



**UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES**

**Facultad de Farmacia y Bioquímica**

**Departamento de Microbiología, Inmunología y Biotecnología**

**Tesis Doctoral**

**Rol de las proteínas de reconocimiento de  
peptidoglicanos (PGRPs) en el sistema inmune  
innato**

**Lic. Marcos Todone**

**Director: Prof. Dr. Emilio Malchiodi  
Director Adjunto: Dr. Mauricio De Marzi**

**2015**

## **Agradecimientos.**

Muchas gracias a mi familia, amigos y Gaby.

Muchas gracias a Dr. Emilio Malchiodi, Dr. Mauricio de Marzi, Dra. Marisa Fernández, Dr. Pablo Nicolás Romasanta, Bioq. María Julieta Fernández Lynch, Bioq. Sofía Noli Truant, Farm. Belén Sarratea, Bioq. Belén Antonoglou, Lic. Santiago Chiappini, Bioq. Andrea Bauer, Dra. María Bernarda Ganem, Dra. Marina Matos

A los mismos de siempre...

## Abreviaturas.

ACS: Anticuerpos.

Abs: Absorbancia.

AF: Adyuvante de Freund.

Ag: Antígeno.

ANOVA: Análisis de la varianza.

A549: Línea celular epitelial pulmonar (Adenocarcinoma Alveolar).

*B. abortus: Brucella abortus.*

BSA: Seroalbúmina bovina, siglas en inglés de *Bovine Serum Albumin*.

CDs: Células dendríticas.

CI: Cuerpos de Inclusión.

CF: Citometría de Flujo.

CKs: Citoquinas.

CMH-I: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase I.

CMH-II: Complejo Mayor de Histocompatibilidad de Clase II.

Col: Colaboradores.

CPA: Células presentadoras de antígenos.

CpG: Secuencias de DNA no metiladas.

CR: Receptor de Complemento, siglas en inglés de *Complement receptor*.

Cys: Cisteína.

Da: Dalton.

DAPI: Colorante cuyas siglas en inglés representan al *4',6-diamino-2-fenilindol*.

DiD: Colorante cuyas siglas en inglés representan al *1,1'-Diocadecyl-3,3,3',3'-tetramethylindodicarbocyanine perchlorate*.

DMEM: Siglas en inglés de *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*.

DMSO: Dimetil sulfóxido

DO: Densidad Óptica.

DTT: Ditiotreitól.

*E. coli: Escherichia coli.*

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético.

*E. faecalis: Enterococcus faecalis.*

EGTA: Ácido etilenglicol tetracético

ELISA: Enzimoimmunoensayo, siglas en inglés de *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*.

FITC: Isotiocianato de fluoresceína, siglas en inglés de *Fluorescein Isothiocyanate*.

FMLP: Formil -metionil-leucil- fenilalanina, siglas en inglés de *Formyl-Methionyl-Leucyl-Phenylalanine*.

FNB: Flora normal bacteriana.

FPLC: Cromatografía líquida rápida de proteínas, siglas en inglés de *Fast Protein Liquid Chromatography*.

g: Fuerza de gravedad

Hs: Horas.

HEPES: Siglas en inglés de 2-[4-(2-hydroxyethyl) piperazin-1-yl]ethanesulfonic acid.

IFD: Inmunofluorescencia directa.

IL: Interleuquina.

IPTG: Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido.

kDa: Kilodalton.

L: Litros.

LB: Linfocitos B.

LB: Luria Bertani.

LPS: Lipopolisacárido.

LT: Linfocitos T.

LTA: Ácido lipoteicoico.

mm: milímetros

MTT: tetrazolium.

MWM: Marcador de peso molecular, siglas en inglés de *Molecular weight marker*.

NAG: N-acetilglucosamina.

NAM: Ácido N-acetilmuránico.

NF- $\kappa$ B: Factor nuclear  $\kappa$ B, siglas en inglés de *nuclear factor Kb*.

NHS: Ésteres de N-hidrosