péptidos generados mediante espectrometría de masa, frecuentemente, por MALDI-TOF (*Matrix Assisted Laser Desorption/ Ionization Time of Flight Mass Spectrometry*).

La identificación de las proteínas se lleva a cabo a partir de la comparación de las masas moleculares de péptidos trípticos (*peptide mass Fingerprinting*), o bien a partir del espectro de fragmentación de uno o más de sus péptidos, con masas teóricas obtenidas por una digestión *in silico* de secuencias disponibles en bases de datos [79].



**Figura 8** Aproximación clásica de la estrategia *bottom-up* en proteómica. Las proteínas, son separadas por 2D-PAGE y posterior tinción o por 2D-DIGE. Luego, se escanean y analizan los geles mediante un *software* adecuado. Se seleccionan y cortan los *spots* correspondientes a las proteínas de interés, se extraen los péptidos por una hidrólisis enzimática *in gel* y se analizan mediante espectrometría de masa. La identificación de las proteínas originales es llevada a cabo comparando las masas moleculares experimentales con masas teóricas obtenidas por una digestión *in silico* de secuencias disponibles en bases de datos.

### b) Aproximación Shotgun

La aproximación tipo *shotgun* de la proteómica *bottom-up*, combina la digestión enzimática de mezclas de proteínas, sin necesidad de una separación previa con el análisis basado en la espectrometría de masa (MS) y MS/MS [82] (ver Figura 9).

Los péptidos generados son separados mediante un sistema de cromatografía líquida (LC), que puede ser mono o multidimensional, a medida que eluyen son detectados y subsecuentemente fragmentados mediante un análisis de masa en tándem. En caso de muestras complejas

## 1. Introducción



se realizan separaciones bidimensionales de las proteínas, primero según su carga en una cromatografía líquida de intercambio catiónico y luego según su hidrofobicidad en una cromatografía líquida de fase reversa. Sin embargo, muestras de proteínas poco complejas como el proteoma fagosomal, pueden ser separadas en una cromatografía monodimensional utilizando una cromatografía líquida de fase reversa.

Los iones generados en la fuente de iones son continuamente registrados para generar un espectro de masa, a menudo referido como escaneo de exploración (MS). El espectrómetro de masa a continuación, selecciona automáticamente iones de péptidos detectados, llamados iones precursores, los aísla y somete a fragmentación activada por colisión con un gas inerte como el N<sub>2</sub> o el argón (CAD) y registra el espectro de masa de iones de fragmento resultantes (MS/MS) [82]. Luego, los espectros de iones de fragmento se asignan a sus correspondientes secuencias de péptidos [83], ya sea por los algoritmos de búsqueda de base de datos (método más común) [84], o de algoritmos *de novo*, que infieren la secuencia del péptido directamente del espectro [85].

Para la identificación precisa de los péptidos, a partir de sus espectros de fragmentación por algoritmos de búsqueda de base de datos, es necesario distinguir entre aquellas asignaciones correctas, de las que se han realizado al azar. La proporción estimada de falsos positivos en una

## 1. Introducción

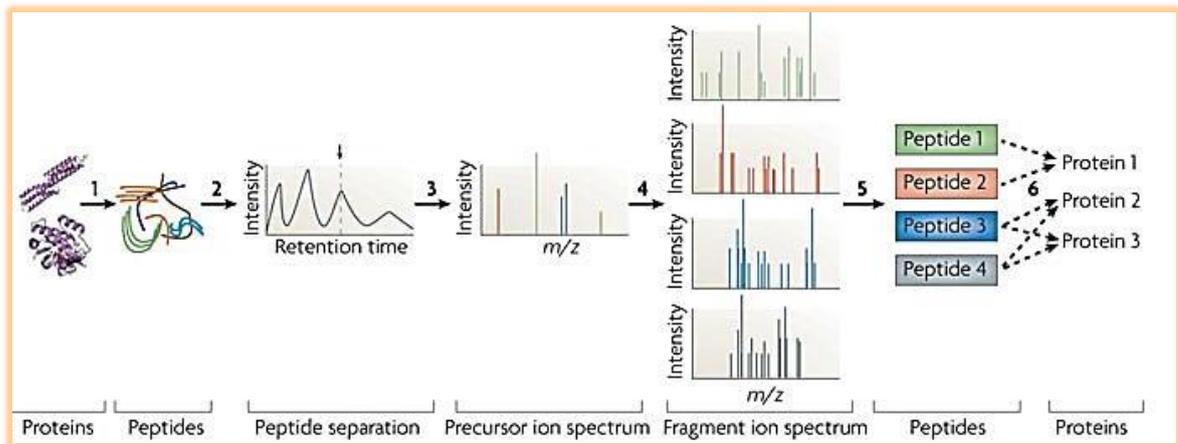


población de péptidos identificados se expresa por la tasa de asignaciones incorrectas o FDR (*false discovery rate*). El FDR es determinado a partir del número de asignaciones que se obtendría a partir de la misma colección de espectros en una búsqueda contra una base de datos señuelo compuesta por secuencias aminoacídicas invertidas (carboxilo terminal a aminoterminal) [86].

Finalmente, durante la inferencia de proteínas, el conjunto de las proteínas representadas por las asignaciones espectro-péptido se calculan. Este proceso es complejo, ya que algunos péptidos son compartidos entre diferentes proteínas y no permiten asignaciones de proteínas sin ambigüedades.

Por último, el número total de espectros que identifican péptidos procedentes de una determinada proteína se correlaciona linealmente con la abundancia relativa en la muestra de origen [87]. Este hecho permite realizar comparaciones cuantitativas de los niveles de proteína entre las muestras a partir de los recuentos espectrales de todos los péptidos de una proteína. Es importante tener en cuenta que la composición de un péptido determina sus propiedades fisicoquímicas, y puede afectar la eficiencia en la ionización del mismo, afectando su detección por MS, sesgando los coeficientes espectrales de recuento [88].

## 1. Introducción

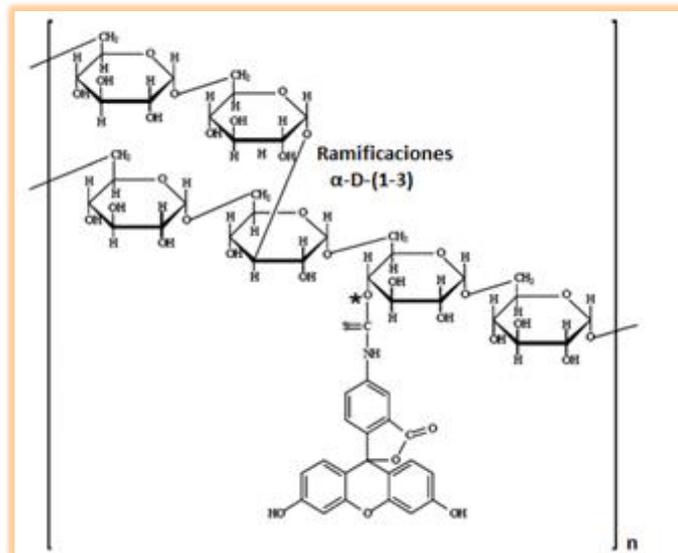


**Figura 9 Aproximación tipo *shotgun* de la estrategia *bottom-up* en proteómica** Las proteínas se escinden enzimáticamente en péptidos (paso 1) y son resueltos mediante una separación simple o multidimensional (paso 2). Los péptidos que eluyen de la columna de cromatografía se ionizan y son continuamente registrados para generar un espectro de masas, a menudo referido como escaneo de exploración (MS) (paso 3). Iones precursores individuales se seleccionan y son sometidos a una fragmentación activada por colisión (CAD), que genera un espectro de los fragmentos iónicos característico para cada secuencia peptídica (MS/MS) (paso 4). Durante el paso 5, los espectros de fragmentación se asignan a sus correspondientes secuencias de péptidos. Finalmente, se infieren las proteínas presentes (paso 6). Extraído de [89]



## 2. Microscopía de fluorescencia con LB y FITC-dextrano

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un modelo que utiliza LB y dextrano conjugado a isotiocianato de fluoresceína (dextrano-FITC) como sonda de cargado lisosomal. El dextrano, cuya estructura se observa en la Figura 10, consiste en un polímero de la anhidroglucosa que no es metabolizable por el macrófago y se acumula en los lisosomas celulares.



**Figura 10 Estructura de dextrano acoplado covalentemente a fluoresceína (dextrano-FITC).** Polímero de la anhidroglucosa compuesto de aproximadamente 95% de enlaces  $\alpha$ -D-(1-6), con ramificaciones  $\alpha$ -D-(1-3). Se asume que el sitio de unión de FITC puede ser asociado aleatoriamente a cualquier grupo hidroxilo. Extraído de [90].



En los experimentos realizados previamente por otros integrantes de la Unidad se procedió a acoplar a las LB PknG y variantes de eliminación de dominios de la misma; y a estudiar la colocación de las partículas fagocitadas por macrófagos murinos con la sonda de cargado lisosomal. Si una partícula fagocitada madura, ocurrirá una fusión con los lisosomas y la señal fluorescente de la fluoresceína rodeará a la LB. Por otra parte, si la maduración del fagosoma que contiene a la LB es inhibida, no colocalizará con la señal fluorescente. Finalmente, el experimentador procede a realizar un recuento de las LB positivas y negativas para el proceso de maduración fagosomal en cada condición. Mediante esta aproximación se demostró que PknG es capaz de ejercer un efecto inhibitorio en el proceso de maduración fagosomal [77].

Las imágenes obtenidas en microscopía de epifluorescencia superponen estructuras que están alineadas en el eje óptico. Por lo que esta metodología no permite diferenciar LB que han sido interiorizadas de las que se encuentran en planos superiores a la célula.

Por otro lado, discernir entre LB que maduraron o no a fagolisosomas es complejo debido a que la refringencia de las LB no se puede distinguir de la fluorescencia intrínseca de la partícula. Asimismo, los lisosomas que se encuentran dispersos en el citoplasma dificultan aún más esta distinción.

## 1. Introducción



### 3. Microscopía confocal con sondas fluorescentes LAURDAN y pHrodo®

Es posible estudiar el proceso de maduración fagosomal mediante microscopía láser confocal. La misma presenta ventajas frente a la microscopía óptica convencional de fluorescencia. Utiliza un microscopio bastante similar, sin embargo, la microscopía confocal permite obtener imágenes extremadamente nítidas de un único plano de interés iluminado. Esto es posible, gracias a que se coloca en el camino óptico una barrera opaca que deja pasar la luz por un pequeño orificio central (denominado *pinhole*). Esta barrera hace que la mayor parte de la luz que proviene de planos superiores e inferiores del plano del cual se desea obtener la imagen sea detenida y no llegue al detector del microscopio. Mediante la obtención de imágenes en planos focales adyacentes se puede realizar una reconstrucción en los ejes xz e yz que permite discriminar estructuras que están alineadas en el eje óptico. Esto es de especial interés para nuestro abordaje experimental ya que permite la distinción entre LB fagocitadas y no fagocitadas.

El LAURDAN (6-dodecanoil-2-dimetil-aminonaftaleno) es una sonda fluorescente de membrana, que puede ser utilizada para distinguir las LB extracelulares de las interiorizadas. Por otro lado, es sensible a la polaridad del entorno siendo utilizada para detectar cambios en las propiedades de fase de las membrana [91]. Como fue especificado previamente,

#### 1. Introducción



está reportada la ocurrencia de cambios en la composición de los fosfolípidos de membrana durante la maduración de los fagosomas (fagosomas tempranos están enriquecidos en fosfatidilcolina, mientras que fagosomas tardíos lo están en esfingomielinina) [41]. Por tanto, esta sonda no sólo sería útil para revelar la presencia de membrana alrededor de la LB sino que también permitiría evaluar modificaciones en la fluidez de la membrana del fagosoma durante el proceso de maduración.

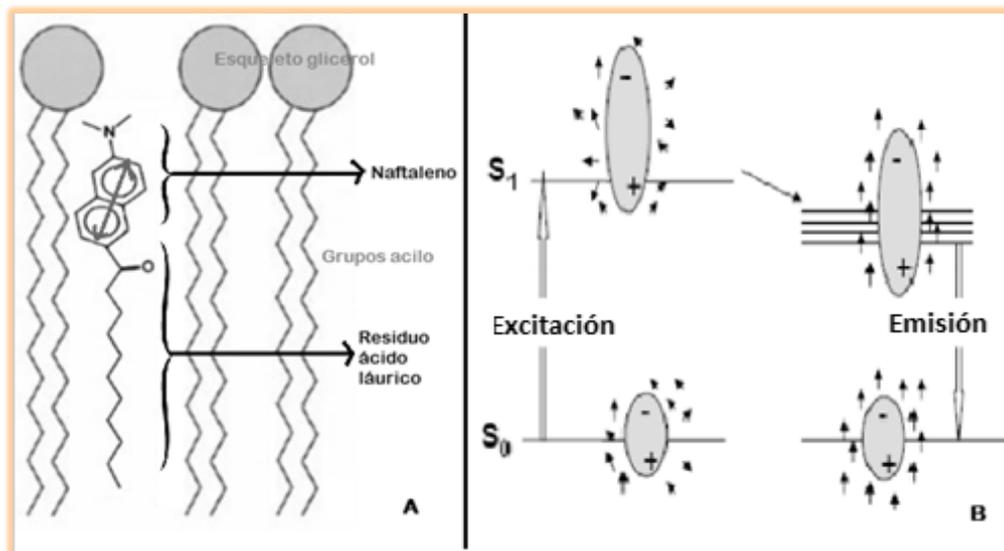
El LAURDAN se localiza en la región hidrofóbica de la bicapa fosfolipídica con la porción ácido láurico alineada en paralelo con las cadenas acilo de los fosfolípidos y el residuo naftaleno, localizado a nivel del esqueleto del glicerol de los fosfolípidos hacia el ambiente acuoso (ver Figura 11) [91]. El grupo naftaleno, fluoróforo del LAURDAN, presenta un momento dipolar permanente debido a la separación parcial de cargas entre el 2-dimetilamino y el 6-carbonilo [92]. En el estado excitado, el momento dipolar aumenta causando una reorientación de las moléculas de agua que lo rodean. La energía requerida para la reorientación de las moléculas de agua presentes en la interfase lipídica disminuye la energía del estado excitado emitiendo entonces a longitudes de onda mayores, fenómeno denominado relajación dipolar.

Variaciones en el contenido y/o movilidad de moléculas de agua presentes causan diferencias en los espectros de emisión del LAURDAN.

## 1. Introducción



El espectro de emisión del LAURDAN en una membrana rígida (lípidos en fase gel) tiene un máximo de emisión centrado en 440 nm, mientras que la emisión en una bicapa fluida (en fase líquido-cristalina) está centrada en 490 nm (ver Figura 12). Los cambios en el espectro de emisión asociados con la sensibilidad al solvente son cuantificados mediante el cálculo de GP (*Generalized Polarization*) [93].



**Figura 11 Estructura, ubicación y relación dipolar del LAURDAN** (a) Se observa la localización del LAURDAN en la membrana plasmática, con el residuo de ácido láurico incrustado en la membrana paralelamente a los grupos acilo de los fosfolípidos; mientras que el grupo naftaleno fluorescente se encuentra a nivel del esqueleto glicérol. En naranja se representa el momento dipolar del grupo naftaleno. (b) Diagrama que muestra los cambios en el momento dipolar del LAURDAN luego de la excitación desde el estado basal (S<sub>0</sub>) y su posterior relajación desde (S<sub>1</sub>). El corrimiento espectral de la emisión del LAURDAN ocurre cuando las moléculas de H<sub>2</sub>O (representadas como flechas) se reorganizan debido al aumento del momento dipolar del LAURDAN durante su excitación. Adaptado de [91].

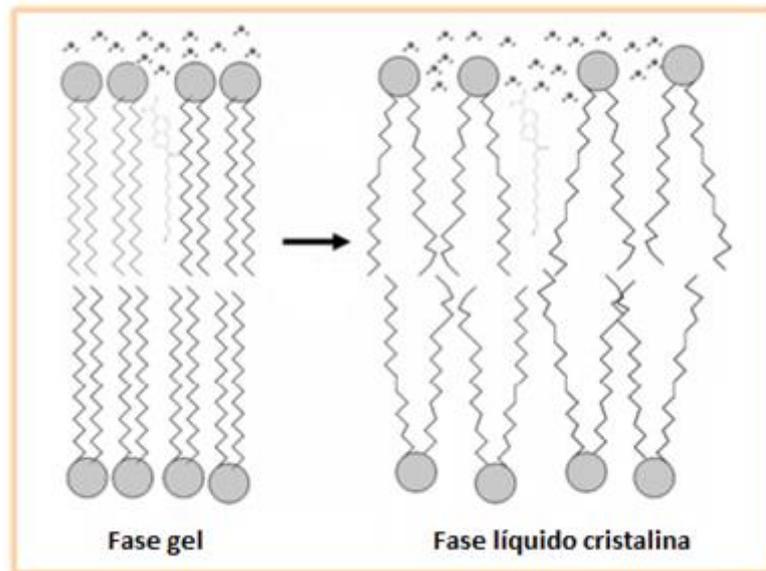
## 1. Introducción



El valor de GP varía entre -1 y +1. Valores altos indican una menor relajación dipolar lo cual implican un entorno más rígido. Se calcula:

$$GP = \frac{I_{440} - I_{490}}{I_{440} + I_{490}}$$

siendo  $I_{440}$  e  $I_{490}$  los máximos de intensidad a 440 nm y 490 nm respectivamente.



**Figura 12 Penetración de agua en membranas según el estado de agregación.** La transición de fases en membranas cambia el contenido de agua en la interfase lípido acuoso. El contenido de agua modifica el microentorno del grupo naftaleno, produciendo un corrimiento en el espectro de emisión de LAURDAN. Extraído de [94].

Esta metodología también incorpora una sonda fluorescente, denominada pHrodo<sup>®</sup> Red AM que funciona como indicador de pH. Es una sonda fluorescente, que se excita a 560 nm y emite a 585 nm, e incrementa dramáticamente su fluorescencia cuando el pH del medio que lo rodea se acidifica (tal y como se observa en la Figura 13) [95]. Tiene un  $pK_a$  ~6.5 y puede ser utilizado para cuantificar el pH celular en un rango

## 1. Introducción



de 4-9. Consiste en una molécula no cargada que puede penetrar las membranas celulares. Una vez dentro de la célula, esterasas celulares no específicas escinden grupos de bloqueo lipófilos, dando como resultado un compuesto que es retenido dentro del espacio intracelular [95].

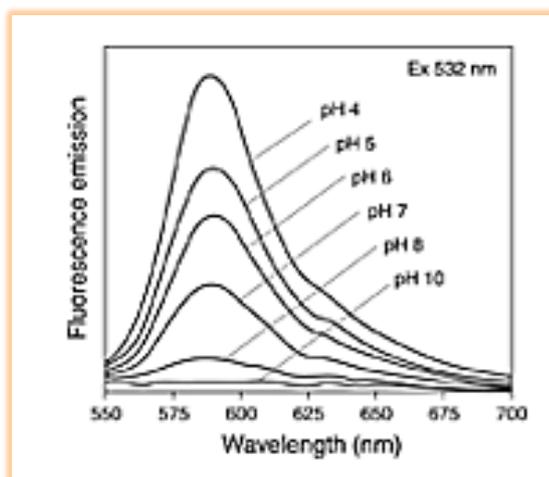


Figura 13 Espectro de emisión de pHrodo<sup>®</sup> Red. Extraído de [95].

La utilización de pHrodo<sup>®</sup> permite evaluar la acidificación de los compartimientos que contienen a las LB durante la maduración del fagosoma. La determinación de la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en fagosomas conteniendo LB a la que se le han acoplado PknG y variantes de la misma, permite realizar comparaciones relativas entre el nivel de acidificación en cada condición. El uso posterior del Kit de Calibración del pH intracelular (Thermo Scientific) permite que este pH sea cuantificado.

## 1. Introducción



## VI. Objetivos

### A. Objetivo general

*Resultados previos de nuestro laboratorio apuntan a que PknG, una quinasa de proteínas de Mycobacterium tuberculosis, es capaz de inhibir la maduración del fagosoma en un modelo de fagocitosis de partículas de látex.*

*El objetivo general del presente trabajo es explorar la utilidad de nuevas herramientas metodológicas para evaluar la maduración del fagosoma y su modulación por PknG.*

### B. Objetivos específicos

- 1. Evaluar modelos proteómicos para el análisis de la maduración fagosomal y su regulación por PknG.*
- 2. Evaluar la modulación de la maduración fagosomal por PknG mediante microscopía de epifluorescencia y confocal utilizando diferentes sondas fluorescentes.*

*Para ello se realizarán las siguientes actividades:*

- a) Producción de PknG como proteína recombinante, evaluación de su actividad e inhibición con inhibidores irreversibles.*
- b) Ensayos de fagocitosis y purificación de fagosomas para análisis proteómicos.*
- c) Ensayos de fagocitosis y análisis de la maduración del fagosoma por microscopía de epifluorescencia y confocal.*



## VII. Materiales y métodos

### A. Reactivos

Los reactivos generales de laboratorio, salvo cuando se especifique lo contrario, fueron adquiridos en Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, USA).

El ácido 9-octadecanoico (OA) fue comprado en Nu-Check Prep (Elysian, MN) y el ácido 9 y 10-nitro-octadeca-9-*cis*-enoico (OA-NO<sub>2</sub>) fue preparado como se describe en [76].

Las microcolumnas de fase reversa C18 (OMIX<sup>®</sup> Tips) para la preparación de la muestra para espectrometría de masa fueron adquiridas en Varian (Lake Forest, CA), y la tripsina grado secuenciación se obtuvo en Promega (Madison, WI, USA).

Las partículas de látex de poliestrieno fueron adquiridas en Molecular Probes<sup>®</sup>, el medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), la mezcla de antibióticos estreptomycin y penicilina (Pen Strep) y el suero fetal bovino en Gibco<sup>®</sup>. Las sondas fluorescentes utilizadas para microscopía pHrodo<sup>®</sup>, dextrano conjugado a fluoresceína-5-isotiocianato (FITC) y LAURDAN (6-Dodecanoil-N,N-dimetil-2-naftilamina) se obtuvieron de Molecular Probes<sup>®</sup>.



## B. Métodos

### 1. Producción y purificación de proteínas recombinantes

#### a) Producción y purificación de PknG

Se dispone en el laboratorio del plásmido pM20 para la expresión de PknG (Rv0410c), que fue amablemente cedido por el Dr. Pedro Alzari (Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur) [55]. Este plásmido codifica para PknG a la cual se le agregó una extensión de seis histidinas en el extremo amino terminal precedida por una secuencia que corresponde al sitio de corte para la proteasa del virus del mosaico del tabaco (TEV).

La cepa BL21 (DE3) de *Escherichia coli* fue transformada con el plásmido pM20. Las células transformadas se dejaron crecer por 24 horas a 30 °C en medio Luria Bertani suplementado con FeCl<sub>3</sub> 100 µM. Una vez transcurrido este período, los cultivos se centrifugaron a 5000 g por 30 minutos a 4 °C y se conservan a -20 °C hasta su uso. Los *pellets* de *E. coli* fueron resuspendidos en solución tampón de lisis (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 25 mM, NaCl 500 mM, glicerol 5%, imidazol 25 mM, pH 8,0) suplementado con inhibidor de proteasas (complete protease inhibitor cocktail, Roche). Para romper las células se utilizó un sonicador Branson Digital 250 (Danbury, CT, USA) y se realizaron cinco ciclos de sonicado (60 segundos ON, 60 segundos OFF) en hielo con una amplitud de 40%.

## Materiales y métodos



Los lisados fueron centrifugados a 26800 g por 1 hora, filtrados en filtros de 0,45  $\mu\text{m}$  y cargados en una columna de IMAC Ni<sup>2+</sup> HisTrap™ (GE Healthcare) de 5 mL equilibrada en solución tampón A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 25 mM, glicerol 5%, pH 8,0). La columna HisTrap™ (GE Healthcare) contiene una resina con níquel (Ni<sup>2+</sup>) coordinado que interacciona con la cola de seis histidinas presente en el extremo N-terminal de la proteína recombinante. Siguiendo la metodología indicada por el fabricante la proteína recombinante fue purificada aplicando un gradiente lineal de imidazol (25–400 mM) a un flujo de 2 mL/min. La cromatografía se realizó conectando la columna a un sistema de cromatografía líquida ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare).

Se verificó cuáles de las fracciones obtenidas contenían PknG por SDS-PAGE 12%. Se agruparon las fracciones y se dializaron durante 16 h a 4 °C, contra Tris-HCl 50 mM, NaCl 500 mM, glicerol 5%, pH 8,0. Se midió la concentración de proteínas por ensayo colorimétrico de Bradford. Se concentró hasta 15 mL utilizando un dispositivo de ultrafiltración Vivaspin (Sartorius) y se determinó la concentración de proteínas por absorbancia a 280 nm ( $\epsilon_{280\text{ nm}} = 0,904, 1\text{ g/L}$ ).

Posteriormente, PknG fue purificada mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare) equilibrada en 50 mM Tris-HCl, NaCl 250 mM, gli-



cerol 5%, pH 8,0. Se recolectaron las fracciones que corresponden al pico de PknG y se concentraron usando un dispositivo de ultrafiltración Vivaspin con un *cut-off* de masa molecular de 10 kDa (Sartorius). La proteína concentrada fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C. Su identidad fue confirmada por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF (4800 MALDI TOF/TOF, Abi Sciex) según se describe más adelante.

#### *b) Producción y purificación de GarA*

Se dispone en el laboratorio del plásmido PL383 que contiene la secuencia codificante de GarA con una etiqueta de hexahistidinas precedida por una secuencia que corresponde al sitio de corte para la proteasa TEV, que fue generado en el laboratorio del Dr. Pedro Alzari (Unité de Microbiologie Structurale, Institut Pasteur) [55].

La producción de GarA (Rv1827) se realizó en la cepa de *E.coli* BL21 (AI) transformada con PL383. Las células se cultivaron en medio Luria Bertani suplementado con glucosa 0,1% (w/v) y tetraciclina 10 µg/mL a 37 °C hasta  $DO_{600nm} = 0,6$ .

La expresión de GarA se indujo mediante el agregado de isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) 1mM y arabinosa 0,02% y se incubó a 22 °C por 18 horas. Luego, las células fueron recolectadas por



centrifugación y resuspendidas en solución tampón A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 500 mM, glicerol 5%, imidazol 25 mM, pH 8,0) suplementado con cocktail completo inhibidor de proteasas (Roche).

Análogamente a PknG, GarA primero se purificó por IMAC en una cromatografía de afinidad en una columna HisTrap<sup>TM</sup> Ni<sup>2+</sup> (GE Healthcare) la cual fue previamente equilibrada en solución tampón A ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  5 mM,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  50 mM, NaCl 500 mM, imidazol 25 mM, glicerol 5%, pH 8,0). La proteína recombinante se eluyó aplicando un gradiente lineal de imidazol de 20–400 mM, a un flujo de 2 mL/min. La cromatografía se realiza conectando la columna a un sistema de cromatografía líquida de proteínas ÄKTA Prime Plus (GE Healthcare).

Se verificó mediante SDS-PAGE cuales de las fracciones obtenidas contenían GarA. Se reunieron las fracciones y se cuantificaron las proteínas por Bradford. Luego, se dializaron durante 16 h a 18°C, contra Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5%, DTT 1 mM, pH 7,6, en presencia de la proteasa TEV en una relación 1:30 que remueve la etiqueta de poli-histidinas (His6). Se recuperó el dializado y se realizó una separación en una columna de agarosa Ni-NTA (Qiagen), donde quedan retenidas las colas de histidina y la TEV, ya que esta última también cuenta con una cola de histidinas. Se concentró hasta 5 mL utilizando Vivaspín y nuevamente se determinó la concentración proteica por Bradford.

## Materiales y métodos



Posteriormente, GarA fue purificada mediante una cromatografía de exclusión molecular en una columna HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) equilibrada en Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5%, pH 7,6 a un flujo de 1mL/min.

Se recolectaron las fracciones que corresponden al pico de GarA verificando su presencia por SDS-PAGE. Luego se concentraron conjuntamente usando un dispositivo de ultrafiltración Vivaspin con un *cut-off* de masa molecular de 10 kDa (Sartorius). La proteína concentrada fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C. Su identidad fue confirmada por espectrometría de masa de tipo MALDI-TOF (4800 MALDI TOF/TOF, Abi Sciex) según se describe más adelante.

## *2. Electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE).*

Las fracciones de los pasos de purificación se analizan por electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida en una dimensión (SDS-PAGE). Para ser analizadas por SDS-PAGE las muestras se mezclaron con solución tampón de carga (Tris-HCl 125 mM pH 6,75, glicerol 20%, dodecil sulfato sódico (SDS) 4%,  $\beta$ -mercapotetanol 0,05% y azul de bro-mofenol 0,002%), y se incubaron 10 minutos a 95 °C para llevar a cabo el tratamiento desnaturizante.



La separación de proteínas mediante SDS-PAGE se llevó a cabo de acuerdo a protocolos previamente descritos (Amersham Bioscience, 1999). Se preparó una solución madre de acrilamida 30% y bisacrilamida 0,8%, y se realizaron geles de poliacrilamida de 1 mm de espesor, con un porcentaje de entrecruzamiento de 5% para el gel concentrador y de 10%, 12% o 15% para el gel separador.

Posteriormente, se cargaron las muestras y el marcador de peso molecular preteñido tipo Rainbow (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo con solución tampón de corrida (glicina 0,192 M, SDS 0,1%, Tris-HCl 0,025 M, pH 8,3) y se empleó una cuba de electroforesis Hoefer SE 260 (GE Healthcare). La electroforesis se realizó a 10 mA/gel hasta que el frente de corrida llegó al gel separador, y luego a 20 mA/gel hasta la finalización de la misma.

### *3. Ensayo colorimétrico de Bradford*

La concentración de proteínas se determinó mediante el ensayo colorimétrico de Bradford. Se realizó una curva de calibración con diluciones seriadas de un estándar de seroalbúmina bovina (BSA). La absorbancia de las muestras y de la curva de calibración se midió a 595 nm, luego de una breve incubación a temperatura ambiente con el reactivo de Bradford.



#### 4. Preparación de la muestra para análisis por espectrometría de masa

##### a) *GarA* o *PknG*

Previo a los análisis por espectrometría de masa, la proteína fue desalada utilizando una micro-columna de fase reversa C18 (OMIX<sup>®</sup> Tips, Varian) y eluida directamente en la placa de MALDI utilizando ácido sinapínico como matriz (solución saturada en acetonitrilo-H<sub>2</sub>O 50%, ácido trifluoroacético (TFA) 0,2%).

##### b) *GarA* o *PknG* digerida con tripsina

La digestión proteolítica fue realizada por incubación de la proteína recombinante con tripsina en solución tampón bicarbonato de amonio 50 mM, pH 8,3, durante toda la noche a 37 °C. Se tomaron alícuotas de 1 µL de la muestra y se mezclaron con el mismo volumen de una solución saturada de la matriz ácido α-ciano-4-hidroxicinámico (CHCA, Sigma) TFA 0,1%, acetonitrilo 50%. Las muestras se colocaron directamente sobre la placa y se dejaron secar a temperatura ambiente.

Para minimizar la contaminación con queratinas humanas, todos los pasos de preparación de las muestras se llevaron usando guantes de látex sin talco en una cámara de flujo laminar (ESCO).



## 5. Espectrometría de masa

Las medidas de espectrometría de masa fueron realizadas en un espectrómetro de masa 4800 MALDI TOF/TOF Analyser, Abi Sciex, equipado con un láser de N<sub>2</sub> (337 nm). El *software* utilizado para la adquisición de los espectros fue 4000 Series Explorer (Applied Biosystems). Los espectros fueron externamente calibrados con una mezcla de péptidos de masa molecular conocida (Abi Sciex) y su procesamiento fue realizado en el *software* Data Explorer v. 4,9 (Applied Biosystems).

La masa molecular de una proteína sin digerir se determinó operando el equipo en modo lineal positivo. En cambio, los espectros de masa de una proteína recombinante digerida fueron determinados en modo reflector positivo. Se realizaron fragmentaciones de péptidos seleccionados por espectrometría de masa en tándem (MS/MS).



## 6. Búsqueda en base de datos e identificación de las proteínas recombinantes

Para la identificación de GarA y PknG recombinantes se compararon las masas moleculares de péptidos trípticos con masas teóricas obtenidas por una digestión *in silico* de secuencias disponibles en bases de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) usando el motor de búsqueda MASCOT (Matrix Science, <http://www.matrixscience.com>). Para ello se utilizó el método *Peptide Mass Fingerprint* de dicho motor de búsqueda y se incorporaron los siguientes criterios de búsqueda: todas las entradas taxonómicas, tolerancia de masa de péptidos  $\pm 0,03$  Da; se permitió la pérdida de un sitio de corte de la tripsina y se admitieron la oxidación de metioninas y fosforilación de Ser/Thr como modificaciones variables. Los datos fueron filtrados utilizando un límite de significancia para la identificación  $p < 0,05$  y un ion score  $> 30$ . Únicamente se consideraron identificadas aquellas proteínas en las que fueron encontrados dos o más péptidos.

## 7. Ensayos de fosforilación *in vitro*

Para determinar la actividad enzimática de PknG, la masa molecular de GarA recombinante fue determinada antes y después del ensayo de fosforilación *in vitro*. Las reacciones de fosforilación fueron llevadas a cabo en solución tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, conteniendo  $MnCl_2$  2 mM y ATP 100  $\mu$ M.

## Materiales y métodos



La actividad quinasa de PknG en cada una de las condiciones se evaluó utilizando GarA recombinante como sustrato como se reportó previamente [55]. Las mezclas de reacción fueron incubadas por 30 minutos a 37 °C en una relación enzima sustrato 1:20. La incorporación de un grupo fosfato en el sustrato se monitoreó por espectrometría de masa siguiendo el incremento masa molecular en 80 Da en la masa molecular de la proteína o en sus péptidos.

#### 8. Inhibición de PknG por OA-NO<sub>2</sub>

La inhibición de PknG *in vitro* se realizó utilizando el protocolo previamente reportado [74]. PknG fue incubada por 15 minutos a 25 °C con OA-NO<sub>2</sub> en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7,2, (en una relación molar OA-NO<sub>2</sub>: PknG 6:1). Como control, PknG fue expuesta al vehículo de OA-NO<sub>2</sub> (metanol) bajo las mismas condiciones.

Luego del tratamiento con el nitroalqueno, PknG fue incubada por 10 minutos a 25 °C con glutatión (GSH) 0,25 mM y se determinó la actividad enzimática. El exceso de GSH fue removido por microcromatografía de exclusión molecular Zeba™ Spin Desalting Columns (Thermo Scientific).



### 9. Cultivo de una línea celular de macrófagos (J774A.1).

Macrófagos murinos de la línea celular J774A.1 (obtenida de la American Type Culture Collection) fueron cultivados en medio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) suplementado con glutamina 4 mM, glucosa 4,5 g/L, penicilina 200 U/mL, estreptomina 100 g/mL y suero fetal bovino 10% inactivado por calor. Con el fin de preservar el material biológico utilizado, todos los procedimientos se realizaron en una cabina de flujo laminar en condiciones de esterilidad. Los cultivos fueron mantenidos en estufa a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5%.

### 10. Internalización de PknG en macrófagos

La internalización de PknG en el macrófago fue realizada utilizando el modelo de fagocitosis de partículas de látex (LB), disponible en nuestro laboratorio y descrito por Desjardins [40].

Concretamente, PknG y PknG inhibida con OA-NO<sub>2</sub> se unieron covalentemente a las LB mediante adsorción pasiva. Todas las situaciones fueron comparadas con el control que consistió en LB sin proteína acoplada, para el cual se espera que ocurra el proceso de maduración fagosomal. Se realizó un ensayo de actividad quinasa de las partículas de látex unidas a PknG en solución tampón HEPES 50 mM, pH 7,0, conteniendo MnCl<sub>2</sub> 2 mM y ATP 100 μM. A 2 hs de incubación a 37 °C, le siguió una digestión con tripsina en solución tampón bicarbonato de amonio 50

Materiales y métodos



mM, pH 8,3, durante toda la noche a 37 °C. Los espectros de masa fueron adquiridos en modo lineal.

Se realizaron experimentos de internalización de LB para la evaluación de la maduración del fagosoma (1) mediante una estrategia proteómica basada en el aislamiento de fagosomas; (2) utilizando FITC-dextrano y microscopía de epifluorescencia (3) utilizando las sondas LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup> y microscopía confocal.

Las diferentes clases de ensayos de fagocitosis realizados permitieron estudiar desde diferentes perspectivas el proceso de inhibición de la maduración del fagosoma llevado a cabo por PknG de *M. tuberculosis*.

*a) Adsorción y unión covalente de proteínas recombinantes a partículas de látex para su posterior internalización*

Las LB fueron acopladas a PknG nativa, o PknG inhibida con OA-NO<sub>2</sub> mediante adsorción pasiva (Invitrogen Latex Bead Protocols, <http://www.invitrogen.com/>). Una suspensión de LB (aproximadamente 2%) en solución tampón MES 25 mM fue incubada con una solución de las proteínas recombinantes a una concentración de 1 mg/mL con agitación suave a temperatura ambiente por 12 horas. La agitación previene que las partículas decanten y permite una unión adecuada.



Luego de la incubación, las partículas fueron centrifugadas, resuspendidas y lavadas sucesivas veces con bicarbonato de amonio 0,2 M frío para remover las proteínas no unidas, y se mantuvieron en hielo para su uso inmediato.

#### b) Fagocitosis

La internalización de las partículas de látex fue realizada en macrófagos con crecimiento con una confluencia aproximada de un 80% activados con lipopolisacárido de *E. coli* (LPS) (Cf = 23 ng/mL o 5 ng/mL) desde el día anterior.

Para la fagocitosis, el medio fue removido y reemplazado con medio DMEM que contenía LB (condición control LB, LB-PknG), y LPS (Cf = 23 o 5 ng/mL). Se incubó 10 minutos en hielo para permitir que las partículas de LB entren en contacto con las células. Luego, se incubó en estufa a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% por 30 minutos (pulso).

Se descartó el medio de todos los frascos, se lavó 2 veces con tampón fosfato salino (PBS) frío estéril. Se agregó medio termostatzado conteniendo LPS (Cf = 23 ng/mL o 5 ng/mL), sin LB. Se incubó en estufa a 37 °C, CO<sub>2</sub> 5% por 120 minutos (*chase*).



## 11. Aislamiento de fagosomas y análisis de las proteínas identificadas

Los ensayos de fagocitosis para aislamiento de fagosomas fueron realizados siguiendo el protocolo general descrito (ver más atrás), en frascos para cultivo celular con un área de crecimiento de 75 cm<sup>2</sup> (Corning). Se utilizaron tres frascos de estas características para cada condición.

### a) *Fraccionamiento subcelular para purificación de fagosomas*

El aislamiento de los compartimientos que contenían LB se realizó utilizando el método descrito por Desjardins [40]. Luego del *pulso* y del *chase* de las LB, las células fueron lavadas con PBS frío estéril (3 x 5 minutos) y raspadas con un rastrillo de plástico en PBS a 4 °C. Se obtuvo una suspensión celular en un volumen final aproximado de 4 mL.

Las células se centrifugaron por 10 minutos a 4°C y 1000 g. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 1 mL de tampón de homogenización (sacarosa 250 mM, imidazol 3 mM, pH 7,4) a 4 °C.

Nuevamente, se centrifugó por 10 minutos a 4 °C y 1000 g. Se descartó el sobrenadante y las células fueron resuspendidas en 400 µL de tampón de homogenización a 4 °C.

## Materiales y métodos



Las células fueron lisadas utilizando una jeringa descartable de 1 mL con aguja de 26G. La homogenización fue realizada hasta que el 80% de las células fueran lisadas sin una rotura mayor del núcleo, monitoreado por microscopía óptica. Esta técnica se encontraba puesta a punto en el laboratorio.

Se centrifugó por 10 minutos a 4 °C y 800 g, de manera tal de generar un *pellet* enriquecido en núcleos y células sin lisar. Se recuperó el sobrenadante que contenía los compartimientos que contenían a las LB (fagosomas).

Los fagosomas fueron purificados por flotación luego de ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa. El gradiente fue armado agregando cuidadosamente 0,75 mL de sacarosa 62%, 0,75 mL de sacarosa 35%, 1,5 mL de sacarosa 25% y 1,5 mL de sacarosa 10%. Se agregaron 400 µL de la muestra por encima del gradiente. Se ultracentrifugó por 60 minutos a 4 °C y 100.000 g en un rotor tipo canasto oscilante (Sorvall Discovery M120, S52ST). Los fagosomas fueron recolectados de la interfase entre las soluciones de sacarosa 10% y 25%, fueron resuspendidos en PBS frío estéril y centrifugados por 15 minutos a 4 °C y 40.000 g en el rotor SW 28. Los *pellets* fueron almacenados a 4 °C.



b) *Análisis de muestras de fagosomas*

(1) Purificación y concentración de proteínas

La purificación y concentración de proteínas fagosomales se realizó usando el kit comercial 2-D Clean-Up Kit (GE Healthcare) según el protocolo del fabricante. Las muestras se resuspendieron en 25  $\mu$ L de buffer de carga para SDS-PAGE (Tris-HCl 125 mM pH 6,8, SDS 4%, glicerol 20%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,05% y azul de bromofenol 0,002%), y se incubaron 10 minutos a 95 °C para llevar a cabo el tratamiento desnaturalizante.

(2) SDS-PAGE

La separación de proteínas por SDS-PAGE se realizó según 2. Para la preparación de proteínas para su posterior análisis por espectrometría de masa utilizando una aproximación del tipo *shotgun* se dejó que las muestras migrarán en el gel separador hasta aproximadamente 1 cm.

(3) Fijación y tinción con Coomassie Blue G-250

Se removieron los geles de los *cassettes* y se colocaron en una solución de fijación con agitación durante 10 minutos (etanol 50% y ácido acético 10%). Las bandas proteicas se visualizaron por tinción con azul de Coomassie G-250. Se removió el fijador y se colocó la solución coloidal por 5 minutos para realizar un marcado superficial y detectar en dónde estaban las proteínas. Se realizaron lavados con H<sub>2</sub>O miliQ para remover la tinción residual.



Se cortaron las bandas con un bisturí limpio en la cámara de flujo laminar y se transfirieron a un tubo eppendorf de 1,5 mL. Los geles fueron equilibrados mediante múltiples incubaciones con una solución bicarbonato de amonio 0,2 M pH 8,0/acetronitrilo (1:1 v/v) de 30 minutos a 1400 rpm.

(4) Digestión trípica en el gel

Se agregó a los tubos una solución de tripsina (Promega) 0,1 µg/µL en 67 mM de bicarbonato de amonio pH 8,0, y fueron incubados *overnight* a 37 °C.

(5) Extracción de los péptidos trípicos

Las muestras fueron incubadas durante una hora a 30 °C bajo agitación continua (1400 rpm) con la solución de extracción (acetronitrilo 60%, TFA 0,1%). Se recolectaron los sobrenadantes de cada etapa de extracción en un mismo tubo, y se concentraron por centrifugación bajo vacío (Speed Vac) por 45 minutos a 30 °C hasta un volumen final de 20 µL, de manera de evaporar el acetronitrilo de la muestra pero evitando su desecación.

(6) *Purificación* de la muestra y concentración en microcolumnas

Las muestras fueron desaladas utilizando microcolumnas de fase reversa C18 (OMIX Pippete tips, Varian). Las columnas se activaron con 20 µL de acetronitrilo 50%, se equilibraron con 20 µL de TFA 0,1%, luego



se aplicó la muestra. Posteriormente, se lavó con 10  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1%, y se procedió a eluir los péptidos con 20  $\mu\text{L}$  de TFA 0,1% en acetonitrilo.

Las muestras se concentraron por centrifugación bajo vacío (Speed Vac) a 30 °C hasta desecación. Se agregan 10  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico (FA) 0,1%, se realizaron tres ciclos de sonicación de 5 minutos en un sonicador (Branson 200) y se almacenaron a -20 °C.

#### (7) LTQ

Las muestras fueron inyectadas en un sistema nano-HPLC (Proxeon EasynLC, Thermo Scientific) equipado con una columna de fase reversa (EASY-Spray™ 50 cm  $\times$  75  $\mu\text{m}$  ID, PepMap RSLC C18, 2  $\mu\text{m}$ , Thermo Scientific); y fueron eluidas con FA 0,1% (v/v) en un gradiente lineal de agua a acetonitrilo (0-60%) en 60 min a un flujo de 400 nL/min.

La detección/análisis fue realizada en un espectrómetro de masa ESI-trampa iónica, compuesto por un sistema nanoHPLC y una trampa iónica lineal, modelo LTQ Velos (Thermo Scientific). Los péptidos fueron detectados en modo de adquisición dependiente de los datos MS/MS, un escaneo completo (*FullScan*), fue seguido por 10 eventos consecutivos de MS/MS de las 10 señales más intensas en cada segmento, utilizando una lista de exclusión dinámica de 45 segundos, de forma de evitar la fragmentación repetida de las señales mayoritarias.



La identificación de proteínas fue llevada a cabo con el programa PatternLab for Proteomics mediante la comparación de los espectros (MS/MS) de la fragmentación experimental de los péptidos resultantes de la digestión proteolítica con espectros teóricos, derivados de la digestión *in silico* de todas las proteínas contenidas en el proteoma de *Mus musculus*. La versión 10 de mayo, 2015 del proteoma de referencia de *M. musculus* fue descargada de la base de datos de proteínas Universal Protein Resource (UniProt) (<http://www.uniprot.org/proteomes/UP000000589/>) en formato FASTA. El PatternLab for Proteomics se utilizó para generar una base de datos señuelo conteniendo: secuencias aminoacídicas invertidas (carboxilo terminal a aminoterminal) a partir de la base de datos UniProt así como las secuencias de 127 proteínas contaminantes que aparecen frecuentemente en experimentos proteómicos [96].

Para la búsqueda se utilizaron los siguientes criterios: enzima utilizada tripsina, masas monoisotópicas, se permitió la pérdida de un sitio de corte de la tripsina, la tolerancia de masa del ion precursor de  $\pm 800$  ppm y se admitió la carbamidometilación de cisteínas como modificación fija así como la oxidación de metioninas y la fosforilación de Ser/Thr como modificaciones variables.

La FDR se determinó a partir del número de asignaciones que se obtendría a partir de la misma colección de espectros en una búsqueda

## Materiales y métodos



contra la base de datos señuelo previamente generada y se estableció como criterio aceptable que la FDR fuese menor al 1% a nivel de proteína.

### 12. Microscopía de epifluorescencia utilizando FITC-dextrano

Los ensayos de fagocitosis para ser analizados por microscopía de epifluorescencia fueron realizados siguiendo el protocolo general descrito (ver más atrás), y fue realizado en cámaras de cultivo de 8 pocillos desmontables, *chamber slide* de plástico en un  $V_f = 200 \mu\text{L}$ .

Para estudiar el proceso de fagocitosis se utilizó la sonda fluorescente isotiocianato de fluoresceína conjugada a dextrano (FITC-dextrano). El FITC-dextrano ( $C_f = 0,5 \mu\text{g/mL}$ ) fue agregado el día previo a la fagocitosis junto con el LPS ( $C_f = 23 \text{ ng/mL}$ ).

Luego del *chase* las células fueron lavadas dos veces con PBS frío estéril, fijadas con una solución 3,7% de formaldehído y nuevamente lavadas dos veces con PBS. Los núcleos de las células fueron teñidos con la sonda fluorescente 4',6'diamidío-2-fenilindol (DAPI) a una concentración final 300 nM recomendada por el fabricante (Invitrogen).

El montaje del preparado se realizó utilizando ProLong<sup>®</sup> *antifade* (Invitrogen). Los preparados se dejaron secar protegidos de la luz y fueron



sellados con esmalte de uñas. Finalmente, fueron guardados preservados de la luz a 4 °C hasta su observación utilizando un microscopio de epifluorescencia (Olympus IX81), usando un objetivo 100X NA 1,40 de inmersión en aceite y los filtros MNUA2 (excitación 360-370 nm/emisión 420-460 nm) para DAPI y U-MNIBA3 (excitación 470-495 nm/emisión 510-550 nm) para FITC. Asimismo, se obtuvieron imágenes en campo claro. Las imágenes fueron adquiridas con el *software* SCOPE-PRO y procesadas en Image J<sup>®</sup> (NIH).

En la Figura 14 se esquematiza el procedimiento utilizado para evaluar la maduración del fagosoma mediada por PknG mediante microscopía de epifluorescencia.

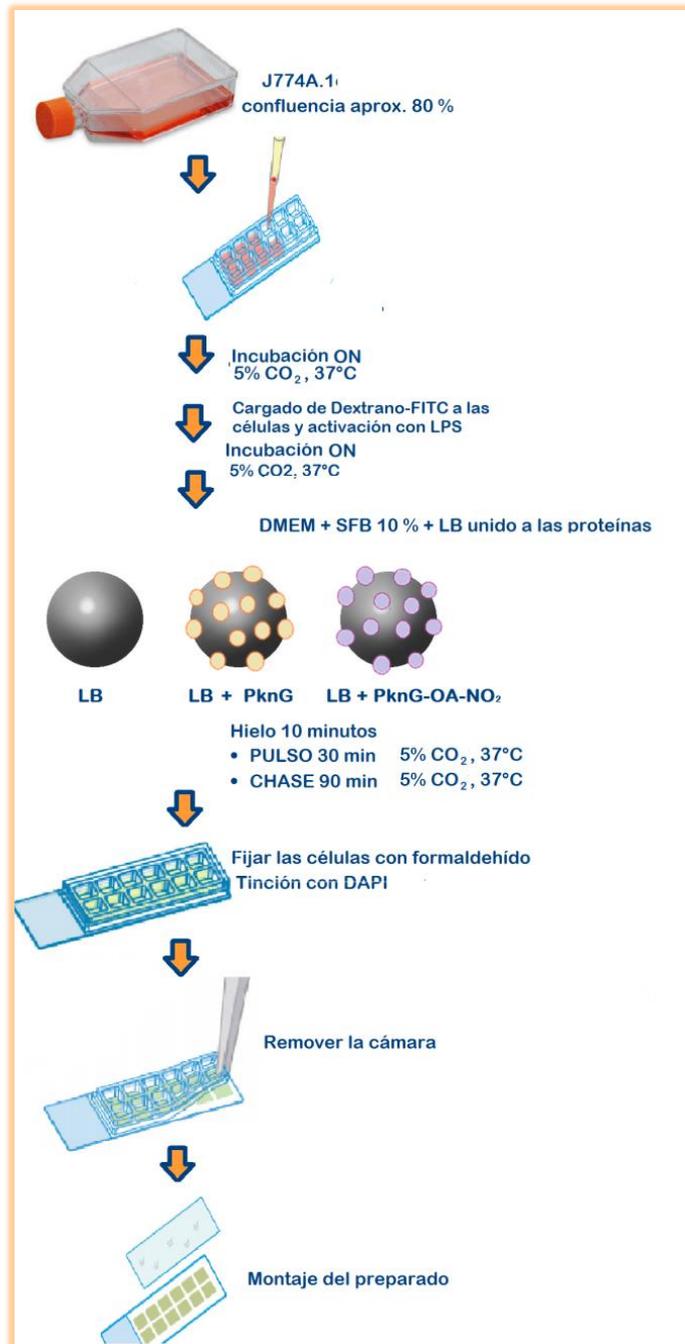


Figura 14 Esquema de la obtención del preparado para microscopía de epifluorescencia para la evaluación de la maduración del fagosoma mediada por PknG.



### 13. Microscopía confocal utilizando sondas fluorescentes.

La maduración de los fagosomas en las diferentes condiciones se siguió *in vivo* mediante microscopía confocal usando distintas sondas fluorescentes. Los experimentos fueron realizados en un microscopio confocal Leica TCS SP5, con *software* Leica LAS disponible en el Institut Pasteur de Montevideo. El equipo cuenta con una cabina con controlador de temperatura y CO<sub>2</sub>, fijándose a 37 °C y CO<sub>2</sub> 5% respectivamente.

Se utilizó un indicador de pH (pHrodo<sup>®</sup>) y una sonda que se incorpora a las membranas y permite detectar y seguir cambios en la composición de las mismas (LAURDAN).

Los ensayos de fagocitosis *in vivo* fueron realizados en un Vf = 1 mL siguiendo el protocolo general descrito (ver más atrás), y fue realizado en una placa de Petri de 35 mm con un fondo de vidrio de diámetro 14 mm (MatTek Corporation).

Las sondas utilizadas fueron agregadas una hora antes de realizar el cambio a un medio con LB. El LAURDAN fue utilizado a una Cf = 4,7 μM y el pHrodo<sup>®</sup> a Cf = 0,5 μM. Luego del agregado de las sondas, se agitó suavemente para asegurar un buen mezclado. Para la fagocitosis, el medio fue removido y reemplazado con medio DMEM sin rojo fenol que contenía LB (LB-control, LB-PknG, LB-OANO<sub>2</sub>), y LPS (Cf = 5 ng/mL). Se



incubó 10 minutos en hielo para permitir que las partículas de LB entren en contacto con las células.

Los 30 minutos de pulso (37 °C, CO<sub>2</sub> 5%), fueron realizados en el microscopio, permitiendo su observación en paralelo.

Se descartó el medio, se lavó 2 veces con solución tampón fosfato salino (PBS) frío estéril. Se agregó medio termostatizado sin rojo fenol, ni LB que contenía LPS (Cf = 5 ng/mL).

Luego se incubó a 37°C, CO<sub>2</sub> 5% por 120 minutos (*chase*) en el microscopio registrando paralelamente el proceso de fagocitosis. El *software* LASAF permite la adquisición y el procesamiento de las imágenes.

Se seleccionó un objetivo de inmersión en agua 60x/1,2 NA. Para el caso de las medidas de LAURDAN se utilizó el láser de UV a 405 nm con una potencia de 40%, y para el pHrodo<sup>®</sup> el láser HeNe de 594 nm con una potencia de 30%. El LAURDAN fue detectado activando dos fotomultiplicadores con un *pinhole* de 200 µm de diámetro. Se colectó la emisión de un canal azul con un rango de detección entre 415-460 nm y de un canal verde entre 460-530 nm, activando también el detector de luz transmitida. Por otra parte, la emisión del pHrodo<sup>®</sup> se colectó entre 604-750 nm con un *pinhole* de 150 µm de diámetro.



Las imágenes fueron adquiridas en un formato de 512 × 512 píxeles, con una velocidad de escaneo de 8000 Hz. Se tomaron imágenes en el eje Z de 0,5 µm de manera de poder realizar reconstrucciones posteriores. El procesamiento de imágenes fue realizado con el *software* Image J<sup>®</sup>.

Para el análisis de LAURDAN, se obtuvieron dos imágenes simultáneas de las células observadas en el canal del azul (415-460 nm) y verde (460-530 nm). Luego, se creó un *merge* de ambos canales.

Para el análisis del pHrodo<sup>®</sup>, se determinó la suma de la intensidad de fluorescencia del área que abarca cada LB en las diferentes planos del Z. Teniendo en cuenta que el diámetro de una LB son 4 µm y que los *stacks* fueron obtenidos cada 0,5 µm, para cada LB se determinó la intensidad de fluorescencia mediante una proyección de máxima intensidad de los 10 cortes en el eje Z que contenían la LB. La herramienta *Orthogonal views* del programa Image J<sup>®</sup> mediante la reconstrucción de las imágenes en el eje xz e yz facilita la determinación de la región de interés desde la imagen *merge* de LAURDAN. Luego, de obtenida la proyección se determinó la intensidad de fluorescencia de las LB determinando el área integrada de una esfera de 4,5 µm de diámetro.



Para determinar la fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en cada condición se tuvo en cuenta que pequeñas variaciones en la concentración de sonda empleada generarían variaciones significativas en la intensidad de fluorescencia. Como consecuencia, para eliminar esta variación interexperimental se determinó una intensidad de fluorescencia relativa a la fluorescencia celular, ya que no es esperado que regiones celulares distantes a la LB experimenten variaciones en su pH.

$$IF_{relativa} = \frac{IF_{LB}}{C}$$

Siendo C, el promedio de la intensidad de fluorescencia de las tres regiones más ácidas y las tres más básicas de cada célula (se consideró un diámetro de esfera de 1  $\mu\text{m}$  para cada medida).

En la Figura 15 se esquematiza el procedimiento utilizado para evaluar la maduración del fagosoma mediada por PknG mediante microscopía confocal.

• • •

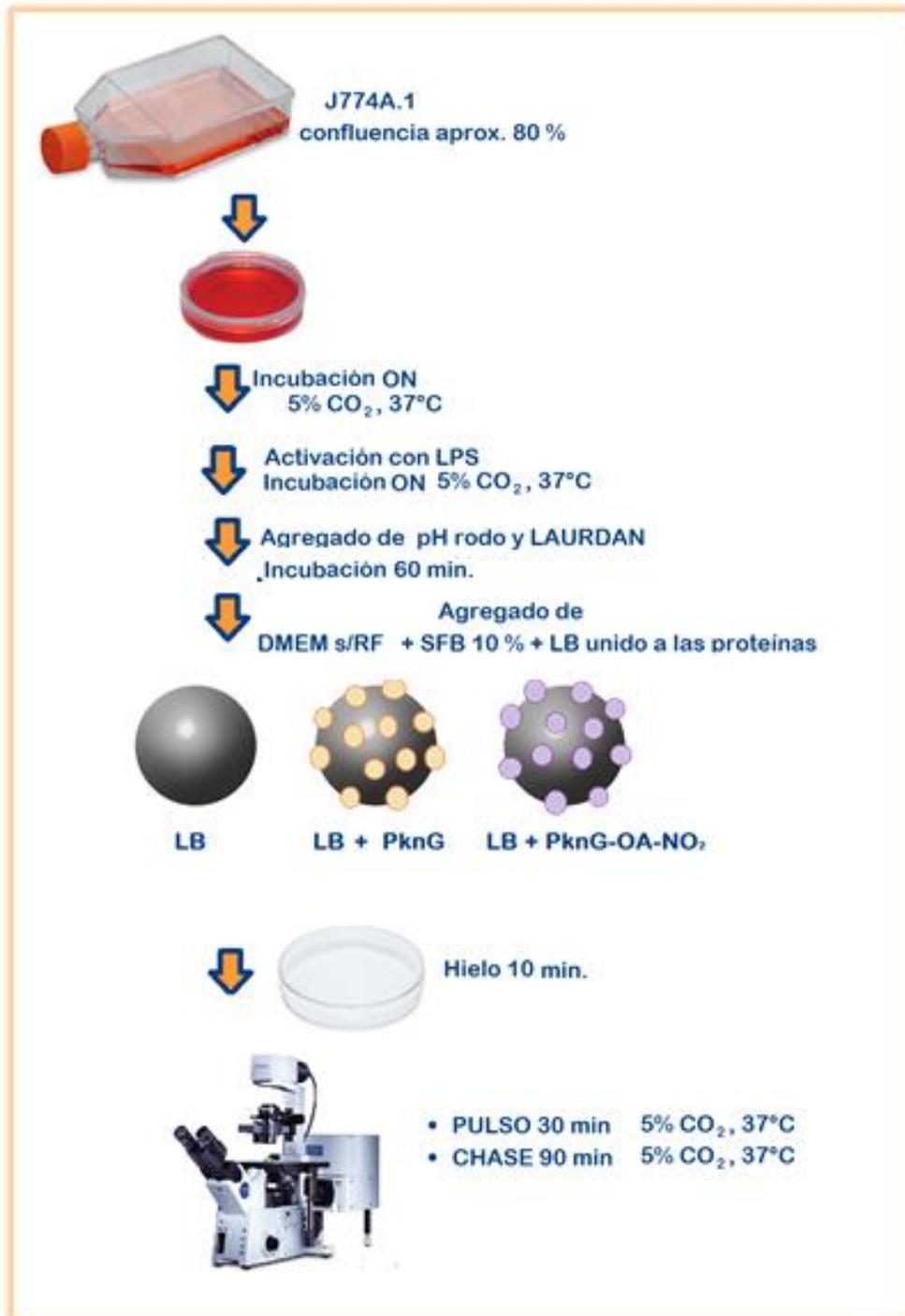


Figura 15 Esquema de la evaluación de la maduración del fagosoma mediada por PknG mediante microscopía confocal.



## VIII. Resultados

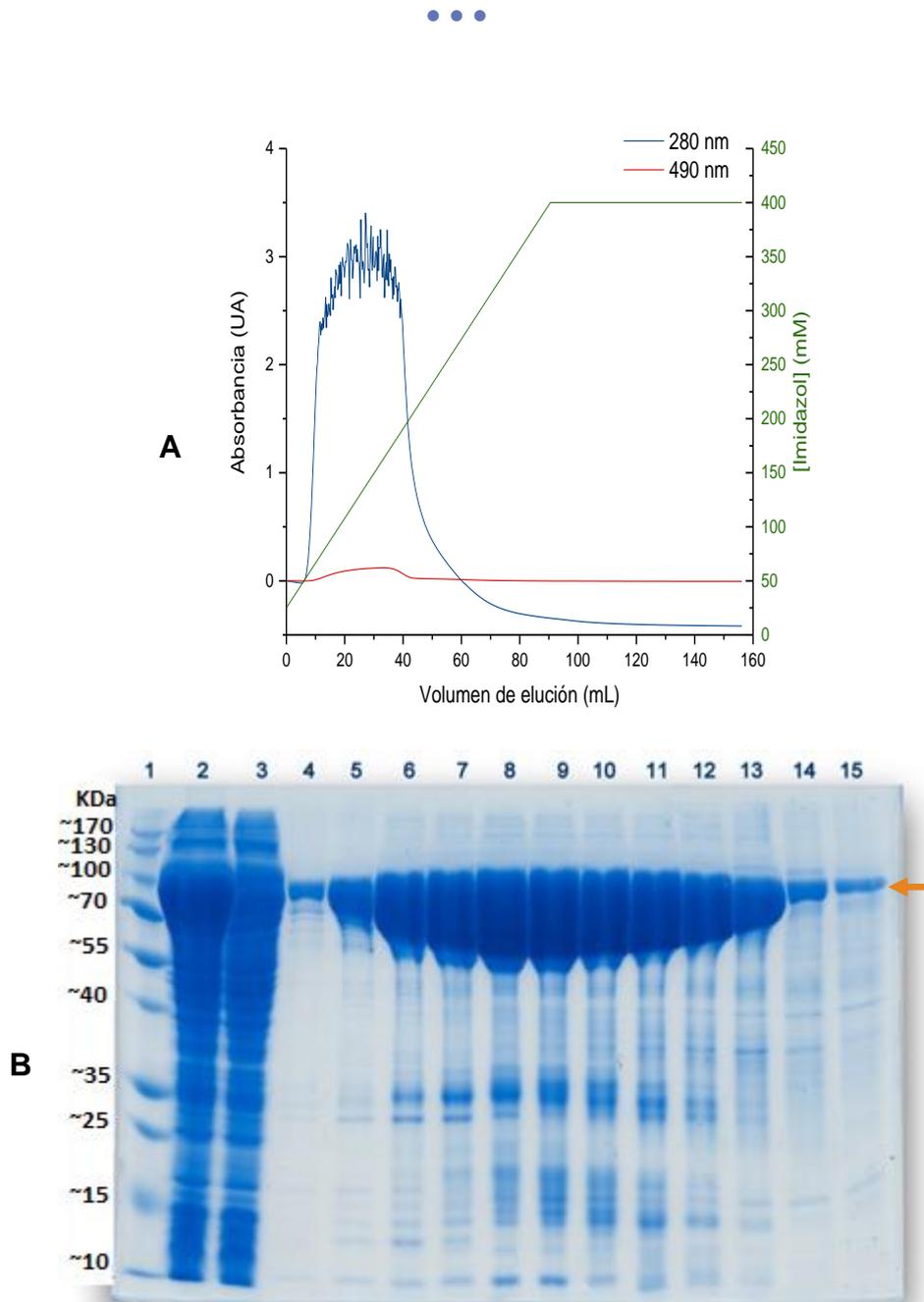
### A. Producción y purificación de proteínas recombinantes

#### a) Purificación de PknG de *M. tuberculosis*

PknG de *M. tuberculosis* fue expresada a partir del plásmido pM20 en *Escherichia coli* BL21 (DE3). Se realizó una purificación por afinidad a níquel de la fracción soluble del lisado bacteriano en una columna IMAC Ni<sup>2+</sup>, y las fracciones de proteína retenidas en la columna fueron eluidas empleando un gradiente lineal de imidazol (como se observa en la Figura 16 a). La cromatografía se siguió por la medida de absorbancia a 280 nm, longitud de onda a la que absorben los residuos aromáticos de las proteínas y a 490 nm debido a las propiedades espectroscópicas del dominio rubredoxina [97]. Se puede observar que PknG eluyó en el pico presente entre 10-50 mL del volumen de elución.

Asimismo, se verificó cuáles de las fracciones obtenidas contenían PknG por SDS-PAGE 12% (ver Figura 16 b). En los carriles que corresponden a las eluciones se observa una banda cuya masa molecular corresponde a PknG (82 kDa). Sin embargo, también se observan bandas de menor y mayor masa molecular por lo que se requirió de un segundo paso de purificación por gel filtración para aumentar la pureza de la proteína recombinante producida.

### Resultados



**Figura 16** Primera etapa de purificación de PknG por cromatografía de afinidad (IMAC-Ni<sup>2+</sup>). (a) Cromatograma de elución. Se siguió la elución por absorbancia a 280 (en azul) y 490 nm (en rojo). La proteína recombinante fue eluida en un gradiente lineal de imidazol de 25 a 400 mM (en verde) en 45 minutos a un flujo de 2 mL/min. El pico entre 10-50 mL del volumen de elución se corresponde con las fracciones donde eluye PknG. (b) SDS-PAGE (12%) de las diferentes fracciones obtenidas: Carriles: 1) marcador de peso molecular PageRuler™: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 2) fracción soluble del lisado bacteriano (SN); 3) fracción no unida a la columna (FT); 4-15) fracciones eluidas representativas. La flecha indica la banda correspondiente a PknG.

## Resultados



En la fracción soluble del lisado bacteriano (SN) (carril 2 Figura 16 b) se observa el perfil de proteínas presentes antes de pasar por la IMAC, es destacable la presencia de una banda intensa (lo que implica una gran concentración) a la altura correspondiente a la masa molecular de PknG. Sin embargo, en el percolado, dicha banda disminuye su espesor sugiriendo que PknG fue exitosamente retenida en la columna.

Se agruparon las fracciones que contenían PknG (40 mL), y se determinó la concentración de proteínas por ensayo colorimétrico de Bradford. Se obtuvo una concentración de proteínas de 10 mg/mL. Se dializó, concentró por ultrafiltración hasta 15 mL y se determinó nuevamente la concentración por absorbancia a 280 nm ( $\epsilon_{280 \text{ nm}} = 0,904, 1 \text{ g/L}$ ). Se obtuvo una concentración de proteínas de 8,7 mg/mL.

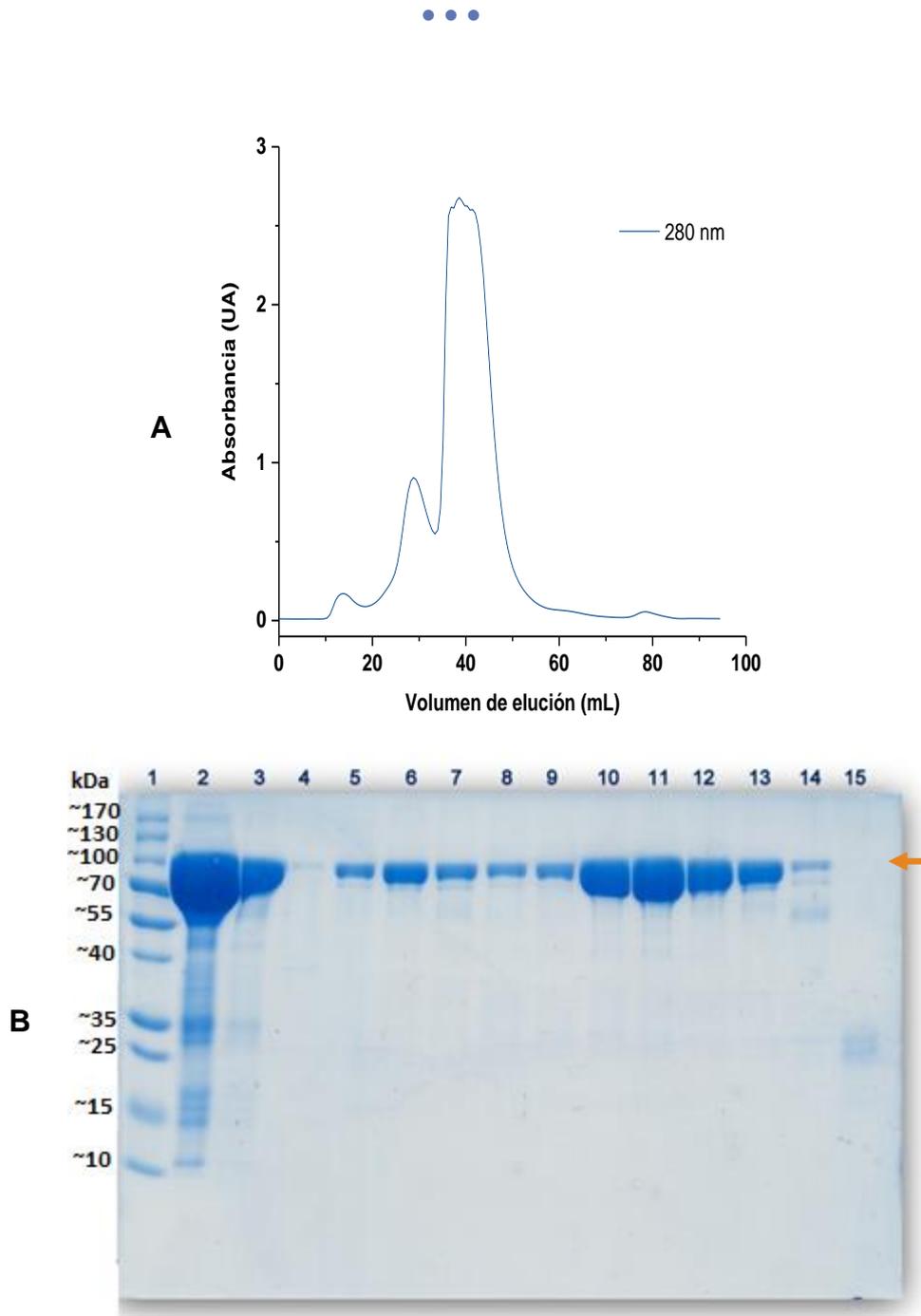
Como segundo paso de purificación de PknG, se realizó una cromatografía de exclusión molecular que se siguió por la medida de absorbancia a 280 nm (ver Figura 17 a). En el cromatograma se observa un pico principal a un volumen de elución de 40 mL, y un pico secundario a un volumen de elución de 30 mL que corresponden a dímeros y monómeros de PknG respectivamente. Se realizó una SDS-PAGE (12%) de las distintas fracciones obtenidas durante la gel filtración (ver Figura 17 b). Se puede observar una banda correspondiente a la masa molecular de PknG (82 kDa) en las eluciones. Asimismo, ya no se observan las bandas

## Resultados



correspondientes a proteínas de menor y mayor masa molecular presentes en el gel obtenido durante la IMAC y en el dializado. El hecho de que se observe una única banda durante la electroforesis es indicativo de un proceso de purificación exitoso. Se recolectaron las fracciones correspondientes a los picos de PknG, se concentraron por separado y se determinó su concentración proteica. De esta manera se obtuvieron dos fracciones, la primera de un volumen de 1 mL y concentración de proteínas de 8,5 mg/mL, y la segunda, de 4 mL y concentración de 27 mg/mL.

La proteína concentrada fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C. Su identidad fue confirmada por espectrometría de masa. Se obtuvo el espectro de masa de la proteína digerida con tripsina medido en modo reflector positivo y utilizando CHCA como matriz (Figura 18). El espectro obtenido se comparó con masas teóricas obtenidas de digestiones *in silico* de secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI utilizando el motor de búsqueda MASCOT. Se identificó PknG con un score de 194 y una cobertura de secuencia de 63%. En la Figura 19 se observan los péptidos trípticos identificados.



**Figura 17** Segunda etapa de purificación de PknG por gel filtración. (a) Cromatograma de elución. La columna utilizada fue la HiLoad 26/60 Superdex 200 prep grade (GE Healthcare). PknG eluye en forma un pico principal a un volumen de elución de 40 mL en forma monomérica, y un pico secundario a un volumen de elución de 30 mL en forma dimérica. (b) SDS-PAGE (12%) de las diferentes fracciones obtenidas: Carriles: 1) marcador de peso molecular PageRuler™: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 2) dializado; 3) inyección (dilución 1/10); 4-15) fracciones de elución seleccionadas. La flecha indica la banda correspondiente a PknG.

## Resultados

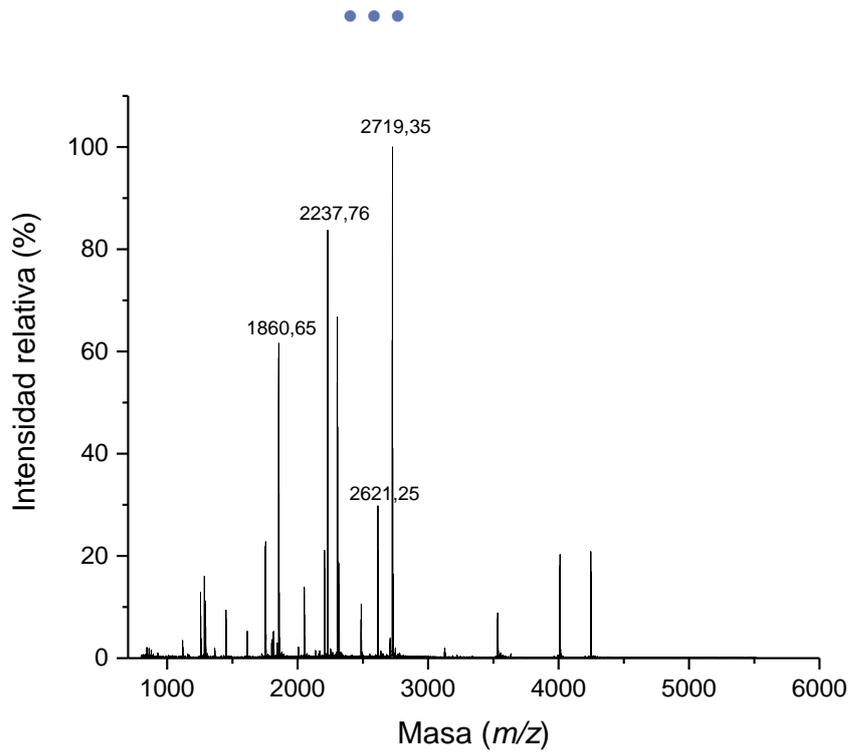


Figura 18 Espectro de masa de la digestión trípica de PknG ampliado en la zona de valores de  $m/z$  de 700 a 5500.

```

1  MAKASETERS  GPGTQPADAQ  TATSATVRPL  STQAVFRPDF  GDEDNFFHPT
51  LGPDTEPQDR  MATTSRVRPP  VRRLGGLVE  IPRAPDIDPL  EALMTNPVVP
101 ESKRFCWNCG  RPVGRSDSET  KGASEGWCPY  CGSPYSFLPQ  LNPGDIVAGQ
151 YEVKGCIAHG  GLGWIYLALD  RNVNGRPVVL  KGLVHSGDAE  AQAMAMAERQ
201 FLAEVVHPSI  VQIFNFVEHT  DRHGDPVGYI  VMEYVGGQSL  KRSKGQKLPV
251 AEAIAYLLEI  LPALSYLHSI  GLVYNDLKPE  NIMLTEEQLK  LIDLGAVSRI
301 NSFGYLYGTP  GFQAPEIVRT  GPTVATDIYT  VGRTLAALTL  DLPTRNGRYV
351 DGLPEDDPVL  KTYDSYGRLL  RRAIDPDPRQ  RFTTAEEMSA  QLTGVLREVV
401 AQDTGVPRPG  LSTIFSPSRS  TFGVDLLVAH  TDVYLDGQVH  AEKLTANEIV
451 TALSVPLVDP  TDVAASVLQA  TVLSQPVQTL  DSLRAARHGA  LDADGVDFSE
501 SVELPLMEVR  ALLDLGDVAK  ATRKLDDLAE  RVGWRRLVW  YRAVAELLTG
551 DYDSATKHFT  EVLDTFPGEL  APKLALAATA  ELAGNTDEHK  FYQTVWSTND
601 GVISAAFGLA  RARSAEGDRV  GAVRTLDEVP  PTSRHFTTAR  LTSAVTLLSG
651 RSTSEVTEEQ  IRDAARVEA  LPPTEPRVLQ  IRALVLGGAL  DWLKDNKAST
701 NHILGFPFTS  HGLRLGVEAS  LRSLARVAPT  QRHRYTLVDM  ANKVRPTSTF
    
```

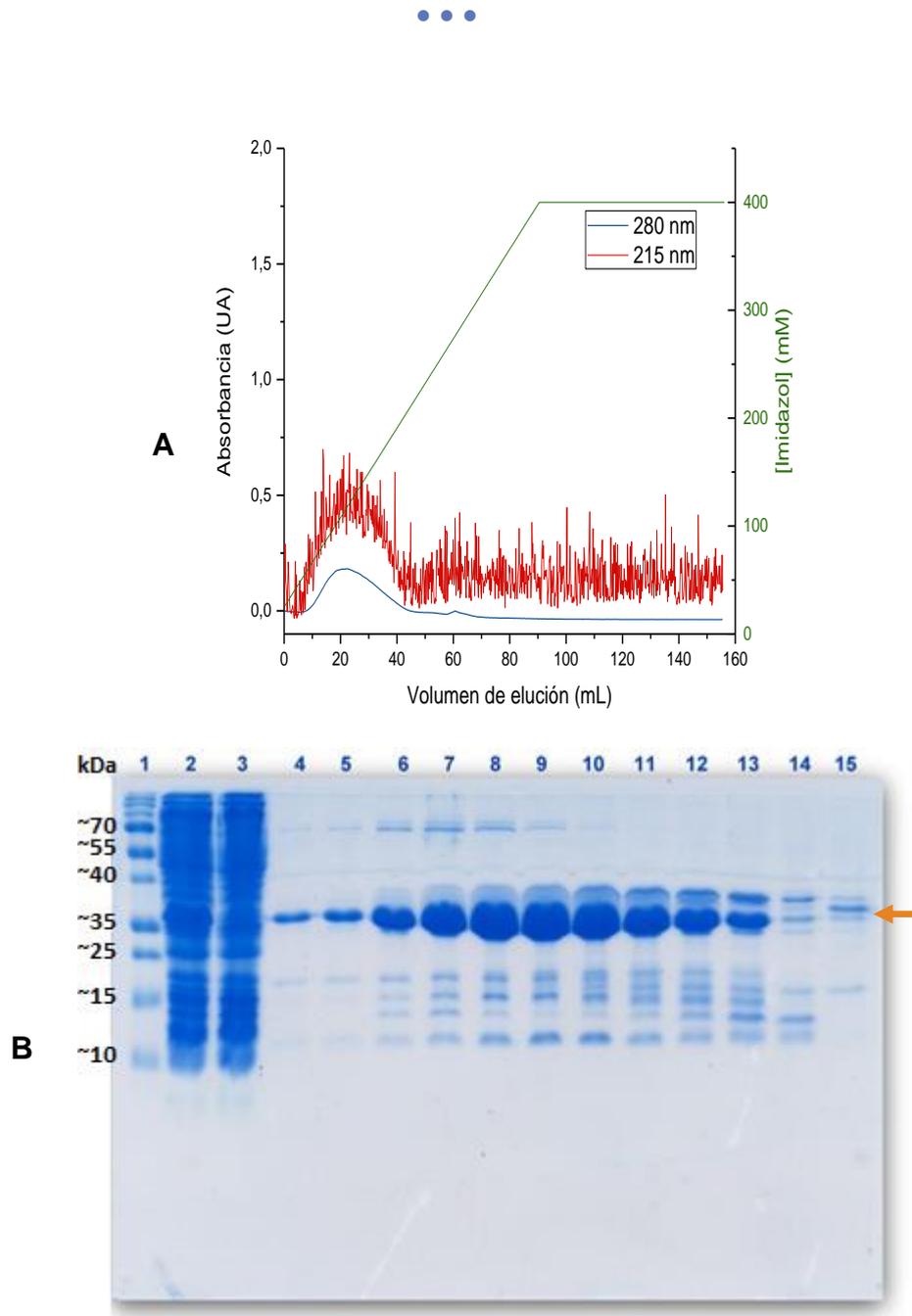
Figura 19 Secuencia de PknG de *M. tuberculosis*. Se indican en rojo los péptidos que fueron identificados.



b) *Purificación de GarA de M. tuberculosis*

GarA de *M. tuberculosis* fue expresada en la cepa de *E. coli* BL21 AI<sup>TM</sup>, en medio Luria Bertani suplementado con glucosa y tetraciclina. BL21 AI<sup>TM</sup> es una cepa adecuada para la expresión de proteínas tóxicas; contiene una inserción que posiciona a la ARN polimerasa T7 bajo el control del operón *araBAD*, siendo posible la regulación de su expresión por los niveles de glucosa y L-arabinosa. La inducción de la expresión de GarA fue realizada con arabinosa e IPTG, ya que GarA se encuentra clonada bajo el control del operón *lac*.

Se realizó una purificación por afinidad a níquel de la fracción soluble del lisado bacteriano y la detección se realizó por las medidas de absorbancia a 215 nm y 280 nm, longitudes de onda a la que absorben el enlace peptídico y los residuos de aminoácidos aromáticos de las proteínas respectivamente. La proteína recombinante producida eluyó en el pico observado entre 10-40 mL del volumen de elución (ver Figura 20 a).



**Figura 20** Primera etapa de purificación de GarA por cromatografía de afinidad (IMAC-Ni<sup>2+</sup>). (a) Cromatograma de elución. Se siguió la elución por absorbancia a 215 (en rojo) y 280 nm (en azul). La proteína recombinante fue eluida en un gradiente lineal de imidazol de 25 a 400 mM (en verde) en 45 minutos a un flujo de 2 mL/min. El pico entre 10-40 mL del volumen de elución se corresponde con las fracciones donde eluye GarA. (b) SDS-PAGE (15%) de las diferentes fracciones obtenidas: Carriles 1) marcador de peso molecular PageRuler™: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 2) fracción soluble del lisado bacteriano; 3) fracción no unida a la columna (FT); 4-15) fracciones eluidas representativas. La flecha indica la banda correspondiente a GarA.

## Resultados



Se analizó cuáles de las fracciones eluidas de la columna de afinidad contenían GarA mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida SDS-PAGE 15% (ver Figura 20 b). En la fracción soluble del lisado bacteriano se observa el perfil de proteínas presentes antes de pasar por la IMAC. No es posible visualizar diferencias con el perfil del percolado, que sugieran que una banda de la masa molecular de GarA fue retenida en la columna. Por otra parte, en las eluciones obtenidas a una concentración de imidazol aproximada de 100 mM se observa una banda correspondiente a la masa molecular de GarA (17,3 kDa). En estos carriles se observaron bandas de mayor y menor masa molecular, indicando que son requeridos pasos adicionales de purificación.

Se reunieron todas las fracciones que contenían GarA (27,5 mL), que se corresponden con los carriles 6-13 en el SDS-PAGE. Las proteínas totales fueron cuantificadas por Bradford, obteniéndose una concentración de proteínas de 6,7 mg/mL.

Seguidamente, se agregó TEV (relación 1:30) y se dializó durante toda la noche para remover el imidazol, el cual puede afectar la actividad o estabilidad de la TEV. Se realizó una separación en una columna de agarosa, donde quedan retenidas las colas de histidina, proteína no digerida y la TEV (ya que esta última también contiene una etiqueta de seis histidinas). GarA hidrolizada por la TEV ya no contiene una cola de histi-

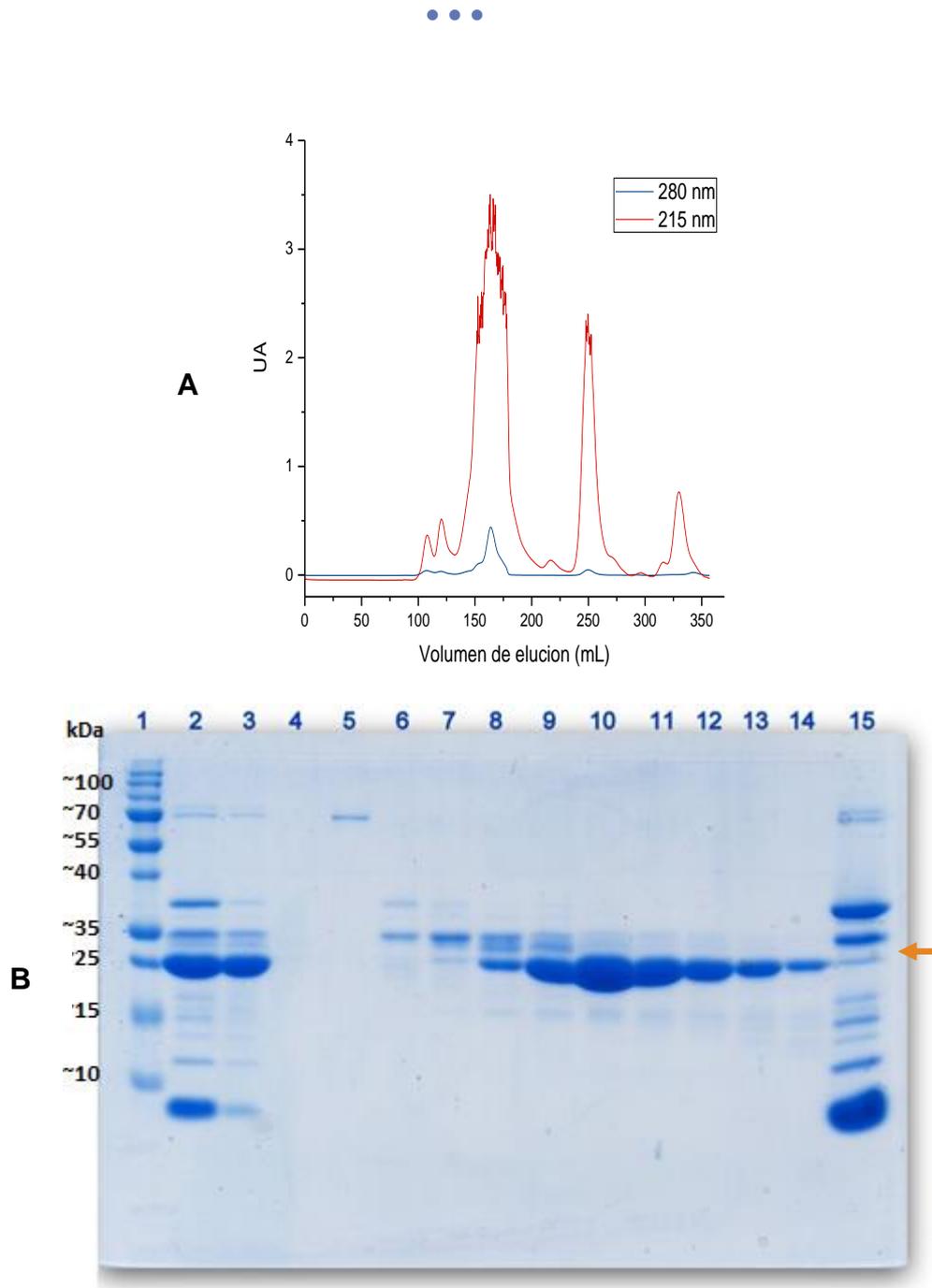
## Resultados



dinas, por lo que no es retenida en la columna Ni-NTA. Se concentró el percolado hasta 5 mL y se determinó que la concentración de proteínas fue 4,5 mg/mL por método de Bradford.

Posteriormente, GarA fue purificada mediante una gel filtración, que también se siguió por medidas de absorbancia a 215 nm y 280 nm (ver Figura 21 a).

Se colectaron fracciones cada 1 mL y se realizó un gel SDS-PAGE (15%) de las fracciones seleccionadas (ver Figura 21 b). Se puede observar una banda correspondiente a la masa molecular de GarA en las eluciones. No se observaron las bandas correspondientes a proteínas de menor y mayor masa molecular presentes en el gel obtenido durante la IMAC y en el dializado.



**Figura 21** Segunda etapa de purificación de GarA por gel filtración. (a) Cromatograma de elución. La columna utilizada HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade (GE Healthcare) equilibrada en Tris-HCl 25 mM, NaCl 150 mM, glicerol 5%, pH 7,6. Se inyectaron 5 mL y el flujo fue de 1 mL/min. GarA fue eluida en un pico entre 100-200 mL de volumen de elución. (b) SDS-PAGE al 15% de las diferentes fracciones obtenidas: Carriles 1) marcador de peso molecular PageRuler™: Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific); 2) dializado; 3) inyección (dilución 1/10); 4-14) fracciones eluidas representativas; 15) eluido resina Ni-NTA (TEV e His-tag). La flecha indica la banda correspondiente a GarA.

## Resultados



El patrón de migración del eluato de la resina Ni-NTA (carril 15 de Figura 21 b) es muy similar al patrón obtenido en el dializado de las eluciones de la IMAC (carril 2 de Figura 21 b). No obstante, la banda que estaba presente en el dializado a la masa molecular correspondiente a GarA es notoriamente menor en el eluido de la resina Ni-NTA; sugiriendo que el corte proteolítico fue eficiente, ya que sólo una cantidad pequeña de GarA sin digerir fue retenida en la columna.

Luego se concentraron conjuntamente las fracciones seleccionadas y se determinó la concentración de proteínas presente; siendo ésta 21 mg/mL. La proteína concentrada (2 mL) fue congelada rápidamente en nitrógeno líquido y almacenada a -80 °C. Su identidad fue confirmada por espectrometría de masa, se obtuvo el espectro de masa de la proteína digerida con tripsina medido en modo reflector positivo utilizando CHCA como matriz (Figura 22). El espectro obtenido se comparó con masas teóricas obtenidas de digestiones *in silico* de secuencias disponibles en las bases de datos del NCBI utilizando el programa MASCOT. Se identificó GarA con un score de 61 y una cobertura de secuencia de 45%. En la Figura 23 se observan los péptidos trípticos identificados.

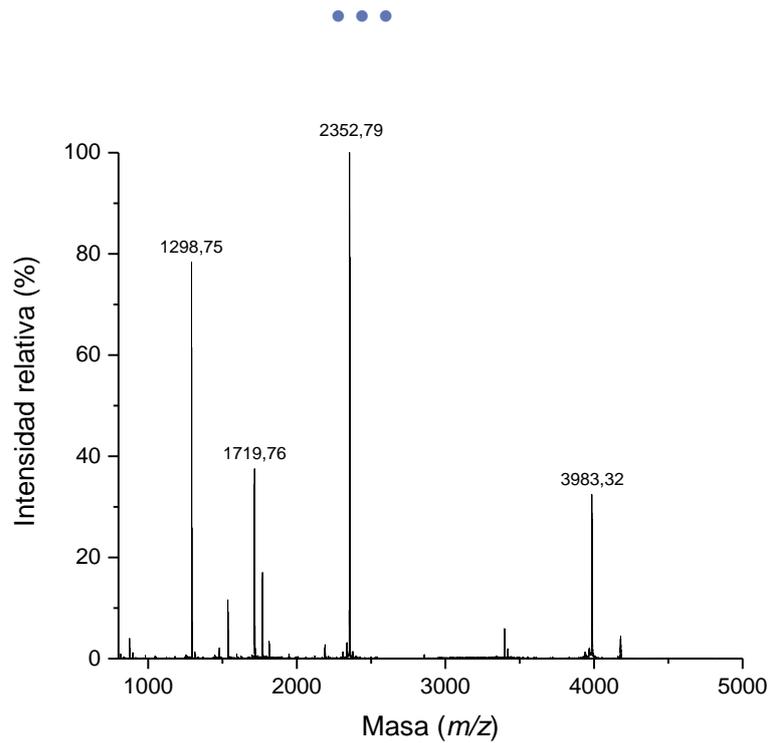


Figura 22 Espectro de masa de la digestión trípica de GarA ampliado en la zona de valores de  $m/z$  de 800 a 5000.

```
1  MTDMPDIEK DQTSDEVTVE TTSVFRADFL SELDAPAQAG TESAVSGVEG
51  LPPGSALLVV KRGNAGSRF LLDQAITSAG RHPDSDIFLD DVTVSRRHAE
101 FRLENNEFNV VDVGSLNGTY VNREPVDSAV LANGDEVQIG KFRLVFLTGP
151 KQGEDDGSTG GP
```

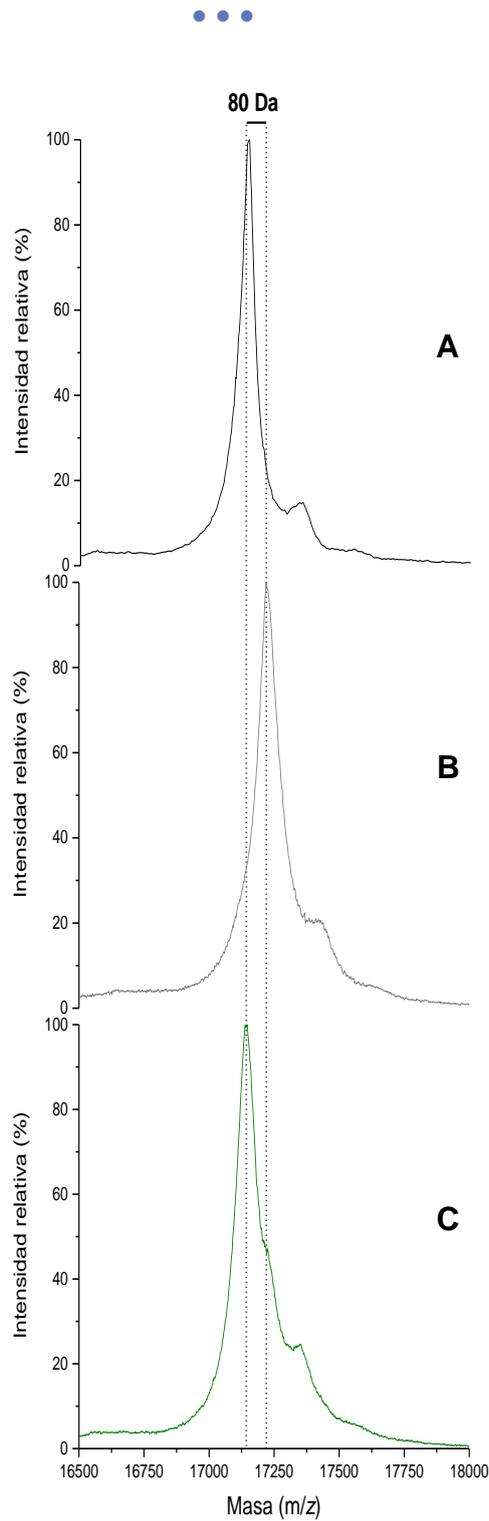
Figura 23 Secuencia de GarA de *M. tuberculosis*. Se indican en rojo los péptidos que fueron identificados.



## B. Inhibición de la actividad quinasa de PknG por tratamiento con OA-NO<sub>2</sub>

La inhibición *in vitro* de PknG se realizó preincubando durante 15 minutos a 25 °C PknG con OA-NO<sub>2</sub> (en una relación molar OA-NO<sub>2</sub>:PknG 6:1) en bicarbonato de amonio 50 mM, pH 7,2. Como control, PknG fue expuesta al vehículo de OA-NO<sub>2</sub> (metanol) bajo las mismas condiciones. Se determinó la actividad enzimática de PknG y PknG tratada con OA-NO<sub>2</sub> mediante espectrometría de masa utilizando el sustrato recombinante GarA.

GarA nativa y sujeta a la fosforilación de PknG fueron detectadas por MALDI-TOF como iones de  $m/z = 17145$  y  $m/z = 17222$ , respectivamente. El incremento de masa observado se corresponde con la incorporación de un grupo fosfato ( $\Delta$ masa teórico 80 Da) (ver Figura 24). Por otra parte, la actividad quinasa de PknG fue significativamente inhibida luego de la incubación con OA-NO<sub>2</sub>, ya que la relación  $m/z$  obtenida corresponde a una forma no fosforilada de GarA.



**Figura 24 Inhibición de la actividad quinasa de PknG por OA-NO<sub>2</sub>.** (a) Espectro de masa de GarA obtenido en MALDI-TOF modo lineal ( $m/z = 17145$ , línea negra); (b) GarA fosforilada por PknG utilizando una relación molar PknG: GarA de 1:6 ( $m/z = 17222$ ; línea gris); (c) GarA fosforilada por PknG preincubada por 15 min con OA-NO<sub>2</sub> ( $m/z = 17143$ , línea verde).

## Resultados



### C. Puesta a punto de una metodología para la evaluación de la maduración del fagosoma y el efecto de PknG en este proceso.

La internalización de PknG en el macrófago fue realizada utilizando el modelo de fagocitosis de partículas de látex (LB). Se unió covalentemente PknG y PknG inhibida con OA-NO<sub>2</sub> a las LB mediante adsorción pasiva; y ambas situaciones fueron comparadas con el control que consistió en LB sin proteína acoplada, para el cual se espera que ocurra el proceso de maduración fagosomal.

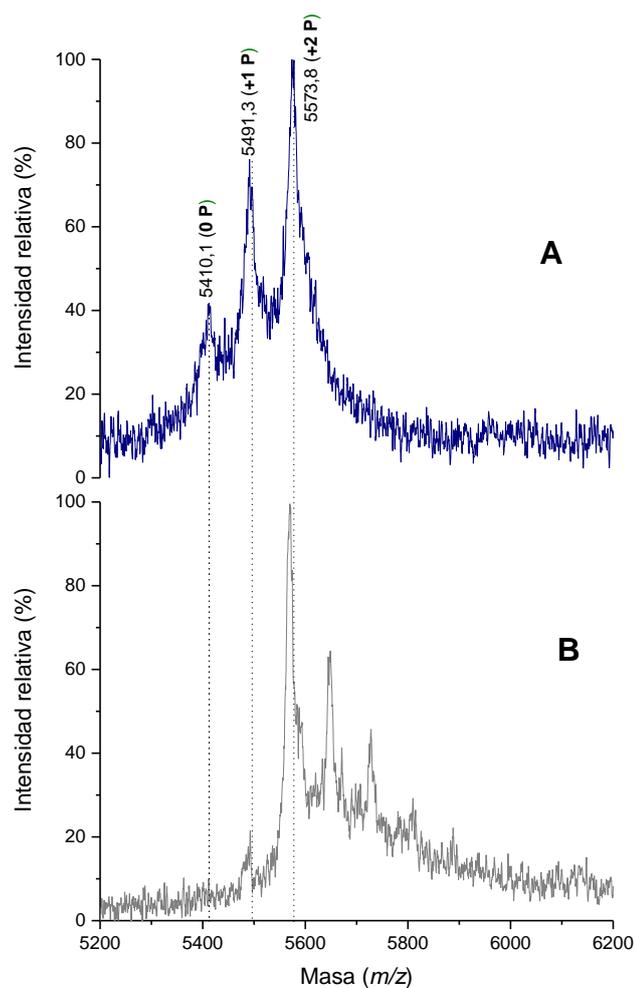
Se verificó mediante la autofosforilación de PknG que la quinasa se mantuviera activa luego del proceso de acoplado (ver Figura 25). Para ello, se procedió a incubar la suspensión de LB-PknG en condiciones de fosforilación. Se realizó un control al que no se le agregó ATP ni Mn<sup>2+</sup>, para detectar el patrón de fosforilación basal. Ambas situaciones fueron sometidas a una digestión proteolítica por incubación con tripsina, y los péptidos generados se detectaron por espectrometría de masa MALDI-TOF medido en modo lineal.

Mientras que en la situación control fueron detectadas las especies sin fosforilar y monofosforilada, las mismas fueron prácticamente indetectables luego de la autofosforilación de PknG. Asimismo, fueron detectadas especies que incorporaron tres o cuatro grupos fosfato. Verificando que efectivamente PknG se mantiene activa luego del proceso de acoplamiento.

## Resultados



to. Los espectros obtenidos presentan concordancia con los reportados [55].



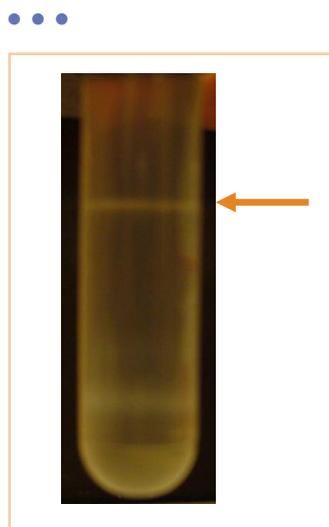
**Figura 25 Autofosforilación de PknG unida a LB.** (a) Espectro lineal MALDI-TOF de los péptidos generados de la digestión trípica de PknG unida a LB situación control, mostrando el patrón de fosforilación basal. La especie sin fosforilar, monofosforilada y difosforilada fueron detectadas como iones de  $m/z = 5410$ ,  $m/z = 5491$  y  $m/z = 5573$  respectivamente. (b) Espectro lineal MALDI-TOF de los péptidos generados de la digestión trípica de PknG unida a LB previamente incubado con ATP y  $Mn^{2+}$ . En este caso la especie difosforilada es el ion más intenso observado, mientras que la especie sin fosforilar y monofosforilada fueron prácticamente indetectables.



### 1. Aislamiento de fagosomas y análisis de las proteínas identificadas.

Se evaluó el proceso de maduración fagosomal mediante el análisis de su proteoma por espectrometría de masa. La estrategia empleada se basó en el aislamiento de fagosomas conteniendo LB, y LB a la que se le había acoplado PknG, seguido de la identificación de las proteínas fagosomales en cada condición. Por último, se realizó una búsqueda de los marcadores de las etapas respectivas de maduración en cada uno de los proteomas analizados.

Para realizar un aislamiento de fagosomas, a continuación del *pulso* y del *chase* de las LB, las células fueron resuspendidas y lisadas. Se realizaron extractos celulares totales y se centrifugó a bajas velocidades, de manera tal de generar un *pellet* enriquecido en núcleos y células sin lisar. Se recuperó el sobrenadante que contenía los fagosomas y se ultracentrifugó en un gradiente de sacarosa. Debido a las propiedades de las partículas de látex es posible realizar una purificación de los fagosomas mediante un único paso. Se recolectó la fracción fagosomal (indicada con una flecha en la Figura 26), que contiene a las LB, por flotación desde la interfase entre las soluciones de sacarosa 10% y 25%.



**Figura 26 Purificación de fagosomas por ultracentrifugación en un gradiente de sacarosa.** Ensayos de fagocitosis en macrófagos murinos J774A.1 con LB de 4  $\mu\text{m}$  condición control y con PknG y PknG desnaturalizada acopladas (proteína control). Se realizaron extractos celulares totales y la fracción fagosomal, conteniendo las partículas de látex, fue purificada mediante un único paso de ultracentrifugación en gradientes de sacarosa (fracción indicada con una flecha naranja).

Las proteínas fagosomales fueron purificadas, concentradas y separadas mediante SDS-PAGE. La cantidad de proteínas purificadas de los fagosomas no fue suficiente para la realización de geles bidimensionales para la identificación de las mismas por espectrometría de masa por medio de una aproximación clásica. Las mismas fueron identificadas por una aproximación tipo *shotgun*, una estrategia más sensible. Se realizó una digestión trípica en el gel y subsecuentemente se extrajeron los péptidos trípticos generados. La detección/análisis fue realizada en un espectrómetro de masa ESI-trampa iónica, compuesto por un sistema nanoHPLC y una trampa iónica lineal, modelo LTQ Velos. Finalmente, las proteínas presentes fueron identificadas con el programa PatternLab for

## Resultados



Proteomics mediante la comparación de los espectros (MS/MS) de la fragmentación experimental de los péptidos resultantes de la digestión proteolítica con espectros teóricos, derivados de la digestión *in silico* de todas las proteínas contenidas en el proteoma de *Mus musculus*. El número total de espectros que identifican péptidos procedentes de una determinada proteína se correlaciona linealmente con su abundancia relativa en la muestra de origen.

Fueron identificadas 239 proteínas aisladas de fagosomas conteniendo LB (ver ANEXO A. Proteoma de fagosomas conteniendo LB). Se procedió a comparar el proteoma obtenido con los proteomas de fagosoma de referencia disponibles. Se encontró que muchas de las proteínas fagosomales identificadas se correspondían con las reportadas indicando que el procedimiento realizado fue adecuado, y que efectivamente fue aislada la fracción fagosomal.

Entre las 239 proteínas fagosomales identificadas en la LB control se encuentran una serie de hidrolasas (superóxido dismutasa, catepsina B, catepsina D, lisozima); una subunidad de la V-ATPasa (subunidad b); proteínas relacionadas al citoesqueleto (Vimentina, Miosina 9, Arp2/3 y CapG) y proteínas involucradas en el tráfico vesicular como VAMP-8, GTPasas de la superfamilia Ras (dos isoformas de rab5 y rab11) y anexinas (A1, A2, A4, A5, A6, A7).

## Resultados



Mediante nuestra estrategia experimental se logró identificar un gran número de proteínas. Algunas de estas proteínas indican la etapa de maduración fagosomal y fusión vesicular. Por lo tanto, podrían servir potencialmente como marcadores para el seguimiento de la progresión de la biogénesis del fagosoma y su maduración. Marcadores de endosomas tempranos como dos isoformas de Rab5 (Rab5a y Rab5c), de endosomas tardíos como la catepsina D y una subunidad de la V-ATPasa. Asimismo, se identificó Rab11, proteína involucrada en el reciclaje de endosomas. Sin embargo, las proteínas identificadas con mayor número de espectros son proteínas estructurales y no marcadoras de maduración.

El hecho de que hayan sido identificados marcadores de diferentes etapas de maduración es indicativo de que los eventos moleculares no se encuentran sincronizados; debido a que se realiza un análisis poblacional de un proceso heterogéneo. Debido a que existe heterogeneidad de fagosomas dentro del mismo macrófago, así como entre los diferentes macrófagos, lo que se determina experimentalmente es un promedio de las concentraciones de una proteína fagosomal en diferentes fagosomas y en diferentes estados.

Por otra parte, fueron identificados con un gran número de espectros 17 contaminantes, en su mayoría isoformas de queratinas. Hecho que

## Resultados



se puede atribuir al gran número de pasos que requiere el protocolo realizado.

Adicionalmente, fueron realizados dos ensayos de fagocitosis para aislamiento de fagosomas en macrófagos J774A.1 incubados con partículas de látex unidas a PknG. En los experimentos realizados fueron identificadas 389 y 250 proteínas; de las cuales 204 son proteínas comunes (Figura 27).

En este sistema, las LB utilizadas son todas idénticas e inertes y están cubiertas con la misma concentración de ligando (PknG). Inesperadamente, las proteínas identificadas en dos experimentos realizados en iguales condiciones presentan grandes diferencias. Hecho que podría ser explicado por la heterogeneidad de fagosomas en la población analizada. Es un hecho reportado la existencia de fagosomas en diferentes estados de maduración en una población de macrófagos, incluso para los fagosomas dentro del mismo macrófago [98].

Los fagosomas son organelos muy complejos. Teniendo en cuenta la gran variedad de componentes que los forman, parece poco probable, incluso en el caso de LB con una única proteína acoplada, que dos fagosomas en una sola célula, o en una población de células, sean químicamente idénticos. Teniendo en cuenta la heterogeneidad intrínseca del

## Resultados



proceso de fagocitosis se tomaron las 204 proteínas compartidas entre ambos experimentos como las proteínas representativas de la condición PknG.

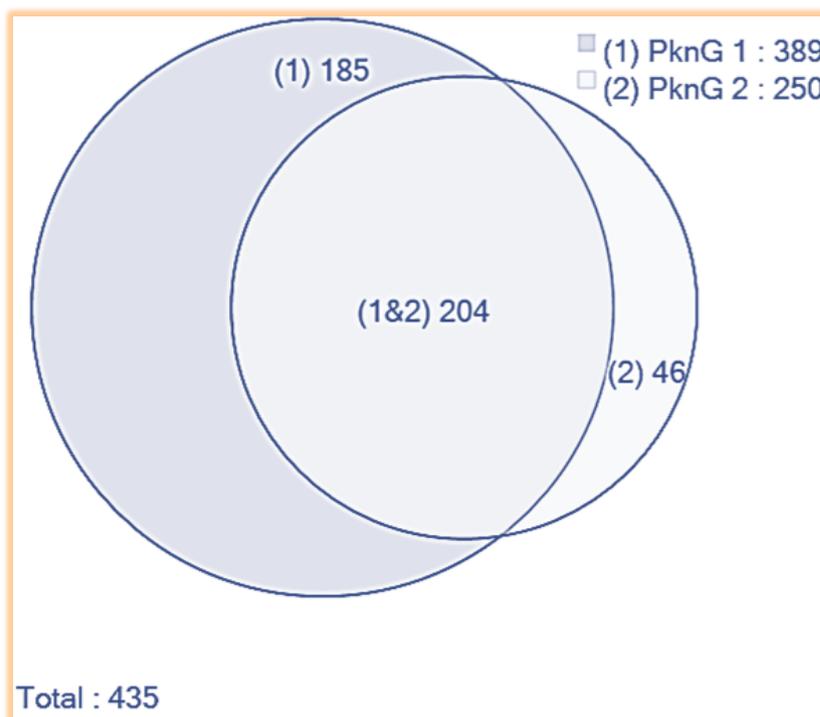


Figura 27 Diagrama de Venn de proteínas identificadas por espectrometría de masa mediante una aproximación de tipo *shotgun* de fagosomas aislados de dos experimentos realizados con LB-PknG.

Entre las 204 proteínas identificadas en ambos experimentos se encuentran una serie de hidrolasas (catepsina Z, catepsina B, carboxipeptidasa,  $\beta$ -glucuronidasa); una subunidad de la V-ATPasa (subunidad d); proteínas relacionadas al citoesqueleto (Vimentina, Miosina 9, Myosina 6, Arp2/3 y CapG) y proteínas involucradas en el tráfico vesicular como

## Resultados



GTPasas de la superfamilia Ras (Rab5 y Rab7) y anexinas (A1, A2, A4, A5, A6, A7 y A11). Por otra parte, fueron identificados 16 contaminantes.

Fueron identificados varios marcadores de maduración de endosomas tempranos (Rab5c), como de endosomas tardíos (Rab7a) y de lisosomas (LAMP-2).

Muchos patógenos manipulan las vías de señalización implicadas en la fagocitosis para evitar la degradación y para establecer infecciones intracelulares dentro de células fagocíticas tales como macrófagos. Se sabe que *M. tuberculosis* inhibe la maduración del fagosoma interviniendo en mecanismos que actúan entre Rab5 y Rab7.

Rab5 y Rab7 son dos miembros de la superfamilia Rab que facilitan la fusión con endosomas tempranos y tardíos respectivamente. Durante mucho tiempo se creyó que Rab7 estaba ausente en fagosomas que contienen *M. tuberculosis*. Recientemente, ha sido reportado que Rab7 es transitoriamente reclutado para ser posteriormente liberado de los fagosomas que lo contienen [99]. Sin embargo, dado que el número de espectros que identifican a Rab7 (21) está dentro del orden de los que identifican a Rab5 (27) puede que PknG no actué a este nivel.

Si bien estos resultados nos muestran que las estrategias proteómicas pueden ser útiles para comparar la composición de proteínas de

## Resultados



fagosomas en distinto estado de maduración, en nuestro caso no nos permitieron obtener datos concluyentes. La principal limitación la constituyó el bajo número de espectros obtenidos para las proteínas con valor como marcadores de la maduración. Este hecho, junto con la heterogeneidad de los fagosomas obtenidos, impidió realizar comparaciones cuantitativas en los niveles de estas proteínas en los fagosomas conteniendo partículas de látex control y con PknG.

## 2. *Microscopía de epifluorescencia utilizando FITC-dextrano*

Por otra parte, se evaluó el proceso de maduración del fagosoma por microscopía de epifluorescencia utilizando como sonda de cargado lisosomal dextrano acoplado a fluoresceína (dextrano-FITC). Se obtuvieron micrografías en campo claro y se evaluó la fluorescencia de las muestras utilizando filtros especiales para DAPI y FITC.

La metodología se basa en que si una partícula fagocitada madura, ocurrirá una fusión con los lisosomas y la señal fluorescente de la fluoresceína rodeará a la partícula de látex. Por otra parte, si la maduración del fagosoma que contiene a la LB es inhibida, la partícula de látex y la señal fluorescente no colocalizarán.

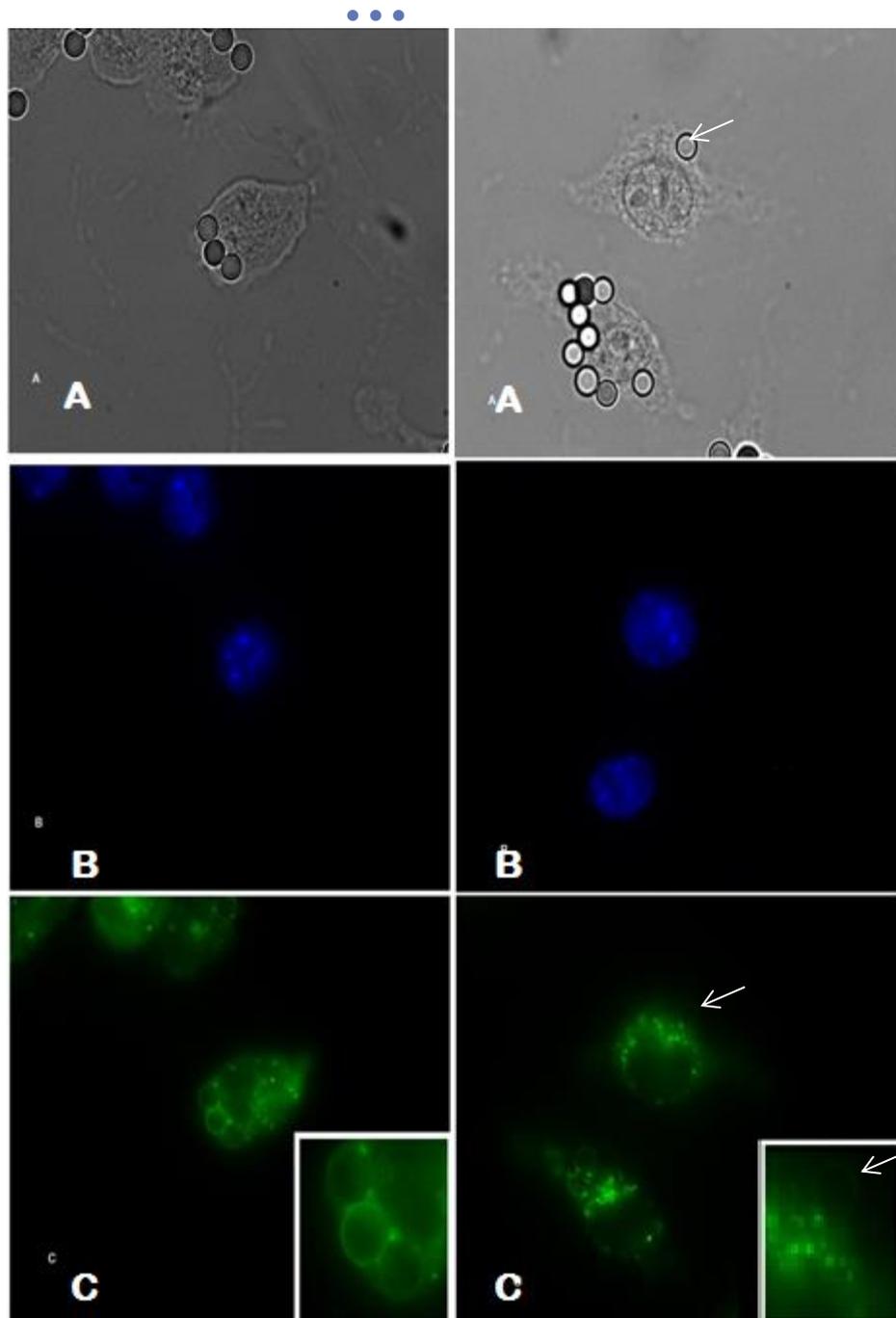
En la Figura 28 se observan micrografías de un experimento representativo. A partir del análisis de imágenes fue muy difícil obtener resulta-

## Resultados



dos cuantitativos y objetivos utilizando esta aproximación. Por lo tanto no se realizó un recuento de un número estadísticamente significativo de LB positivas y negativas en cada condición, debido a que la estrategia experimental utilizada dificulta la discriminación entre LB internalizadas/no internalizadas y entre LB que maduraron a fagolisosomas y las que no. Asimismo, la destrucción fotoquímica del fluoróforo (fotoblanqueo) en ausencia de filtros limitaba el tiempo en que las células podían ser observadas. Para evitar este efecto se trató de trabajar en condiciones de mínima iluminación posible, pero al utilizar los filtros que se disponían en el momento no se conseguía una buena señal.

Para solucionar este inconveniente, se procedió a estudiar la modulación de la maduración de los fagolisosomas mediante un abordaje experimental diferente.



**Figura 28** Imágenes de ensayos de fagocitosis en microscopio de epifluorescencia de macrófagos murinos J774A.1 tratados con LB de 4  $\mu\text{m}$ . (a) Micrografía de campo claro; (b) micrografía de fluorescencia donde se observan los núcleos celulares, mediante tinción DAPI; y (c) los lisosomas mediante FITC-dextrano. Las imágenes a-c de la izquierda corresponden a LB que no contenían PknG unida, mientras que las imágenes a-c de la derecha corresponden a LB con PknG adsorbida. La flecha indica el borde de la partícula de látex con PknG adsorbida.

## Resultados



### 3. Microscopía confocal utilizando pHrodo® y LAURDAN

Se evaluó el proceso de maduración del fagosoma por microscopía confocal utilizando las sondas fluorescentes pHrodo® y LAURDAN. El pHrodo® es un indicador de pH fluorescente y su utilización permite evaluar la acidificación de los compartimientos que contienen a las LB durante la maduración del fagosoma, mientras que el LAURDAN es una sonda de membrana que permite asegurarnos que las LB en cuestión están dentro de la célula. Se unió covalentemente PknG y PknG inhibida con OA-NO<sub>2</sub> a las LB; y ambas situaciones fueron comparadas con el control que consistió en LB sin proteína acoplada, para el cual se espera que ocurra el proceso de maduración fagosomal. Nótese que en los experimentos de fagocitosis in vivo debido a la toxicidad observada (mediante un incremento de las células apoptóticas y una pérdida de adherencia celular) la concentración de LPS utilizado para activar a los macrófagos fue optimizada de 23 ng/mL a 5 ng/mL.

Al realizar el seguimiento temporal de una LB control se debería observar un descenso del pH de los compartimientos que contienen a la partícula como consecuencia del proceso de maduración fagosomal. La acidificación fagosomal es dependiente del funcionamiento de la V-ATPasa, que bombea H<sup>+</sup> hacia el interior del mismo, reduciendo así el pH. Este proceso es esencial para la función degradativa de los fagoso-

## Resultados



mas, debido a que el pH óptimo de la mayoría de las enzimas lisosomales es bajo y a que la producción de  $H_2O_2$  y otras especies reactivas del oxígeno (ROS) requiere de grandes cantidades de  $H^+$  [100].

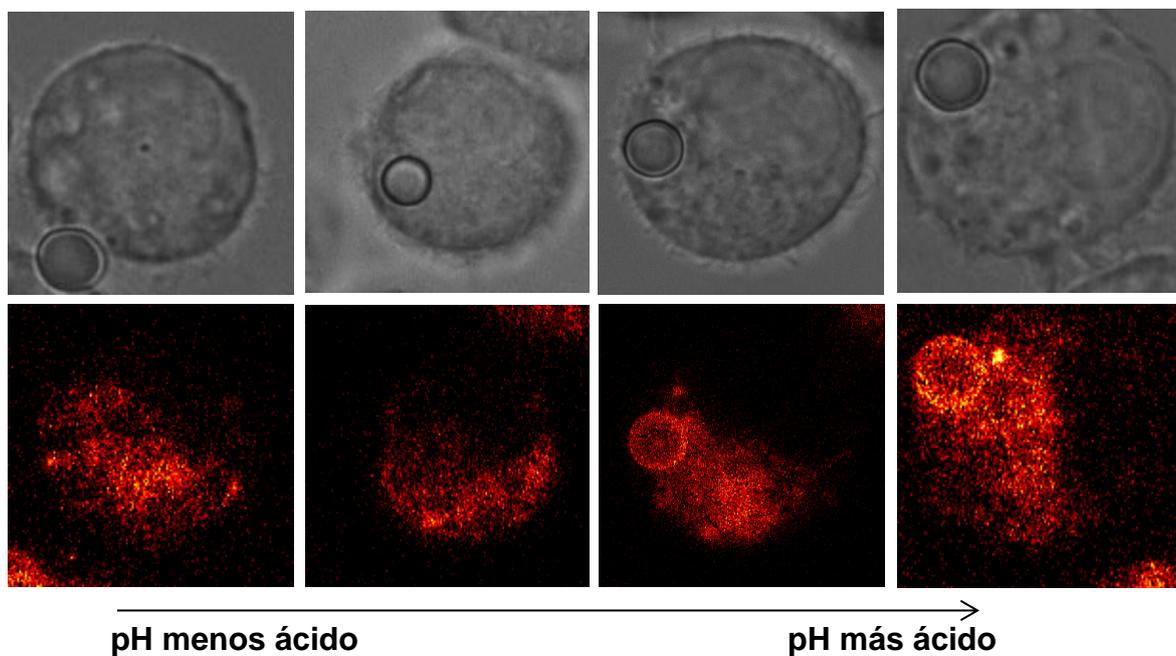
En la Figura 29, se ilustra cómo se observó dicho proceso. Se muestran imágenes de macrófagos en diferentes etapas de maduración fagosomal. Se obtuvieron micrografías en campo claro que permiten localizar a la LB en cuestión, y de fluorescencia donde se puede observar los cambios en la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup>. Esta sonda fluorescente funciona como un indicador de pH que aumenta notablemente la emisión de fluorescencia cuando el pH del medio que lo rodea se acidifica. Se observa un aumento de la fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en el tiempo en los compartimientos que contienen a las LB, hecho que se corresponde con el establecimiento de un medio ácido en el interior de los fagosomas. Nótese que en la micrografía de más a la derecha, situación que se corresponde a una etapa de maduración fagosomal más avanzada se observa una vesícula muy ácida, que también se observa en campo claro en la periferia de la LB.

Para obtener una medida cuantitativa que nos permita realizar comparaciones relativas en el nivel de acidificación fagosomal se midió la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en fagosomas conteniendo LB control, y LB a la que se le han acoplado PknG o PknG inhibida. Se de-

## Resultados



terminó la suma de la intensidad de fluorescencia del área que abarca cada LB en los diferentes planos del eje Z para cada condición. Las medidas fueron realizadas en un experimento por condición y en cada caso se midió la intensidad de fluorescencia de ~ 30 LB. Los valores de intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> obtenidos son expresados gráficamente como promedio  $\pm$  error estándar en la gráfica insertada en la Figura 30. Nótese que la fluorescencia se relativizó respecto al pH celular.



**Figura 29** Micrografías de macrófagos murinos J774A.1 obtenidas en microscopio confocal con LB de 4  $\mu\text{m}$  que ilustran los cambios en la fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> a medida que ocurre el proceso de maduración fagosomal.

Las diferencias estadísticas entre los grupos fueron probadas con un *one way* ANOVA utilizando el programa Sigma Plot 12. Debido a que

## Resultados



los datos de la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en la condición PknG inhibida no siguieron una distribución estándar, se realizó un test de Kruskal-Wallis, un test no paramétrico. En el mismo las discrepancias entre las sumas de los rangos son combinadas para crear un único valor denominado H. El valor de H calculado fue  $H = 25,901$  con dos grados de libertad, que tiene un  $p$  valor asociado  $<0,001$ . Como consecuencia se rechazó la idea de que las diferencias observadas sean azarosas, y se concluyó que las poblaciones tienen distribuciones diferentes. Para aislar los grupos que difieren entre sí se utilizó el método de Dunn, un test que compara las diferencias en la suma de los rangos entre dos columnas con la diferencia esperada basada en el número de grupos y tamaño. Se halló que PknG y PknG-OANO<sub>2</sub> son estadísticamente diferentes al control (LB) pero no entre sí. Es decir que no se puede afirmar que hubiese diferencias de pH significativas entre PknG y PknG-OA-NO<sub>2</sub>. Por lo tanto, no pudimos concluir que la inhibición de la actividad quinasa de PknG tenga un efecto en la inhibición de la maduración del fagosoma, es decir que este efecto esté mediado por la actividad quinasa de PknG.

Como resultado principal, este último método utilizado fue el mejor de los métodos empleados para medir la maduración del fagosoma, y permitió corroborar en una forma más confiable los datos previos de que PknG inhibe la maduración, aunque quedaría por determinar si este efecto es a causa de su actividad catalítica o por acción de otro dominio.

## Resultados

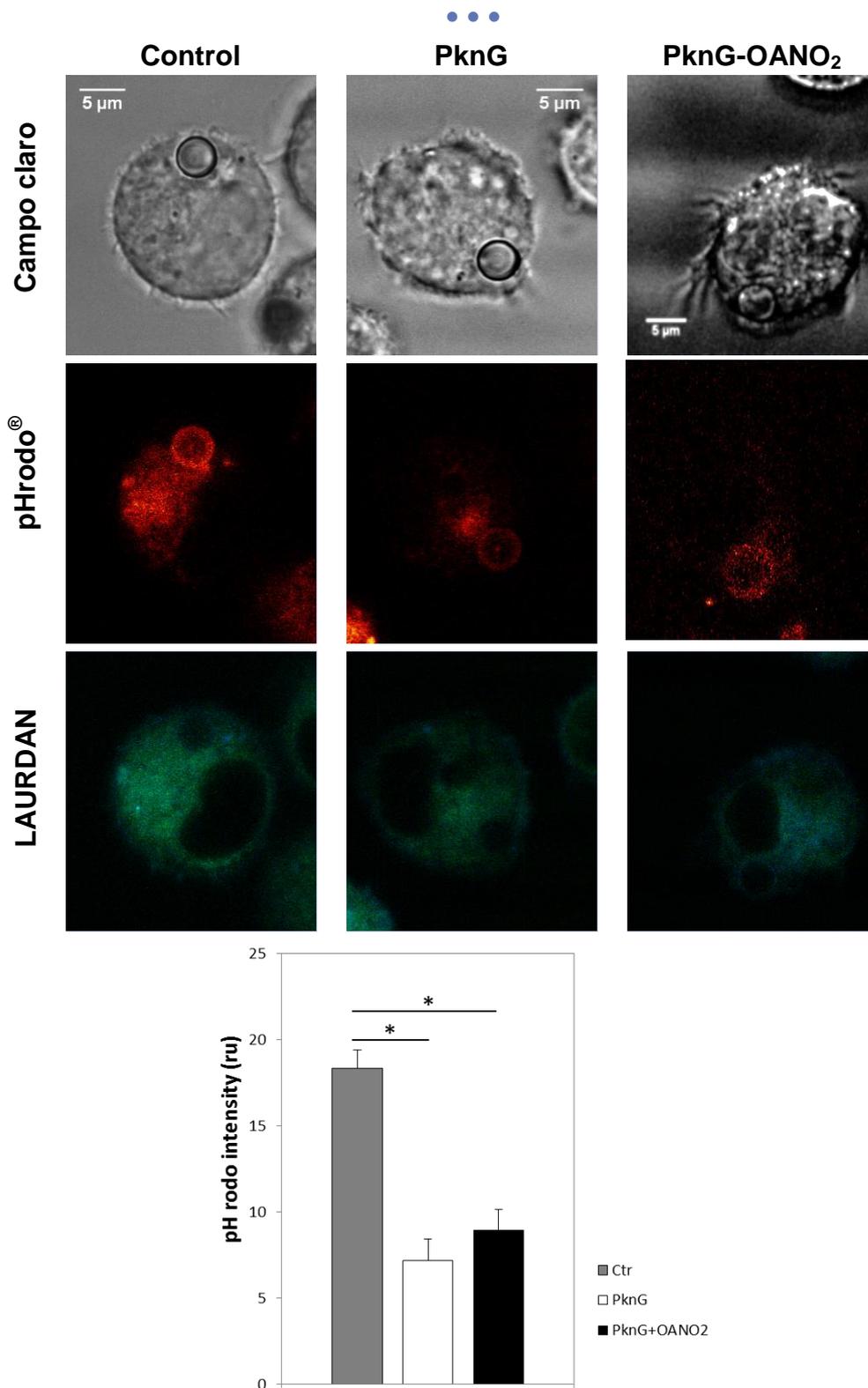


Figura 30 Ensayos de fagocitosis observados mediante microscopía confocal en macrófagos murinos J774A.1 con LB de 4 μm, condición control y con PknG y

Resultados



**PknG-OANO<sub>2</sub> acopladas.** Ejemplos de micrografías de campo claro y de fluorescencia para pHrodo<sup>®</sup> y superposición de los canales del LAURDAN. En la gráfica se muestra la IF del pHrodo<sup>®</sup> en los compartimientos que contienen las LB. Los valores de cada grupo se expresaron como media  $\pm$  s.e.m. La comparación estadística entre los grupos se realizó mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguido de la prueba de Dunn para detectar diferencias entre los grupos. Un *p* valor  $<0,001$  fue considerado estadísticamente significativo (\*).



## IX. *Discusión de resultados*

Un elemento fundamental en la patogenicidad de *Mycobacterium tuberculosis* es su capacidad para sobrevivir en los macrófagos del hospedero, inhibiendo el proceso de maduración fagosomal. Recientemente una quinasa de proteínas denominada PknG ha adquirido gran relevancia como uno de los factores que participa en la modulación de la maduración del fagosoma. Se buscó optimizar un método de medida de la maduración del fagosoma que nos permita corroborar el efecto inhibitorio de PknG en la maduración fagosomal.

Como modelo de fagocitosis *in vitro* se utilizaron partículas de látex, este sistema permite imitar las interacciones hospedero-patógeno durante una infección. Las partículas presentan en su superficie una alta densidad de grupos funcionales que permiten el acoplamiento covalente de proteínas. Asimismo, el aislamiento de los fagosomas que contienen LB se ve facilitado por la baja densidad de flotación del látex. Su densidad característica permite la purificación de los fagosomas en un único paso, utilizando un gradiente de sacarosa, en el que los fagosomas flotan en una región del gradiente en la que no se detectan otros organelos celulares.



Se utilizaron dos proteomas de fagosomas de LB reportados como referencia. Por un lado, el proteoma del fagosoma reportado por Garin (2001), quien mediante una aproximación clásica de la estrategia *bottom-up* identificó más de 140 proteínas aisladas de fagosomas que contienen LB en macrófagos murinos J774 [101]. El número de proteínas identificadas mediante esta estrategia experimental es ligeramente menor, indicando una mayor sensibilidad de la estrategia proteómica utilizada en nuestro abordaje experimental.

Más recientemente, Trost y colaboradores identificaron 2415 proteínas aisladas de fagosomas conteniendo LB de macrófagos RAW 267,4; mediante una aproximación de tipo *shotgun*; representa la cobertura más completa de un proteoma fagosomal reportados hasta la fecha [102]. En este trabajo 20 µg de lisado de proteínas fue separado en 17 fracciones por una SDS-PAGE, y las proteínas fueron identificadas con un nanoLC/LTQ-Orbitrap, un equipo extremadamente sensible.

Durante la maduración del fagosoma se incorporan sucesivamente proteínas específicas al fagosoma. A partir de esto se evaluó el proceso de maduración fagosomal mediante el análisis del proteoma de fagosomas conteniendo LB por espectrometría de masa y se realizó una búsqueda de marcadores de una etapa de maduración en los proteomas analizados.

#### Discusión de resultados



La abundancia relativa de las proteínas fagosomales identificadas que constituyen marcadores de maduración es baja. Entonces, concluimos que no es posible realizar una evaluación de la maduración del fagosoma por la estrategia proteómica cuantitativa utilizada.

Para cada condición se partió de una muestra de proteínas generadas a partir de tres frascos para cultivo celular con un área de crecimiento de 75 cm<sup>2</sup>. Una mayor cantidad de muestra de partida, escalando el experimento a un mayor número de botellas permitiría revertir este problema. Sin embargo, el número de botellas que se generarían es incompatible con la infraestructura actual del laboratorio de cultivo celular y dificultaría la manipulación. El manejo del experimento se haría inviable (sobre todo en la sincronización entre las réplicas y entre las distintas condiciones). No es recomendable agregar más variables a un proceso que de por sí, ya es heterogéneo.

Otra posibilidad consiste en utilizar las distintas estrategias de separación disponibles que permiten maximizar la cobertura del proteoma del fagosoma.

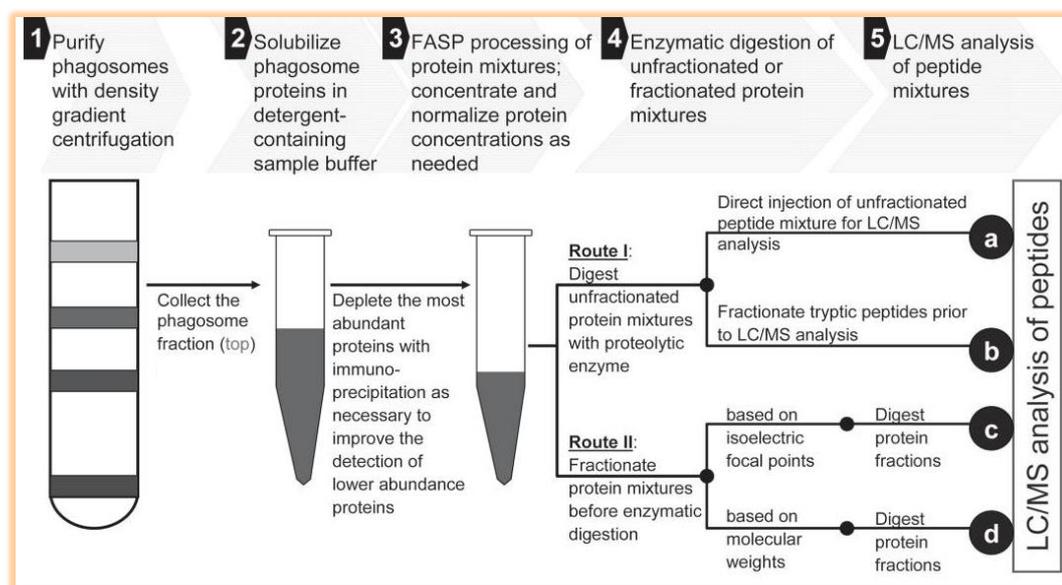
Las muestras de proteínas fagosomales para análisis proteómicos basados en LC/MS pueden ser procesados por dos rutas distintas (Figura 31). En un experimento LC/MS, el espectro de masa es obtenido conti-



nuamente mientras los componentes son eluidos de una columna HPLC. La primera ruta consiste en digerir cada muestra de proteínas fagosomales con una enzima proteolítica, que puede ser directamente inyectada para un análisis LC/MS como en el experimento realizado (opción a); o fraccionada (por ejemplo por micro columnas de intercambio iónico) previo al análisis por LC/MS de cada fracción (opción b). En la segunda ruta, las proteínas fagosomales son separadas basadas en sus puntos isoeléctricos (opción c) o masas moleculares (opción d). Luego, cada fracción de proteína obtenida se digiere con una enzima proteolítica para producir péptidos para su posterior análisis por LC/MS [103].

Asimismo, se estudió la maduración del fagosoma mediante microscopía de epifluorescencia y microscopía confocal utilizando distintas sondas fluorescentes (dextrano-FITC, LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup>). En la discusión de los resultados de microscopia primero serán discutidas las ventajas y desventajas de ambas técnicas, seguido de una comparación de las sondas fluorescentes empleadas. Luego, los resultados obtenidos son comparados con resultados previos del laboratorio. Por último, se evaluó si el efecto de PknG sobre la maduración del fagosoma está mediado por su actividad quinasa utilizando un inhibidor irreversible específico.

## Discusión de resultados



**Figura 31 Múltiples enfoques para procesar muestras de proteínas fagosomales para análisis proteómico basado en LC/MS. Adaptado de [103].**

Las imágenes obtenidas en microscopía de epifluorescencia superponen estructuras que están alineadas en el eje óptico. Por lo que esta metodología por sí misma no permite diferenciar LB que han sido interiorizadas de las que se encuentran en planos superiores a la célula. Sin embargo, es una metodología que ha sido ampliamente utilizada para estudiar el proceso de fagocitosis celular.

Una aproximación utilizada para distinguir LB extracelulares e intracelulares, utiliza LB que están marcadas con fluoresceína o rodamina. Las LB se distinguen, explotando el uso de azul de tripán (o bromuro de etidio) para extinguir la fluorescencia de las LB extracelulares. Sin embar-

## Discusión de resultados



go, la absorción de estos agentes por las células hace que la interpretación de los resultados se dificulte [104].

Otra aproximación que se puede utilizar para asegurarnos que las partículas de látex se localizan intracelularmente consiste en evaluar la colocalización de las mismas con marcadores específicos mediante inmunofluorescencia. Para ello se deben utilizar LB recubiertas con un anticuerpo primario y un anticuerpo secundario anti el anticuerpo primario que se encuentra conjugado a un fluorocromo. Luego de la internalización de las LB, las células son incubadas con el anticuerpo secundario y se analizan en el microscopio. Se deben obtener imágenes en campo claro para identificar las LB y de fluorescencia; teniendo en cuenta que la señal fluorescente del anticuerpo secundario proviene de las LB extracelulares. Mientras que las LB internalizadas son excluidas de los anticuerpos secundarios y no fluorescen [105].

Alternativamente, se pueden utilizar LB revestidas con una proteína de interés. Seguido de la inmunotinción de la proteína con un anticuerpo anti-proteína y posterior incubación con un anticuerpo secundario conjugado a un fluoróforo [106]. Incluso se encuentra reportada la utilización de esta aproximación con LB fluorescentes. En el experimento realizado por Lecuit, M (1997), se utilizaron LB rojo Texas fluorescentes revestidas con una proteína de interés; que puede ser detectada por inmunofluorescencia.

#### Discusión de resultados



cia utilizando un anticuerpo anti-proteína y posterior incubación con un anticuerpo secundario conjugado a FITC. La observación por microscopía de epifluorescencia permite distinguir LB intracelulares (fluorescen en rojo) de las extracelulares (fluorescen en rojo y verde) [107].

La microscopía confocal es una metodología más apropiada que la microscopía de epifluorescencia para estudiar el proceso de maduración fagosomal. Incorpora una barrera opaca en el camino óptico que únicamente permite el pasaje de luz por un pequeño orificio central. De esta manera es posible obtener imágenes de un único plano de interés. Mediante la obtención de imágenes en planos confocales adyacentes se puede realizar una reconstrucción en los ejes xz e yz que permite discriminar estructuras que están alineadas en el eje óptico. Esto es de especial interés para nuestro abordaje experimental, ya que permite distinguir claramente LB intracelulares de las que se encuentran en planos superiores.

El microscopio de epifluorescencia que se encuentra disponible en el Institut Pasteur de Montevideo no cuenta con una cabina con controlador de temperatura y CO<sub>2</sub>, por lo que sólo es posible analizar la fagocitosis de células fijadas. Mientras que el microscopio confocal permite seguir la maduración de los fagosomas en las diferentes condiciones *in vivo*.

## Discusión de resultados



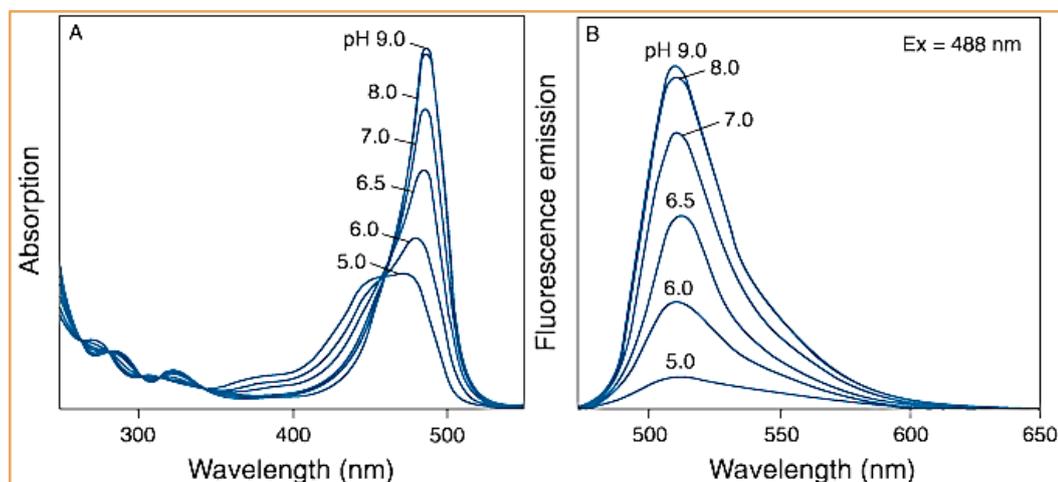
En el presente trabajo se evaluaron las sondas fluorescentes dextrano-FITC y el LAURDAN junto al pHrodo<sup>®</sup>. El dextrano-FITC conjuga una sonda fluorescente con una molécula no metabolizable por el macrófago; como consecuencia funciona como una sonda de cargado lisosomal. Si una partícula fagocitada madura, ocurrirá una fusión con los lisosomas y la señal fluorescente de la fluoresceína rodeará a la partícula de látex. Por otra parte, si la maduración del fagosoma que contiene a la LB es inhibida, la partícula de látex y la señal fluorescente no colocalizarán. Sin embargo, la utilización de dextrano-FITC para estudiar el proceso de maduración fagosomal presenta varias desventajas descritas a continuación.

La principal desventaja de la utilización de FITC-dextrano como sonda de cargado lisosomal consiste en que el rendimiento cuántico de la fluoresceína es dependiente del pH, por lo que variará su intensidad de fluorescencia durante la acidificación del fagosoma, tal y como se observa en la Figura 32. Además, la presencia de lisosomas dispersos a lo largo la célula dificulta la discriminación entre LB que maduraron a fagolisosomas de las que no. Otra gran desventaja de esta metodología es el hecho de que sea el experimentador el que decide cuando una LB maduró o no a un fagolisosoma, siendo los resultados dependientes de la subjetividad del experimentador a la hora de interpretar los resultados. Es necesario hacer notar que a pesar de las dificultades halladas la utilización de LB

#### Discusión de resultados



con FITC-dextrano es una metodología reportada que ha sido empleada en múltiples oportunidades para estudiar el proceso de fagocitosis celular [108], [109], [110] y [111].



**Figura 32 Dependencia del pH en los espectros de la fluoresceína: (a) Espectro de absorción del FITC en soluciones amortiguadoras de pH creciente; (b) espectro de emisión del FITC obtenido en soluciones amortiguadoras de pH creciente. Extraído de [112].**

Se evaluó el proceso de maduración del fagosoma por microscopía confocal utilizando las sondas fluorescentes pHrodo<sup>®</sup> y LAURDAN. La determinación de la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en fagosomas conteniendo LB a la que se le han acoplado PknG y variantes de la misma permite evaluar la acidificación de los compartimientos que contienen a las LB durante la maduración del fagosoma. Además permite reali-

#### Discusión de resultados



zar comparaciones relativas entre el nivel de acidificación en cada condición. Mientras que el LAURDAN permite asegurarnos que las LB en cuestión están dentro de la célula.

En los experimentos de fagocitosis utilizando dextrano-FITC el experimentador procede a realizar un recuento de las LB positivas y negativas en cada condición, en nuestro caso se consideraban alrededor de 300 LB. Mientras que en esta metodología se midieron alrededor de 30 LB por condición, ya que cada valor obtenido requiere de un gran tiempo de procesamiento. Esta metodología presenta como principal ventaja que se obtiene como resultado un valor de intensidad de fluorescencia para cada LB, obteniendo así resultados cuantitativos y objetivos. Dichos valores de fluorescencia pueden ser utilizados para realizar comparaciones relativas en el nivel de acidificación fagosomal.

Para determinar la fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en cada condición se determina la suma de la intensidad de fluorescencia del área que abarca cada LB en los diferentes planos del eje Z. Teniendo en cuenta que pequeñas variaciones en la concentración de sonda empleada generarían variaciones significativas en la intensidad de fluorescencia, se relativizaron los valores obtenidos respecto a la fluorescencia de la célula. Eliminando de esta manera la variación interexperimental debida a diferencias

## Discusión de resultados



en la concentración de sonda empleada, ya que no es esperado que regiones celulares distantes a la LB experimenten variaciones en su pH.

La utilización de kits comerciales de calibración (Thermo Scientific), en conjunción con el pHrodo<sup>®</sup> permitiría obtener valores cuantitativos del pH celular. Luego de medir la intensidad de fluorescencia del pHrodo<sup>®</sup> en condiciones experimentales, se debe resuspender las células en un tampón de calibración que contiene ionóforos, y la intensidad de fluorescencia se mide nuevamente. Este procedimiento se repite con diferentes tampo- nes de calibración y se crea una curva de calibración que es utilizada para identificar el pH intracelular asociada a las condiciones experimentales.

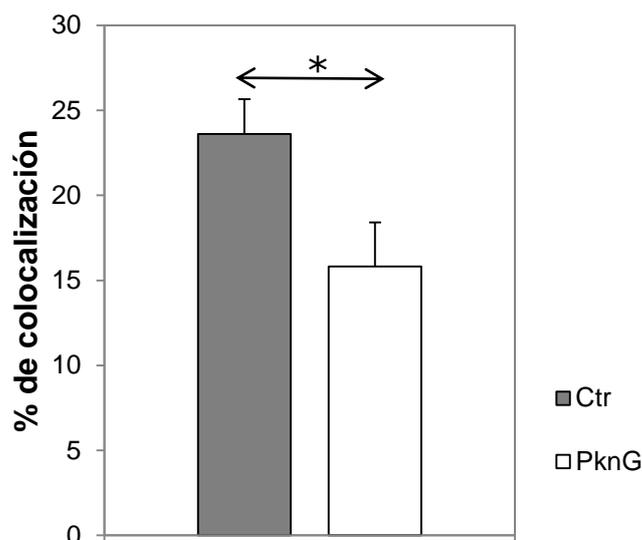
El LAURDAN es una sonda fluorescente de membrana sensible a la polaridad del entorno que fue utilizada para distinguir las LB extracelu- lares de las interiorizadas, ya que estas últimas se encuentran rodeadas de membrana. Es posible utilizar esta sonda para detectar cambios en las propiedades de fase de las membranas, por lo que permitiría evaluar mo- dificaciones en la fluidez de la membrana fagosomal durante el proceso de maduración de los fagosomas.

Los resultados obtenidos por microscopía confocal utilizando LAU- RDAN y pHrodo<sup>®</sup> presentan concordancia con resultados previos obteni- dos en el laboratorio utilizando microscopía de epifluorescencia con FITC-

## Discusión de resultados



dextrano. Se observa en ambos casos una diferencia estadísticamente significativa entre los niveles de colocación lisosomal de LB control y LB con PknG acoplada (Gráfica 1).



**Gráfica 1** Ensayos de fagocitosis observados mediante microscopía de epifluorescencia en macrófagos murinos J774A.1 preincubados con dextrano-FITC con LB de 4  $\mu\text{m}$ , condición control y PknG. El pulso fue de 30 min y el *chase* de 60 min ( $n = 5$ ). Resultados previos del laboratorio.

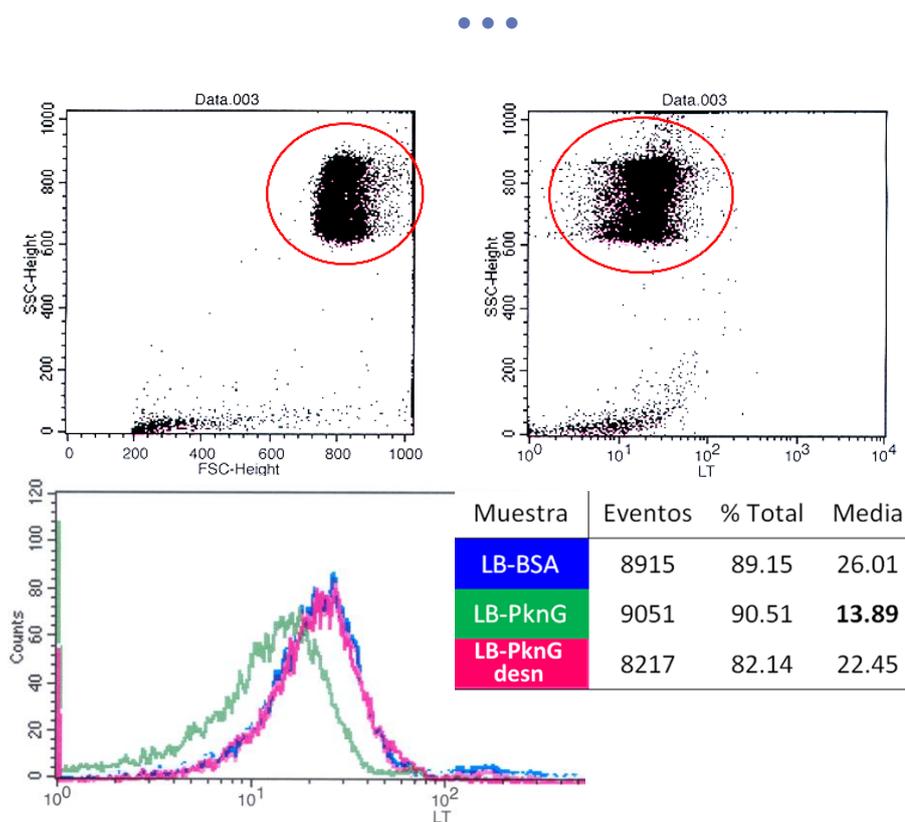
Igualmente, otros resultados previos obtenidos en el laboratorio mediante citometría de flujo con LB de 4  $\mu\text{m}$  y la sonda fluorescente lysotracker<sup>®</sup> Red (Molecular Probes) presentan concordancia con estos resultados (Figura 33). Se utilizaron LB de 4  $\mu\text{m}$ , con PknG, PknG desnaturada y BSA acoplada. En este caso fueron utilizados dos controles, por un lado PknG desnaturada y por otro lado BSA, una proteína no rela-

#### Discusión de resultados



cionada que no es esperado que influya en la maduración fagosomal. El lysotracker<sup>®</sup>, es una sonda fluorescente que se acumula selectivamente en los compartimientos celulares ácidos y exhibe un leve aumento en la intensidad de fluorescencia a pH ácido.

Se procedió a seleccionar en el citómetro una puerta con los valores de dispersión frontal (FSC), y de dispersión lateral (SSC) del láser que corresponden a las fracciones enriquecidas en fagosomas con LB de macrófagos, parámetros que se encuentran relacionados con el volumen y complejidad respectivamente. Al igual que en experimentos anteriores el pulso fue de 30 min y el *chase* de 60 min. Luego, se registró la intensidad de fluorescencia del lysotracker<sup>®</sup> en la compuerta seleccionada. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en la intensidad de fluorescencia de una LB con PknG acoplada (en verde) y LB con una proteína inespecífica como BSA (en azul) o PknG desnaturalizada (en fucsia) acoplada. Nótese que el número de eventos que fueron contabilizados en el citómetro en cada condición ronda los 9000, por lo que los resultados obtenidos tienen un gran valor estadístico (ver Figura 33).



**Figura 33** Citometría de flujo de fracción enriquecida fagosomas de macrófagos murinos J774A.1 tratados con lysotracker® Red (Molecular Probes), con LB de 4 µm, condición control (LB-BSA (en azul) y LB-PknG desnaturalizada (en fucsia)) y con LB-PknG (en verde). El pulso fue de 30 min y el *chase* de 60 min. Se determinó la intensidad de fluorescencia del lysotracker® Red en el *gate* representado en rojo. Resultados previos del laboratorio.

Por otra parte, en el marco de esta tesis se evaluó si el efecto de PknG sobre la maduración del fagosoma está mediado por su actividad quinasa utilizando un inhibidor irreversible específico. Se utilizó un ácido graso nitrado (OA-NO<sub>2</sub>), que vía una reacción de adición de Michael modifica cisteínas críticas del dominio rubredoxina de PknG. Los aductos de Michael generados mediante una reacción de nitroalquilación son típica-

#### Discusión de resultados



mente revertidos con tioles, sin embargo, OA-NO<sub>2</sub> promueve la liberación del ion metálico del dominio rubredoxina de PknG, inhibiendo irreversiblemente a esta quinasa. A continuación de haber realizado el proceso de inhibición *in vitro* de PknG con OA-NO<sub>2</sub> se procedió a remover el nitrolípido con GSH, y a eliminar el exceso del mismo mediante microcromatografía. De esta manera, es posible asegurarse que se está evaluando únicamente el efecto que genera PknG inhibida en la maduración fagosomal, y no el efecto del nitrolípido.

Mediante los experimentos realizados con microscopía confocal con las sondas fluorescentes LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup> no se puede afirmar que existan diferencias de pH significativas entre PknG y PknG-OA-NO<sub>2</sub>. Por lo tanto, no pudimos concluir que la inhibición de PknG tenga un efecto en la inhibición de la maduración del fagosoma. Los resultados obtenidos indicarían que el proceso de inhibición de la maduración del fagosoma no está mediado por la actividad quinasa de PknG. Sin embargo, es necesario hacer notar que debido a problemas experimentales el número de LB medidas en la condición de PknG inhibida fue menor al resto de las condiciones. Se requiere de un recuento de un mayor número de LB, y de réplicas biológicas para validar este resultado.

El hecho que la distribución de los valores de intensidad de fluorescencia de PknG inhibida no presente una distribución estándar podría ser

## Discusión de resultados



indicativo de la existencia de dos poblaciones de PknG en las LB condición OA-NO<sub>2</sub>. A pesar de que el modelo de inhibición estaba puesto a punto en el laboratorio, los distintos lotes de OA-NO<sub>2</sub> no son igualmente activos. Es posible que la inhibición de la actividad quinasa de PknG realizada por OANO<sub>2</sub> no sea completa, y coexistan en la partícula de látex PknG inhibida y funcional. En el modelo de inhibición *in vitro* que se encontraba puesto a punto en el laboratorio [75] se remueve el nitrolípido con el tiol DTT (ditiotreitól). Sin embargo, debido a la toxicidad celular de este compuesto se procedió a remover el OA-NO<sub>2</sub> con GSH, un tiol menos nocivo para las células. El GSH está menos caracterizado en lo que respecta a la remoción del nitrolípido del dominio Rbx de PknG. Como una perspectiva a futuro se debe optimizar aún más el modelo de inhibición *in vitro* de PknG con OA-NO<sub>2</sub> para realizar ensayos de fagocitosis celular. Es posible realizar la puesta a punto del proceso de inhibición mediante espectrometría de masa. Existe una diferencia de masa específica entre un péptido tríptico procedente de una PknG inhibida respecto de al péptido tríptico procedente de una PknG funcional, diferencia que puede ser detectada incluso luego de haber removido el nitrolípido con un tiol.

Las sondas fluorescentes sensibles al pH han sido ampliamente empleadas en la investigación de la fagocitosis celular. Pero en la mayoría de los casos, su uso se asocia con cambios y disminuciones espectrales en la intensidad de fluorescencia en el pH ácido cuando se encuentra

#### Discusión de resultados



dentro de fagosomas. En el presente trabajo se desarrolló un modelo que permite estudiar la fagocitosis mediante una sonda sensible al pH, que es mínimamente fluorescente a pH neutro fuera de la célula, pero altamente fluorescente en el ambiente ácido del fagosoma. En conclusión, la nueva metodología puesta a punto que utiliza las sondas fluorescentes LAUR-DAN y pHrodo<sup>®</sup> es más apropiada que el dextrano-FITC para estudiar el proceso de maduración fagosomal; y los resultados obtenidos con la misma presentan coherencia con resultados previos obtenidos por otras metodologías.



## X. Conclusiones y perspectivas

Se produjeron exitosamente PknG y GarA recombinantes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Se logró poner a punto una nueva metodología para estudiar el proceso de maduración fagosomal *in vivo* mediante microscopía confocal utilizando las sondas fluorescentes LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup>. Esta metodología corroboró los resultados previos de nuestro laboratorio, ya que se observaron diferencias significativas entre la intensidad de fluorescencia de pHrodo<sup>®</sup> en una partícula de látex con PknG acoplada con respecto a una LB control. Esta nueva metodología permite obtener resultados cuantitativos y objetivos del nivel de maduración fagosomal. Asimismo, al incorporar una sonda de membrana mediante la obtención de imágenes en planos focales adyacentes permite distinguir entre LB fagocitadas de las que se encuentran en planos superiores a la célula alineadas en el eje óptico. Aprovechando la capacidad del LAURDAN para detectar cambios en la fluidez de las membranas, a futuro se podría estudiar la modulación de la fluidez de la membrana de un fagosoma durante el proceso de maduración. Sería interesante investigar si los cambios de fluidez observados se relacionan con cambios en el pH del fagosoma.



Los resultados obtenidos con microscopía confocal y LAURDAN y pHrodo<sup>®</sup> indicarían que el proceso de inhibición de la maduración del fagosoma no está mediado por la actividad quinasa de PknG. No fueron observadas diferencias de pH significativas entre PknG y PknG inhibida. Es posible que la inhibición de la actividad quinasa de PknG realizada por OA-NO<sub>2</sub> no sea completa, y coexistan en la partícula de látex PknG inhibida y funcional. Como una perspectiva a futuro se debe optimizar aún más el modelo de inhibición *in vitro* de PknG con OA-NO<sub>2</sub> para realizar ensayos de fagocitosis celular.



## XI. Bibliografía

- [1] Organización Mundial de la Salud (OMS), Global Tuberculosis Report, Ginebra, Suiza, 2014.
- [2] National Collaborating Centre for Chronic Conditions (Gran Bretaña), Tuberculosis: clinical diagnosis and management of tuberculosis, and measures for its prevention and control, Londres: Royal College of Physicians, 2006.
- [3] T. Parimon, C. E. Spitters, N. Muangman, J. Euathrongchit, E. Oren y M. Narita, «Unexpected pulmonary involvement in extrapulmonary tuberculosis patients», *CHEST Journal*, vol. 134, nº 3, p. 589-594, 2008.
- [4] J. Grosset, «*Mycobacterium tuberculosis* in the Extracellular Compartment: an Underestimated Adversary», *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, vol. 47, nº 3, p. 833–836, 2003.
- [5] R. Crevel, T. Ottenhoff y J. Van der Meer, «Innate Immunity to *Mycobacterium tuberculosis*», *American Society for Microbiology*, vol. 15, nº 2, p. 294–309, 2002.
- [6] D. Russell, «*Mycobacterium tuberculosis* and the intimate discourse of a chronic infection», *Immunological reviews*, vol. 240, nº 1, p. 252-268, 2011.
- [7] D. L. Clemens y M. A. Horwitz, «Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* phagosome and evidence that phagosomal maturation is inhibited», *The Journal of experimental medicine*, vol. 181, nº 1, p. 257-270, 1995.
- [8] G. Weiss y U. Schaible, «Macrophage defense mechanisms against intracellular bacteria», *Immunological reviews*, vol. 241, nº 1, p. 182-203, 2015.
- [9] L. Ramakrishnan, «Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis», *Nature Reviews Immunology*, vol. 12, nº 5, p. 352-366, 2012.
- [10] S. Ehrt, K. Rhee y D. Schnappinger, «Mycobacterial genes essential for the pathogen's survival in the host», *Immunological reviews*, vol. 264, nº 1, p. 319-326, 2015.
- [11] M. J. Fenton, M. W. Vermeulen, S. Kim, M. Burdick, R. M. Strieter y H. Kornfeld, «Induction of gamma interferon production in human



alveolar macrophages by *Mycobacterium tuberculosis*», *Infection and immunity*, vol. 65, nº 12, p. 5149-5156, 1997.

- [12] T. Mustafa, S. Phyu, R. Nilsen, R. Jonsson y G. Bjune, «A mouse model for slowly progressive primary tuberculosis», *Scandinavian journal of immunology*, vol. 50, nº 2, p. 127-136, 1999.
- [13] Organización Mundial de la Salud (OMS), [En línea]. Available: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs104/es/>. [Último acceso: 3 febrero 2015].
- [14] Organización Mundial de la Salud (OMS), [En línea]. Available: <http://www.who.int/tb/challenges/ltbi/en/>. [Último acceso: 15 Marzo 2015].
- [15] C. Montagnani, E. Chiappini, L. Galli y M. de Martino, «Vaccine against tuberculosis: what's new?», *BMC infectious diseases*, vol. 14, nº 1, p. S2, 2014.
- [16] Organización Mundial de la Salud (OMS), *Treatment of tuberculosis guidelines*, 4 ed, Ginebra, Suiza, 2010.
- [17] Organización Mundial de la Salud (OMS), [En línea]. Available: <http://www.who.int/tb/challenges/mdr/faqs/es/>. [Último acceso: 2 Noviembre 2015].
- [18] Organización Mundial de la Salud (OMS), [En línea]. Available: <http://www.who.int/features/qa/79/en/>. [Último acceso: 30 Junio 2015].
- [19] Organización Mundial de la Salud (OMS), *Guidelines for the programmatic management of drug-resistant Tuberculosis*, Ginebra, Suiza, 2008.
- [20] A. Wehenkel, M. Bellinzoni, M. Grana, R. Duran, A. Villarino, P.-L. Fernandez, P. England, H. Takiff, C. Cervenansky, S. Cole y P. Alzari, «Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: physiological roles and therapeutic potential», *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins and Proteomics*, vol. 1784, nº 1, p. 193–202, 2008.
- [21] R. Szekely, F. Waczek, I. Szabadkai, G. Nemeth, B. Hegymegi-Barakonyi, D. Eros, B. Szokol, J. Pato, D. Hafenbradl, J. Satchell, B. Saint-Joanis, S. T. Cole, L. Orfi, B. Klebl y G. Keri, «A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signalling», *Immunology letters*, vol. 116, nº 2, p. 225–231, 2008.
- [22] L. Nguyen y J. Pieters, «The Trojan horse: survival tactics of pathogenic mycobacteria in macrophages», *Trends in cell biology*, vol. 15, nº 5, p. 269-276, 2005.

## Bibliografía



- [23] A. Walburger, A. Koul, G. Ferrari, L. Nguyen, C. Prescianotto-Baschong, K. Huygen, B. Klebl, C. Thompson, G. Bacher y J. Pieters, «Protein Kinase G from Pathogenic Mycobacteria Promotes Survival Within Macrophages» *Science*, vol. 304, nº 5678, p. 1800–1804, 2004.
- [24] Y. Av-Gay y M. Everett, «The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*», *Trends in microbiology*, vol. 8, nº 5, p. 238–244, 2000.
- [25] N. Scherr y J. Pieters, «The eukaryotic-like serine/threonine protein kinase family in mycobacteria», *Mycobacterium: Genomics and Molecular Biology*, Pittsburgh, PA, Horizon Press, 2009, p. 171-188.
- [26] T. Yeung, B. Ozdamar, P. Paroutis y S. Grinstein, «Lipid metabolism and dynamics during phagocytosis», *Current opinion in cell biology*, vol. 18, nº 4, p. 429-437, 2006.
- [27] S. Silverstein, S. Greenberg, F. Di Virgilio y T. Steinberg, de *Phagocytosis. In fundamental Immunology*, Segunda ed., Nueva York Raven Press Ltd, 1989, p. 703-719.
- [28] T. Lang, C. de Chastellier, A. Ryter y L. Thilo, «Endocytic membrane traffic with respect to phagosomes in macrophages infected with non-pathogenic bacteria: phagosomal membrane acquires the same composition as lysosomal membrane», *European journal of cell biology*, vol. 46, nº 1, p. 39–50, 1988.
- [29] F. Niedergang y P. Chavrier, «Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagosome», *Current opinion in cell biology*, vol. 16, nº 4, p. 422-428, 2004.
- [30] S. Greenberg y S. Grinstein, «Phagocytosis and innate immunity» *Current opinion in immunology*, vol. 14, nº 1, p. 136-145, 2002.
- [31] M. Desjardins, L. A. Huber, R. G. Parton y G. Griffiths, «Biogenesis of phagolysosomes proceeds through a sequential series of interactions with the endocytic apparatus», *The Journal of cell biology*, vol. 124, nº 5, p. 677-688, 1994.
- [32] L. Mayorga, F. Bertini y F. Stahlqll, «Fusion of Newly Formed Phagosomes with Endosomes in Intact Cells and in a Cell-free System», *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 266, nº 10, p. 6511-6517, 1991 .
- [33] A. Pitt, M. L.S., P. Stahl y A. Schwartz, «Alterations in the protein composition of maturing phagosomes», *Journal of Clinical Investigation*, vol. 90, nº 5, p. 1978-1983, 1992.
- [34] R. Fratti, I. Vergne, J. S. J. Chua y V. Deretic, «Regulators of membrane trafficking and Mycobacterium tuberculosis phagosome

## Bibliografía



- maturation block», *Electrophoresis*, vol. 21, nº 6, p. 3378-3385, 2000.
- [35] C. Rosales, *Molecular Mechanisms of Phagocytosis*, USA: Springer Science & Business Media, 2008.
- [36] H. Stenmark, G. Vitale, O. Ullrich y M. Zerial, «Rabaptin-5 is a direct effector of the small GTPase Rab5 in endocytic membrane fusion», *Cell*, vol. 83, nº 3, p. 423–432, 1995.
- [37] S. Christoforidis, M. Miaczynska, K. Ashman, M. Wilm, L. Zhao, S. Yip, M. Waterfield, J. Backer y M. Zerial, «Phosphatidylinositol-3-OH kinases are Rab5 effectors», *Nature Cell Biology*, vol. 1, nº 4, p. 249-252, 1999.
- [38] E. Nielsen, S. Christoforidis, S. Uttenweiler-Joseph, M. M., D. F., M. Wilm, B. Hoflack y M. Zerial, «Rabenosyn-5, a Novel Rab5 Effector, Is Complexed with Hvps45 and Recruited to Endosomes through a Fyve Finger Domain», *Journal of Cell Biology*, vol. 151, nº 3, p. 601-602, 2000.
- [39] I. Jordens, M. Fernandez-Borja, M. Marsman, S. Dusseljee, L. Janssen, J. Calafat, H. Janssen, R. Wubbolts y J. Neefjes, «The Rab7 effector protein RILP controls lysosomal transport by inducing the recruitment of dynein-dynactin motors», *Current Biology*, vol. 11, nº 21, p. 1680-1685, 2001.
- [40] M. Desjardins, N. Nzala, R. Corsini y C. Rondeau, «Maturation of phagosomes is accompanied by changes in their fusion», *Journal of Cell Science*, vol. 110, nº 18, p. 2303-2314, 1997.
- [41] E. Imbulzequetal, C. Gamazo, J. Ariza y M. Prieto, «Drug delivery systems for potential treatment of intracellular bacterial infections» *Frontiers in Bioscience*, vol. 15, p. 397-417, 2010.
- [42] W. Li y J. Xie, «Role of mycobacteria effectors in phagosome maturation blockage and new drug targets discovery», *Journal of cellular biochemistry*, vol. 112, nº 10, p. 2688–2693, 2011.
- [43] L. Vergne, J. Chua, H. Lee, M. Lucas, J. Belisle y V. Deretic, «Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable *Mycobacterium tuberculosis*», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, nº 11, p. 4033-4038, 2005.
- [44] I. Vergne, J. Chua y V. Deretic, «Tuberculosis Toxin Blocking Phagosome Maturation Inhibits a Novel  $Ca^{2+}$ /Calmodulin-PI3K hVPS34 Cascade», *The Journal of experimental medicine*, vol. 198, nº 4, p. 653–659, 2003.
- [45] M. A. Forrellad, L. I. Klepp, A. Gioffré, J. Sabio y Garcia, H. R. Morbidoni, M. Santangelo y F. Bigi, «Virulence factors of the

## Bibliografía



- Mycobacterium tuberculosis* complex», *Virulence*, vol. 4, nº 1, p. 3-66, 2013.
- [46] D. Wong, H. Bach, J. Sun, Z. Hmama y Y. Av-Gay, «*Mycobacterium tuberculosis* protein tyrosine phosphatase (PtpA) excludes host vacuolar-H<sup>+</sup>-ATPase to inhibit phagosome acidification», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, nº 48, p. 19371-19376, 2011.
- [47] A. Stock, V. Robinson y P. Goudreau, «Two-component signal transduction», *Annual review of biochemistry*, vol. 69, nº 1, p. 183-215, 2000.
- [48] J. Skerker, B. Perchuk, A. Siryaporn, E. Lubin, O. Ashenberg, M. Goulian y M. Laub, «Rewiring the specificity of two-component signal transduction systems», *Cell*, vol. 133, nº 6, p. 1043-1054, 2008.
- [49] T. Hunter, «Signaling--2000 and beyond», *Cell*, vol. 100, nº 1, p. 113-117, 2000.
- [50] S. Hakansson, E. Galyov, R. Rosqvist y H. Wolf-Watz, «The Yersinia YpkA Ser/Thr kinase is translocated and subsequently targeted to the inner surface of the HeLa cell plasma membrane», *Molecular microbiology*, vol. 20, nº 3, p. 593-603, 1996.
- [51] J. Wang, C. Li, H. Yang, A. Mushegian y S. Jin, «A novel serine/threonine protein kinase homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full virulence in neutropenic mice», *Journal of bacteriology*, vol. 180, nº 24, p. 593-603, 1998.
- [52] P. Cohen, «Protein kinases—the major drug targets of the twenty-first century?», *Nature reviews Drug discovery*, vol. 1, nº 4, p. 309-315, 2002.
- [53] S. T. Cole, R. Brosch, J. Parkhill, T. Garnier y C. e. a. Churcher, «Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence», *Nature*, vol. 393, nº 6685, p. 537-544, 1998.
- [54] N. Scherr, S. Honappa, G. Kunz, P. Mueller, R. Jayachandran, F. Winkler, J. Pieters y M. Steinmetz, «Structural basis for the specific inhibition of protein kinase G, a viulence factor of *Mycobacterium tuberculosis*», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, nº 29, p. 12151-12156, 2007.
- [55] H. O'Hare, R. Durán, C. Cerveñansky, M. Bellinzoni, A. Wehenkel, O. Pritsch, G. Obal, J. Baumgartner, J. Vialaret, K. Johnsson y P. Alzari, «Regulation of glutamate metabolism by protein kinases in



- mycobacteria», *Molecular microbiology*, vol. 70, nº 6, p. 1408-1423, 2008.
- [56] M. D. Jackson y J. M. Denu, «Molecular reactions of protein phosphatases insights from structure and chemistry», *Chemical Reviews*, vol. 101, nº 8, p. 2313-2340, 2001.
- [57] S. Cole, K. Eiglmeier, J. Parkhill, James, K.D, N. W. P. Thomson, N. Honore, T. Garnier, C. Churcher, D. Harris, K. Mungall, Basham.D, D. Brown, T. Chillingworth, R. Connor, R. Davies, K. Devlin, S. Duthoy, T. Feltwell y A. Fraser, «Massive gene decay in the leprosy bacillus», *Nature*, vol. 409, nº 6823, p. 1007-1011, 2001.
- [58] C. Sasseti, D. Boyd y E. Rubin, «Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis», *Molecular microbiology*, vol. 48, nº 1, p. 77-84, 2003.
- [59] C. Sasseti, Rubin y E.J, «Genetic requirements for mycobacterial survival during infection», *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 100, nº 22, p. 12989-12994, 2003.
- [60] R. Chaba, M. Raje y P. Chakraborti, «Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division», *European Journal of Biochemistry*, vol. 269, nº 4, p. 1078–1085, 2002.
- [61] C. M. Kang, D. W. Abbott, S. T. Park, C. C. Dascher, L. C. Cantley y R. N. Husson, «The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape», *Genes & development*, vol. 19, nº 14, p. 1692–1704, 2005.
- [62] S. Cowley, M. Ko, N. Pick, R. Chow, K. J. Downing, B. G. Gordhan, Betts, V. Mizrahi, Smith, D. A., R. Stokes y Y. Av-Gay, «The *Mycobacterium tuberculosis* protein serine/threonine kinase PknG is linked to cellular glutamate/glutamine levels and is important for growth *in vivo*», *Molecular microbiology*, vol. 52, nº 6, p. 1691-1702, 2004.
- [63] M. Ventura, B. Rieck, F. Boldrin, G. Degiacomi, M. Bellinzoni, N. Barilone y H. M. O'Hare, «GarA is an essential regulator of metabolism in *Mycobacterium tuberculosis*», *Molecular microbiology*, vol. 90, nº 2, p. 356-366, 2013.
- [64] A. Villarino, R. Durán, A. Wehenkel, P. Fernandez, P. England y P. Brodin, «Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrates: PknB recruits GarA; a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions», *Journal of molecular*



*biology*, vol. 350, nº 5, p. 953-963, 2005.

- [65] L. Sieker, R. Stenkamp y J. LeGall, «Rubredoxin in crystalline state», *Methods in enzymology*, vol. 243, p. 203–216, 1994.
- [66] J. B. van Beilen, M. Neuenschwander, T. H. Smits, C. Roth, S. B. Balada y B. Witholt, «Rubredoxins involved in alkane oxidation», *Journal of bacteriology*, vol. 184, nº 6, p. 1722-1732, 2002.
- [67] D. Tiwari, R. Singh, K. Goswami, S. Verma, B. Prakash y V. Nandicoori, «Key residues in *Mycobacterium tuberculosis* protein kinase G play a role in regulating kinase activity and survival in the host», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 284, nº 40, p. 27467-27479, 2009.
- [68] M. Ortiz-Lombardía, F. Pompeo, B. B. y P. Alzari, «Crystal structure of the catalytic domain of the PknB serine/threonine kinase from *Mycobacterium tuberculosis*», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 278, nº 15, p. 13094–13100, 2003.
- [69] C. Mieczkowski, A. T. Iavarone y T. Alber, «Auto-activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* PknB receptor Ser/Thr kinase», *The EMBO journal*, vol. 27, nº 23, p. 3186–3197, 2008.
- [70] N. Anand, P. Singh, A. Sharma, S. Tiwari, V. Singh, D. Singh, K. Srivastava, B. Singh y R. Tripathi, «Synthesis and evaluation of small libraries of triazolylmethoxy chalcones, flavanones and 2-aminopyrimidines as inhibitors of mycobacterial FAS-II and PknG», *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, nº 17, p. 5150–5163, 2012.
- [71] F. Schopfer, C. Batthyany, P. Baker, G. Bonacci, M. Cole, V. Rudolph, A. Groeger, T. Rudolph, S. Nadtochiy, P. Brookes y B. Freeman, «Detection and quantification of protein adduction by electrophilic fatty acids: mitochondrial generation of fatty acid nitroalkene derivatives», *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 46, nº 9, p. 1250–1259, 2009.
- [72] C. Batthyany, F. Schopfer, P. Baker, R. Duran, L. Baker, Y. Huang, C. Cervenansky, B. Branchaud y B. Freeman, «Reversible post-translational modification of proteins by nitrated fatty acids in vivo», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 281, nº 29, p. 20450–20463, 2006.
- [73] F. Schopfer, M. Cole, A. Groeger, C. Chen, N. Khoo, S. R. Woodcock, F. Golin-Bisello, U. Motanya, Y. Li, J. Zhang, M. Garcia-Barrio, T. Rudolph, V. Rudolph, G. Bonacci, P. Baker, H. Xu, C. Batthyany, Y. Chen, T. Hallis y B. Freeman, «Covalent Peroxisome



- Proliferator-activated Receptor  $\gamma$  Adduction by Nitro-fatty Acids. Selective Ligand Activity and Anti-Diabetic signaling actions», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, nº 16, p. 12321–12333, 2010.
- [74] M. Gil, M. Graña, F. Schopfer, T. Wagner, A. Denicola, B. Freeman, P. Alzari, C. Batthyány y R. Durán, «Inhibition of *Mycobacterium tuberculosis* PknG by non-catalytic rubredoxin domain specific modification: reaction of an electrophilic nitro-fatty acid with the Fe–S center», *Free Radical Biology and Medicine*, vol. 65, p. 150–161, 2013.
- [75] C. Batthyany y R. Durán, «Composition and Method for Inhibition of PknG from *Mycobacterium tuberculosis*». EEUU Patente U.S. Provisional Application No. 61/835,416.
- [76] P. Baker, Y. Lin, F. Schopfer, S. Woodcock, A. Groeger, C. Batthyany, S. Sweeney, M. Long, K. Iles, L. Baker, B. Branchaud, Y. Chen y B. Freeman, «Fatty acid transduction of nitric oxide signaling: multiple nitrated unsaturated fatty acid derivatives exist in human blood and urine and serve as endogenous peroxisome proliferator-activated receptor ligands», *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 280, nº 51, p. 42464–42475, 2005.
- [77] A. Lima, M. Gil, M. Portela, R. Durán, M. Álvarez y C. Batthyány, «Efecto de la Ser/Thr-quinasa PknG de *Mycobacterium tuberculosis* en la inhibición de la maduración fagosomal en macrófagos murinos», de *XIV Jornadas de la Sociedad Uruguaya de Biociencias*, Piriápolis, 2012.
- [78] M. Wetzel y E. Korn, «Phagocytosis of latex beads by *Acanthamoeba castellanii* (Neff) III. Isolation of the phagocytic vesicles and their membranes», *The Journal of cell biology*, vol. 43, nº 1, p. 219-227, 1969.
- [79] J. Wiley, «Chapter 16 Mass Spectrometry», *Current Protocols in Protein Science*, New York, 2000, 16.0-16.2.
- [80] R. D. LeDuc, «Bioinformatics of High Throughput Proteomics Using Tandem Mass Spectrometry of Intact Proteins», Urbana, ProQuest, 2007.
- [81] GE Healthcare Life Sciences, [En línea]. Available: <http://www.gelifesciences.com/webapp/wcs/stores/servlet/catalog/en/GELifeSciences-ar/products/2-d-electrophoresis-and-2-d-dige/>. [Último acceso: 25 07 2015].
- [82] B. Domon y R. Aebersold, «Options and considerations when selecting a quantitative proteomics strategy», *Nature biotechnology*,



vol. 28, nº 7, p. 710–721 , 2010.

- [83] L. McHugh y J. Arthur, «Computational methods for protein identification from mass spectrometry data», *PLoS Computational Biology*, vol. 4, nº 2, p. 1-12, 2008.
- [84] H. Lam y R. Aebersold, «Spectral library searching for peptide identification via tandem MS», *Proteome Bioinformatics*, vol. 604, p. 95-103, 2010.
- [85] A. M. Frank, M. M. Savitski, M. L. Nielsen, R. A. Zubarev y P. A. Pevzner, «De novo peptide sequencing and identification with precision mass spectrometry», *Journal of proteome research*, vol. 6, nº 1, p. 114–123, 2007.
- [86] L. Kall, J. D. Canterbury, J. Weston, W. S. Noble y M. J. MacCoss, «Semi-supervised learning for peptide identification from *shotgun* proteomics datasets», *Nature Methods*, vol. 4, nº 11, p. 923–925, 2007.
- [87] J. Gao, M. S. Friedrichs, A. R. Dongre y G. J. Opiteck, «Guidelines for the routine application of the peptide hits technique», *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, vol. 16, nº 8, p. 1231-1238, 2005.
- [88] B. L. Zybilov, L. Florens y M. P. Washburn, «Quantitative *shotgun* proteomics using a protease with broad specificity and normalized spectral abundance factors», *Molecular BioSystems*, vol. 3, nº 5, p. 354-360, 2007.
- [89] C. Ahrens, E. Brunner, E. Qeli, K. Basler y R. Aebersold, «Generating and navigating proteome maps using mass spectrometry», *Nature Reviews Molecular Cell Biology* , vol. 11, nº 7, p. 789-801, 2010.
- [90] Sigma Aldrich, [En línea]. Available: [http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product\\_Information\\_Sheet/1/fd10spis.pdf](http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigmaaldrich/docs/Sigma/Product_Information_Sheet/1/fd10spis.pdf). [Último acceso: 1 10 2015].
- [91] S. Sanchez, M. Tricerri, G. Gunther y E. Gratton, «Laurdan Generalized Polarization: from cuvette to microscope», *Modern Research and Educational Topics in Microscopy (Formatex)*, vol. 2, p. 1007-1014, 2007.
- [92] T. Parasassi, E. Krasnowska, L. Bagatolli y E. Gratton, «Laurdan and Prodan as Polarity-Sensitive Fluorescent Membrane Probes», *Journal of Fluorescence*, vol. 8, nº 4, p. 365-373, 1998.
- [93] T. Parasassi, G. Stasio, G. Ravagnan y R. y. G. E. Rusch, «Quantitation of lipid phases in phospholipid vesicles by the

## Bibliografía



- generalized polarization of Laurdan fluorescence», *Journal Biophysical*, vol. 60, nº 1, p. 179–189, 1991.
- [94] M. M. Dodes Traian, «Estudio de las interacciones entre fosfolípidos y proteínas integrales de membrana. Efectos sobre la actividad enzimática de una ATPasa transportadora de  $\text{Ca}^{2+}$ », Biblioteca Digital de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales - Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, 2014.
- [95] Life Technologies, [En línea]. Available: <https://www.lifetechnologies.com/order/catalog/product/P35372>. [Último acceso: 15 Mayo 2015].
- [96] P. C. Carvalho, J. S. Fischer, T. Xu, J. R. Yates y V. Barbosa, «PatternLab: from mass spectra to label-free differential shotgun proteomics», *Current Protocols In Bioinformatics*, 2012, Capítulo 13, Unidad 13.19.
- [97] W. Lovenberg y B. Sobel, «Rubredoxin: a new electron transfer protein from *Clostridium pasteurianum*», *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 54, nº 1, p. 193–199, 1965.
- [98] G. Griffiths, «On phagosome individuality and membrane signalling networks», *Trends in cell biology*, vol. 14, nº 7, p. 343-351, 2004.
- [99] S. Seto, S. Matsumoto, I. Ohta, K. Tsujimura y Y. Koide, «Dissection of Rab7 localization on *Mycobacterium tuberculosis* phagosome», *Biochemical and biophysical research communications*, vol. 387, nº 2, p. 272-277, 2009.
- [100] G. M. Cooper, «Lysosomes,» de *The Cell, 2nd edition*, Sunderland (MA): Sinauer Associates, 2000.
- [101] J. Garin, R. Diez, S. Kieffer, J. F. Dermine, S. Duclos, E. Gagnon y M. Desjardins, «The phagosome proteome insight into phagosome functions», *The Journal of cell biology*, vol. 152, nº 1, p. 165-180, 2001.
- [102] M. Trost, L. English, S. Lemieux, Courcelles, D. M. M. y P. Thibault, «The phagosomal proteome in interferon- $\gamma$ -activated macrophages», *Immunity*, vol. 31, nº 1, p. 143-154, 2009.
- [103] Q. Li, «Phagosome proteomics: a powerful tool to assess bacteria-mediated immunomodulation», *Bioengineered bugs*, vol. 2, nº 4, p. 194-198, 2011.
- [104] D. A. Drevets y P. A. Campbell, «Macrophage phagocytosis: use of fluorescence microscopy to distinguish between extracellular and intracellular bacteria», *Journal of immunological methods*, vol. 142,



nº 1, p. 31-3, 1991.

- [105] M. Majeed, E. Cavegion, Lowell, C. A. y G. Berton, «Role of Src kinases and Syk in Fc $\gamma$  receptor-mediated phagocytosis and phagosome-lysosome fusion», *Journal of Leukocyte Biology*, vol. 70, nº 5, p. 801-811, 2001.
- [106] P. D. Arora, M. F. Manolson, Downey, G. P., J. Sodek y C. A. McCulloch, «A novel model system for characterization of phagosomal maturation, acidification, and intracellular collagen degradation in fibroblasts», *Journal of Biological Chemistry*, vol. 275, nº 45, p. 35432-35441., 2000.
- [107] M. Lecuit, H. Ohayon, L. Braun, J. Mengaud y P. Cossart, «Internalin of *Listeria monocytogenes* with an intact leucine-rich repeat region is sufficient to promote internalization», *Infection and immunity*, vol. 65, nº 12, p. 5309-5319, 1997.
- [108] G. Kim, R. Dayam, A. Prashar, M. Terebiznik y R. Botelho, «PIKfyve Inhibition Interferes with Phagosome and Endosome Maturation in Macrophages», *Traffic*, vol. 15, nº 1, p. 1143-1163, 2014.
- [109] J. Sun, X. Wang, A. Lau, T.-Y. Liao y C. Bucci, «Mycobacterial Nucleoside Diphosphate Kinase Blocks Phagosome Maturation in Murine Raw 264.7 Macrophages», *Plos One*, vol. 5, nº 1, p. e8769 1-12, 2010.
- [110] R. Fratti, J. Backer, J. Gruenberg, S. Corvera y V. Deretic, «Role of phosphatidylinositol 3-kinase and Rab5 effectors in phagosomal biogenesis and mycobacterial phagosome maturation arrest», *The Journal of cell biology*, vol. 154, nº 3, p. 631-644, 2001.
- [111] A. Andrade y M. Valvano, «A *Burkholderia cenocepacia* gene encoding a non-functional tyrosine phosphatase is required for the delayed maturation of the bacteria-containing vacuoles in macrophages», *Microbiology*, vol. 160, nº Pt 7, p. 1332–1345, 2014.
- [112] Thermo fisher Scientific, «The Molecular Probes Handbook,» 2010, 20.2.



## XII. Material complementario

### ANEXO A. Proteoma de fagosomas conteniendo LB

<b>Locus,</b> es el nombre de la proteína en la base de datos	<b>Longitud</b> en resi- duos de aminoá- cidos	<b>Contador</b> <b>de pépti-</b> <b>dos únicos,</b> aquellos que sólo existen en una pro- teína del proteoma de interés	<b>Contador</b> <b>de se-</b> <b>cuencia,</b> número total de péptidos identifi- cados	<b>Contador</b> <b>de espec-</b> <b>tro,</b> número total de espectros identifi- cados	<b>Cobertura</b> de la se- cuencia (%)	<b>Descripción</b>
<b>Contaminant</b> <b>KERATIN13</b>	643	24	34	155	44,9	
<b>Contaminant</b> <b>KERATIN03</b>	593	25	35	132	54,1	
<b>Contaminant</b> <b>KERATIN22</b>	645	31	40	129	70	
<b>Contaminant</b> <b>KERATIN02</b>	622	32	32	113	58,5	
<b>P20152</b>	466	31	31	90	57,9	Vimentin GN=Vim PE=1 SV=3
<b>P58252</b>	858	30	30	80	43,8	Elongation factor 2 GN=Eef2 PE=1 SV=2
<b>Q8VDD5</b>	1960	33	33	71	19,1	Myosin-9 GN=Myh9 PE=1 SV=4
<b>Contaminant</b> <b>INT-STD1</b>	607	25	25	56	43,4	BSA
<b>P16858</b>	333	1	18	52	48	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase GN=Gapdh PE=1 SV=2
<b>P52480</b>	531	22	22	52	48,9	Pyruvate kinase PKM OS=Mus musculus GN=Pkm PE=1 SV=4
<b>Contaminant</b> <b>KERATIN17</b>	590	4	21	50	31,3	
<b>P68040</b>	317	16	16	47	73,5	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 OS=Mus musculus GN=Gnb2l1 PE=1 SV=3
<b>P40142</b>	623	16	16	45	36,6	Transketolase GN=Tkt PE=1 SV=1
<b>P60710</b>	375	1	15	44	50,6	Actin, cytoplasmic 1 GN=Actb PE=1 SV=1
<b>Contaminant</b>	471	3	15	43	39	



KERATIN05						
<b>Q922U2</b>	580	2	15	39	17,4	Keratin, type II cytoskeletal 5 GN=Krt5 PE=1 SV=1
<b>P10126</b>	462	14	14	39	35,9	Elongation factor 1-alpha 1 GN=Eef1a1 PE=1 SV=3
<b>P63017</b>	646	15	16	39	30,1	Heat shock cognate 71 kDa protein GN=Hspa8 PE=1 SV=1
<b>Contaminant KERATIN18</b>	562	5	15	37	31,6	
<b>P62908</b>	243	12	12	34	51,8	40S ribosomal protein S3 GN=Rps3 PE=1 SV=1
<b>P14206</b>	295	11	11	34	44,7	40S ribosomal protein SA GN=Rpsa PE=1 SV=4
<b>O88569</b>	353	11	13	33	31,7	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1 GN=Hnrnpa2b1 PE=1 SV=2
<b>Contaminant KERATIN08</b>	469	4	12	33	27,08	
<b>Q9EQK5</b>	861	1	13	31	15,2	Major vault protein GN=Mvp PE=1 SV=4
<b>P50580</b>	394	10	10	29	24,8	Proliferation-associated protein 2G4 GN=Pa2g4 PE=1 SV=3
<b>P35700</b>	199	1	9	28	36,1	Peroxiredoxin-1 GN=Prdx1 PE=1 SV=1
<b>Q8BTS0</b>	615	0	10	27	18,3	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 5 GN=Ddx5 PE=2 SV=1
<b>P04104</b>	637	1	6	27	5,8	Keratin, type II cytoskeletal 1 GN=Krt1 PE=1 SV=4
<b>Contaminant KERATIN21</b>	357	1	11	26	33,6	
<b>Q9QXS1</b>	4691	2	16	26	3,1	Plectin GN=Plec PE=1 SV=3
<b>P62702</b>	263	10	10	26	36,8	40S ribosomal protein S4, X isoform GN=Rps4x PE=2 SV=2
<b>E9Q070</b>	317	7	7	25	40,3	Uncharacterized protein GN=Gm8730 PE=3 SV=1
<b>P02535</b>	570	0	10	25	19,4	Keratin, type I cytoskeletal 10 GN=Krt10 PE=1 SV=3
<b>Contaminant KERATIN07</b>	473	1	8	25	16,4	
<b>Q8BG05</b>	379	4	13	25	24,2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A3 GN=Hnrnpa3 PE=1 SV=1
<b>P97429</b>	319	9	9	25	27,2	Annexin A4 GN=Anxa4 PE=2 SV=4
<b>P62830</b>	140	7	7	24	36,43	60S ribosomal protein L23 GN=Rpl23 PE=1 SV=1
<b>P35979</b>	165	6	6	24	54,55	60S ribosomal protein L12 GN=Rpl12 PE=1 SV=2
<b>P62737</b>	377	3	9	23	16,45	Actin, aortic smooth muscle GN=Acta2 PE=1 SV=1
<b>P27659</b>	403	9	9	23	28,04	60S ribosomal protein L3 GN=Rpl3

Modulación de la maduración del fagosoma por una quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*



						PE=1 SV=3
<b>Q61233</b>	627	13	13	23	22,49	Plastin-2 GN=Lcp1 PE=1 SV=4
<b>E9Q555</b>	5150	2	13	23	2,58	E3 ubiquitin-protein ligase RNF213 GN=Rnf213 PE=2 SV=1
<b>A6ZI44</b>	418	0	7	22	32,54	Fructose-bisphosphate aldolase GN=Aldoa PE=2 SV=1
<b>P97351</b>	264	8	8	22	35,23	40S ribosomal protein S3a GN=Rps3a PE=1 SV=3
<b>Q8VEK3</b>	800	0	8	21	12	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein U GN=Hnrnpu PE=1 SV=1
<b>P47962</b>	297	6	6	21	23,23	60S ribosomal protein L5 GN=Rpl5 PE=1 SV=3
<b>Q8C253</b>	264	0	5	20	24,62	Galectin GN=Lgals3 PE=2 SV=1
<b>P20029</b>	655	0	9	20	18,47	78 kDa glucose-regulated protein GN=Hspa5 PE=1 SV=3
<b>Q8CBB6</b>	134	0	6	20	18,66	Histone H2B GN=Hist1h2bq PE=2 SV=1;
<b>P07356</b>	339	8	8	20	33,04	Annexin A2 GN=Anxa2 PE=1 SV=2
<b>P11499</b>	724	7	11	20	19,06	Heat shock protein HSP 90-beta GN=Hsp90ab1 PE=1 SV=3
<b>Contaminant KERATIN12</b>	431	1	7	20	14,15	
<b>Q99JY9</b>	418	8	8	19	30,86	Actin-related protein 3 GN=Actr3 PE=1 SV=3
<b>Q9D0E1</b>	729	1	10	19	14,95	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein M GN=Hnrnpm PE=1 SV=3
<b>Q07076</b>	463	7	7	19	16,2	Annexin A7 GN=Anxa7 PE=2 SV=2
<b>Q5EBP8</b>	373	0	9	19	15,28	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 GN=Hnrnpa1 PE=2 SV=1
<b>P12970</b>	266	8	8	19	28,2	60S ribosomal protein L7a GN=Rpl7a PE=1 SV=2
<b>Contaminant KERATIN04</b>	458	2	7	19	13,76	
<b>Q7TPV4</b>	1344	8	8	18	6,32	Myb-binding protein 1A GN=Mybbp1a PE=1 SV=2
<b>P62806</b>	103	7	7	18	42,72	Histone H4 GN=Hist1h4a PE=1 SV=2
<b>P29341</b>	636	8	8	18	11,01	Polyadenylate-binding protein 1 GN=Pabpc1 PE=1 SV=2
<b>P62301</b>	151	5	5	18	30,46	40S ribosomal protein S13 GN=Rps13 PE=1 SV=2
<b>P62889</b>	115	5	5	18	51,3	60S ribosomal protein L30 GN=Rpl30 PE=2 SV=2
<b>P62245</b>	130	7	7	18	35,38	40S ribosomal protein S15a GN=Rps15a PE=1 SV=2
<b>Q8R081</b>	586	1	7	17	12,29	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein L GN=Hnrnpl PE=1 SV=2

Material complementario



<b>Q03265</b>	553	8	8	17	13,56	ATP synthase subunit alpha, mitochondrial GN=Atp5a1 PE=1 SV=1
<b>Q6ZWN5</b>	194	7	7	17	19,07	40S ribosomal protein S9 GN=Rps9 PE=1 SV=3
<b>P48036</b>	319	6	6	17	19,44	Annexin A5 GN=Anxa5 PE=1 SV=1
<b>P10107</b>	346	8	8	17	35,26	Annexin A1 GN=Anxa1 PE=1 SV=2
<b>P14131</b>	146	5	5	16	36,99	40S ribosomal protein S16 GN=Rps16 PE=2 SV=4
<b>Q9D8E6</b>	419	7	7	16	24,34	60S ribosomal protein L4 GN=Rpl4 PE=1 SV=3
<b>P05202</b>	430	9	9	16	22,33	Aspartate aminotransferase, mitochondrial GN=Got2 PE=1 SV=1
<b>P60843</b>	406	7	8	15	23,15	Eukaryotic initiation factor 4A-I GN=Eif4a1 PE=1 SV=1
<b>P18242</b>	410	6	6	15	21,46	Cathepsin D GN=Ctsd PE=1 SV=1
<b>Q9CQW9</b>	137	6	6	15	27,01	Interferon-induced transmembrane protein 3 GN=Ifitm3 PE=1 SV=1
<b>P62270</b>	152	2	7	15	30,26	40S ribosomal protein S18 GN=Rps18 PE=1 SV=3;
<b>Q3TTY5</b>	707	0	9	15	8,91	Keratin, type II cytoskeletal 2 epidermal GN=Krt2 PE=1 SV=1
<b>P16460</b>	412	7	7	15	22,57	Argininosuccinate synthase GN=Ass1 PE=1 SV=1
<b>P05213</b>	451	7	7	14	23,5	Tubulin alpha-1B chain GN=Tuba1b PE=1 SV=2
<b>P26041</b>	577	7	7	14	10,92	Moesin GN=Msn PE=1 SV=3
<b>Q5XJF6</b>	217	4	4	14	22,58	Ribosomal protein GN=Rpl10a PE=2 SV=1
<b>P26443</b>	558	10	10	14	22,94	Glutamate dehydrogenase 1, mitochondrial GN=Glud1 PE=1 SV=1
<b>Q9CVB6</b>	300	6	6	14	18,33	Actin-related protein 2/3 complex subunit 2 GN=Arpc2 PE=1 SV=3
<b>P08730</b>	437	1	6	14	8,7	Keratin, type I cytoskeletal 13 GN=Krt13 PE=1 SV=2
<b>P17182</b>	434	5	5	14	16,59	Alpha-enolase GN=Eno1 PE=1 SV=3
<b>P99024</b>	444	7	7	14	24,1	Tubulin beta-5 chain GN=Tubb5 PE=1 SV=1
<b>P62960</b>	322	6	6	14	31,06	Nuclease-sensitive element-binding protein 1 GN=Ybx1 PE=1 SV=3
<b>F6XI62</b>	279	0	6	14	19,35	60S ribosomal protein L7 (Fragment) GN=Rpl7 PE=1 SV=1
<b>P80318</b>	545	1	8	13	17,43	T-complex protein 1 subunit gamma GN=Cct3 PE=1 SV=1
<b>Q3U741</b>	652	0	5	13	8,59	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 17, isoform CRA_a GN=Ddx17 PE=2 SV=1
<b>P47963</b>	211	5	5	13	18,96	60S ribosomal protein L13 GN=Rpl13 PE=2 SV=3

Modulación de la maduración del fagosoma por una quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*

• • •

<b>Q9CZX8</b>	145	6	6	13	28,97	40S ribosomal protein S19 GN=Rps19 PE=1 SV=3
<b>Q62167</b>	662	6	7	13	12,54	ATP-dependent RNA helicase DDX3X GN=Ddx3x PE=1 SV=3
<b>P24369</b>	216	6	6	13	27,31	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B GN=Ppib PE=1 SV=2
<b>P62281</b>	158	5	5	13	29,75	40S ribosomal protein S11 GN=Rps11 PE=1 SV=3
<b>P54987</b>	488	8	8	13	14,75	Cis-aconitate decarboxylase GN=Irg1 PE=1 SV=2
<b>Q9Z204</b>	313	6	6	13	15,65	Heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2 GN=Hnrnpc PE=1 SV=1
<b>P61161</b>	394	6	6	12	15,74	Actin-related protein 2 GN=Actr2 PE=1 SV=1
<b>P25444</b>	293	6	6	12	24,91	40S ribosomal protein S2 GN=Rps2 PE=2 SV=3
<b>P63276</b>	135	4	4	12	32,59	40S ribosomal protein S17 GN=Rps17 PE=1 SV=2
<b>E9QNN1</b>	1384	0	6	11	5,13	ATP-dependent RNA helicase A GN=Dhx9 PE=1 SV=1
<b>Q8BP67</b>	157	4	4	11	19,75	60S ribosomal protein L24 GN=Rpl24 PE=1 SV=2
<b>P60867</b>	119	3	3	11	22,69	40S ribosomal protein S20 GN=Rps20 PE=1 SV=1
<b>P61358</b>	136	4	4	11	30,15	60S ribosomal protein L27 GN=Rpl27 PE=1 SV=2
<b>E9PYL9</b>	178	0	4	11	20,79	Uncharacterized protein GN=Gm10036 PE=3 SV=1;
<b>P47911</b>	296	0	5	11	17,91	60S ribosomal protein L6 GN=Rpl6 PE=1 SV=3;
<b>Q99J16</b>	184	5	5	11	33,15	Ras-related protein Rap-1b GN=Rap1b PE=2 SV=2
<b>P17742</b>	164	4	4	11	29,88	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A GN=Ppia PE=1 SV=2
<b>P62082</b>	194	1	5	10	22,68	40S ribosomal protein S7 GN=Rps7 PE=2 SV=1;
<b>P62751</b>	156	4	4	10	23,72	60S ribosomal protein L23a GN=Rpl23a PE=1 SV=1
<b>P62242</b>	208	4	4	10	25,96	40S ribosomal protein S8 GN=Rps8 PE=1 SV=2
<b>Q3U0V1</b>	748	6	6	10	10,83	Far upstream element-binding protein 2 GN=Khsrp PE=1 SV=2
<b>P59999</b>	168	4	4	10	27,38	Actin-related protein 2/3 complex subunit 4 GN=Arpc4 PE=1 SV=3
<b>P62918</b>	257	3	3	10	25,68	60S ribosomal protein L8 GN=Rpl8 PE=1 SV=2
<b>P35980</b>	188	3	3	10	19,68	60S ribosomal protein L18 GN=Rpl18 PE=2 SV=3
<b>P61979</b>	463	0	6	10	16,2	Heterogeneous nuclear ribonucleopro-

Material complementario

Modulación de la maduración del fagosoma por una quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*



						tein K GN=Hnrpk PE=1 SV=1
<b>Q99LB4</b>	349	5	5	10	24,9	Capping protein (Actin filament), gel-solin-like GN=Capg PE=1 SV=1
<b>Q91VC3</b>	411	1	6	10	12,9	Eukaryotic initiation factor 4A-III GN=Eif4a3 PE=2 SV=3
<b>P51410</b>	192	4	4	10	24,4	60S ribosomal protein L9 GN=Rpl9 PE=1 SV=2
<b>P48678</b>	665	6	6	10	9,6	Prelamin-A/C GN=Lmna PE=1 SV=2
<b>P63325</b>	165	5	5	9	14,5	40S ribosomal protein S10 GN=Rps10 PE=1 SV=1
<b>P70372</b>	326	4	4	9	15,9	ELAV-like protein 1 GN=Elavl1 PE=1 SV=2
<b>P62849</b>	133	3	3	9	29,3	40S ribosomal protein S24 GN=Rps24 PE=2 SV=1
<b>P08249</b>	338	5	5	9	22,7	Malate dehydrogenase, mitochondrial GN=Mdh2 PE=1 SV=3
<b>Q60930</b>	295	1	6	9	22	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 GN=Vdac2 PE=1 SV=2
<b>P62852</b>	125	4	4	9	16	40S ribosomal protein S25 GN=Rps25 PE=1 SV=1
<b>Q99020</b>	285	1	5	9	14,7	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B GN=Hnrnpab PE=1 SV=1
<b>Q99KI0</b>	780	4	4	8	6,7	Aconitate hydratase, mitochondrial GN=Aco2 PE=1 SV=1
<b>P27661</b>	143	0	2	8	19,5	Histone H2AX GN=H2afx PE=1 SV=2
<b>O55135</b>	245	5	5	8	32,6	Eukaryotic translation initiation factor 6 GN=Eif6 PE=1 SV=2
<b>P07901</b>	733	1	4	8	5,1	Heat shock protein HSP 90-alpha GN=Hsp90aa1 PE=1 SV=4
<b>P06745</b>	558	1	4	8	6,2	Glucose-6-phosphate isomerase GN=Gpi PE=1 SV=4;
<b>Q6ZWW3</b>	214	0	4	8	23,8	60S ribosomal protein L10 GN=Rpl10 PE=1 SV=3;
<b>P14824</b>	673	1	6	8	9	Annexin A6 GN=Anxa6 PE=1 SV=3
<b>Q91V55</b>	204	0	3	8	14,2	40S ribosomal protein S5 GN=Rps5 PE=2 SV=1;
<b>Q9JIK5</b>	851	4	4	8	5,2	Nucleolar RNA helicase 2 GN=Ddx21 PE=1 SV=3
<b>P62962</b>	140	0	3	8	30	Profilin-1 GN=Pfn1 PE=1 SV=2
<b>Q8C0C7</b>	508	0	4	8	7,6	Phenylalanine--tRNA ligase alpha subunit GN=Farsa PE=2 SV=1
<b>Q60932</b>	296	0	4	8	21,6	Voltage-dependent anion-selective channel protein 1 GN=Vdac1 PE=1 SV=3
<b>P0CG50</b>	734	0	3	8	4,6	Polyubiquitin-C GN=Ubc PE=1 SV=2
<b>Q64012</b>	312	0	4	8	13,4	RNA-binding protein Raly GN=Raly PE=1 SV=3

Material complementario

Modulación de la maduración del fagosoma por una quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*



<b>Q9WUA2</b>	589	3	3	8	7,6	Phenylalanine--tRNA ligase beta subunit GN=Farsb PE=2 SV=2
<b>A1L314</b>	713	2	6	8	6,4	Macrophage-expressed gene 1 protein GN=Mpeg1 PE=2 SV=1
<b>Q6ZWU9</b>	84	2	2	8	28,5	40S ribosomal protein S27 GN=Rps27 PE=1 SV=3
<b>P09411</b>	417	4	4	8	13,6	Phosphoglycerate kinase 1 GN=Pgk1 PE=1 SV=4
<b>Q9CR57</b>	217	3	3	8	10,1	60S ribosomal protein L14 GN=Rpl14 PE=1 SV=3
<b>Q9D0T1</b>	128	3	3	8	31,2	NHP2-like protein 1 GN=Nhp2l1 PE=1 SV=4
<b>O70310</b>	496	3	3	7	10,2	Glycylpeptide N-tetradecanoyltransferase 1 GN=Nmt1 PE=1 SV=1
<b>P62264</b>	151	3	3	7	22,5	40S ribosomal protein S14 GN=Rps14 PE=2 SV=3
<b>P56480</b>	529	4	4	7	10	ATP synthase subunit beta, mitochondrial GN=Atp5b PE=1 SV=2
<b>P70460</b>	375	3	3	7	10,1	Vasodilator-stimulated phosphoprotein GN=Vasp PE=1 SV=4
<b>Q78PY7</b>	910	4	4	7	5	Staphylococcal nuclease domain-containing protein 1 GN=Snd1 PE=1 SV=1
<b>Contaminant KERATIN16</b>	534	1	3	7	5,4	
<b>Q9CQM8</b>	160	0	2	7	16,2	60S ribosomal protein L21 GN=Rpl21 PE=2 SV=1;
<b>Q9CY58</b>	407	3	3	7	11,3	Plasminogen activator inhibitor 1 RNA-binding protein GN=Serbp1 PE=1 SV=2
<b>Q8K363</b>	660	4	4	7	6,7	ATP-dependent RNA helicase DDX18 GN=Ddx18 PE=2 SV=1
<b>P27773</b>	505	5	5	7	11,8	Protein disulfide-isomerase A3 GN=Pdia3 PE=1 SV=2
<b>P62754</b>	249	3	3	7	15,6	40S ribosomal protein S6 GN=Rps6 PE=1 SV=1
<b>Q6ZWZ7</b>	184	0	3	7	20,1	60S ribosomal protein L17 GN=Rpl17 PE=2 SV=1;
<b>P54071</b>	452	6	6	7	11	Isocitrate dehydrogenase [NADP], mitochondrial GN=Idh2 PE=1 SV=3
<b>P09405</b>	707	5	5	7	7	Nucleolin GN=Ncl PE=1 SV=2
<b>Q9R002</b>	445	5	5	7	12,1	Interferon-activable protein 202 GN=Ifi202 PE=1 SV=3
<b>P62900</b>	125	2	2	6	19,2	60S ribosomal protein L31 GN=Rpl31 PE=1 SV=1
<b>P63101</b>	245	0	3	6	12,6	14-3-3 protein zeta/delta GN=Ywhaz PE=1 SV=1
<b>Q6ZWZ4</b>	105	3	3	6	20	60S ribosomal protein L36 GN=Rpl36 PE=2 SV=1

Material complementario

Modulación de la maduración del fagosoma por una quinasa de *Mycobacterium tuberculosis*



<b>P62911</b>	135	0	2	6	17	60S ribosomal protein L32 GN=Rpl32 PE=1 SV=2;
<b>G5E8N5</b>	361	0	3	6	9,1	L-lactate dehydrogenase GN=Ldha PE=3 SV=1;
<b>E9Q5A0</b>	423	0	2	6	4,4	60S ribosomal protein L13a GN=Rpl13a PE=3 SV=1;
<b>P09671</b>	222	2	2	6	12,6	Superoxide dismutase [Mn], mitochondrial GN=Sod2 PE=1 SV=3
<b>P63323</b>	132	1	3	6	12,8	40S ribosomal protein S12 GN=Rps12 PE=1 SV=2;
<b>P62259</b>	255	2	3	6	12,1	14-3-3 protein epsilon GN=Ywhae PE=1 SV=1;
<b>Q9JL16</b>	300	2	2	6	6	Interferon-stimulated gene 20 kDa protein GN=Isg20 PE=1 SV=1
<b>Q64282</b>	463	3	3	6	7,5	Interferon-induced protein with tetra-tricopeptide repeats 1 GN=Ifit1 PE=1 SV=2
<b>Q8C266</b>	234	0	4	6	23,9	Ras-related protein Rab-5C GN=Rab5c PE=2 SV=1
<b>P67984</b>	128	3	3	6	39	60S ribosomal protein L22 GN=Rpl22 PE=1 SV=2
<b>Q6ZWX6</b>	315	3	3	6	10,1	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 1 GN=Eif2s1 PE=1 SV=3
<b>P10605</b>	339	2	2	6	7,9	Cathepsin B GN=Ctsb PE=1 SV=2
<b>P46638</b>	218	0	3	6	16	Ras-related protein Rab-11B GN=Rab11b PE=1 SV=3;
<b>P97807</b>	507	3	3	6	8,6	Fumarate hydratase, mitochondrial GN=Fh PE=1 SV=3
<b>P51881</b>	298	3	3	6	10,7	ADP/ATP translocase 2 GN=Slc25a5 PE=1 SV=3
<b>Q8VIJ6</b>	699	3	3	6	5,7	Splicing factor, proline- and glutamine-rich GN=Sfpq PE=1 SV=1
<b>Q9WVK4</b>	534	4	4	6	8,9	EH domain-containing protein 1 GN=Ehd1 PE=1 SV=1
<b>P08905</b>	148	3	3	5	27	Lysozyme C-2 GN=Lyz2 PE=1 SV=2
<b>Q99K48</b>	473	4	4	5	11,6	Non-POU domain-containing octamer-binding protein GN=Nono PE=1 SV=3
<b>Q3THW5</b>	128	0	2	5	14,8	Histone H2A.V GN=H2afv PE=1 SV=3
<b>Q9CQR2</b>	83	2	2	5	27,7	40S ribosomal protein S21 GN=Rps21 PE=2 SV=1
<b>Q60668</b>	355	0	2	5	6,2	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D0 GN=Hnrnpd PE=1 SV=2;
<b>Q8C2Q3</b>	669	3	3	5	3,1	RNA-binding protein 14 GN=Rbm14 PE=1 SV=1
<b>E9Q0F0</b>	1068	1	2	5	1,6	Protein Krt78 GN=Krt78 PE=4 SV=1
<b>Q922I7</b>	555	0	3	5	11,3	MCG13402, isoform CRA_c GN=Ptbp1 PE=2 SV=1
<b>P14115</b>	148	2	2	5	14,8	60S ribosomal protein L27a



						GN=Rpl27a PE=2 SV=5
<b>O70404</b>	101	2	2	5	23,7	Vesicle-associated membrane protein 8 GN=Vamp8 PE=1 SV=1
<b>Q9D6Z1</b>	580	3	3	5	5,1	Nucleolar protein 56 GN=Nop56 PE=1 SV=2
<b>Q9DCD0</b>	483	4	4	5	9,1	6-phosphogluconate dehydrogenase, decarboxylating GN=Pgd PE=1 SV=3
<b>Q9WV32</b>	372	4	4	5	19,3	Actin-related protein 2/3 complex subunit 1B GN=Arpc1b PE=2 SV=4
<b>Q9D8N0</b>	437	2	2	4	6,1	Elongation factor 1-gamma GN=Eef1g PE=1 SV=3
<b>Q9WV02</b>	391	0	2	4	5,3	RNA-binding motif protein, X chromosome GN=Rbmx PE=1 SV=1
<b>Q9CZV7</b>	504	2	2	4	4,7	Serine hydroxymethyltransferase GN=Shmt2 PE=2 SV=1
<b>P47791</b>	500	2	2	4	4,6	Glutathione reductase, mitochondrial GN=Gsr PE=1 SV=3
<b>Q8VHM5</b>	632	0	3	4	4,4	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein R GN=HnrnpR PE=2 SV=1;
<b>P62717</b>	176	2	2	4	15,9	60S ribosomal protein L18a GN=Rpl18a PE=1 SV=1
<b>P11983</b>	556	4	4	4	6,8	T-complex protein 1 subunit alpha GN=Tcp1 PE=1 SV=3
<b>P40124</b>	474	3	3	4	8,2	Adenylyl cyclase-associated protein 1 GN=Cap1 PE=1 SV=4
<b>Q9JJI8</b>	70	2	2	4	35,7	60S ribosomal protein L38 GN=Rpl38 PE=2 SV=3
<b>O89053</b>	461	0	2	4	4,5	Coronin-1A GN=Coro1a PE=1 SV=5;
<b>G3UWG1</b>	105	0	2	4	20,9	MCG115977 GN=Gm10108 PE=3 SV=1
<b>F8WGL3</b>	227	0	3	4	24,6	Cofilin-1 GN=Cfl1 PE=1 SV=1;
<b>P60335</b>	356	1	2	4	7	Poly(rC)-binding protein 1 GN=Pcbp1 PE=1 SV=1
<b>Q61990</b>	362	2	3	4	10,5	Poly(rC)-binding protein 2 GN=Pcbp2 PE=1 SV=1
<b>P68510</b>	246	1	2	4	6,9	14-3-3 protein eta GN=Ywhah PE=1 SV=2
<b>Q8C1B7</b>	431	2	2	4	4,6	Septin-11 GN=Sept11 PE=1 SV=4
<b>Q8C2Q7</b>	472	0	2	4	7,6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H GN=HnrnpH1 PE=2 SV=1;
<b>Q9Z2X1</b>	415	0	2	4	6	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F GN=HnrnpF PE=1 SV=3;
<b>P17751</b>	299	1	3	3	9,7	Triosephosphate isomerase GN=Tpi1 PE=1 SV=4
<b>Q9Z1N5</b>	428	2	2	3	5,6	Spliceosome RNA helicase Ddx39b GN=Ddx39b PE=1 SV=1
<b>P62274</b>	56	2	2	3	26,7	40S ribosomal protein S29 GN=Rps29 PE=2 SV=2
<b>Q9CYG7</b>	309	3	3	3	12,3	Mitochondrial import receptor subunit



							TOM34 GN=Tomm34 PE=2 SV=1
<b>P62855</b>	115	2	2	3	20,8	40S ribosomal protein S26	GN=Rps26 PE=2 SV=3
<b>Q9CQD1</b>	215	1	2	3	10,7	Ras-related protein Rab-5A	GN=Rab5a PE=1 SV=1
<b>P61982</b>	247	0	2	3	6,8	14-3-3 protein gamma	GN=Ywhag PE=1 SV=2
<b>F6VW30</b>	303	0	2	3	7,2	14-3-3 protein theta (Fragment)	GN=Ywhaq PE=3 SV=1
<b>Q99L45</b>	331	2	2	3	9	Eukaryotic translation initiation factor 2 subunit 2	GN=Eif2s2 PE=1 SV=1
<b>P53569</b>	1052	2	2	3	2,1	CCAAT/enhancer-binding protein zeta	GN=Cebpz PE=1 SV=2
<b>Q9CWW6</b>	131	2	2	3	10,6	Peptidyl-prolyl <i>cis-trans</i> isomerase NIMA-interacting 4	GN=Pin4 PE=2 SV=1
<b>Q8BFR5</b>	452	0	2	3	5,7	Elongation factor Tu, mitochondrial	GN=Tufm PE=1 SV=1
<b>P29351</b>	595	2	2	3	3,7	Tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 6	GN=Ptpn6 PE=1 SV=2
<b>P62814</b>	511	2	2	3	6,8	V-type proton ATPase subunit B, brain isoform	GN=Atp6v1b2 PE=1 SV=1
<b>Q99K85</b>	370	2	2	3	6,4	Phosphoserine aminotransferase	GN=Psat1 PE=1 SV=1
<b>Q9Z0M5</b>	397	2	2	2	5	Lysosomal acid lipase/cholesteryl ester hydrolase	GN=Lipa PE=2 SV=2
<b>O08749</b>	509	2	2	2	6,2	Dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	GN=Dld PE=1 SV=2
<b>E9Q557</b>	2883	2	2	2	0,6	Desmoplakin	GN=Dsp PE=1 SV=1
<b>Q60865</b>	707	2	2	2	3,1	Caprin-1	GN=Caprin1 PE=1 SV=2
<b>P24270</b>	527	2	2	2	5,1	Catalase	GN=Cat PE=1 SV=4
<b>Q99KB8</b>	309	0	2	2	7,7	Hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial	GN=Hagh PE=1 SV=2
<b>D3Z2H9</b>	248	0	2	2	10,4	Uncharacterized protein	GN=Tpm3-rs7 PE=3 SV=1;
<b>P08113</b>	802	1	2	2	2,8	Endoplasmic reticulum protein	GN=Hsp90b1 PE=1 SV=2
<b>P80315</b>	539	0	2	2	4,6	T-complex protein 1 subunit delta	GN=Cct4 PE=1 SV=3
<b>Q91YQ5</b>	608	2	2	2	5,2	Dolichyl-diphosphooligosaccharide--protein glycosyltransferase subunit 1	GN=Rpn1 PE=1 SV=1
<b>F2Z456</b>	313	0	2	2	6	NADH-cytochrome b5 reductase	GN=Cyb5r3 PE=1 SV=1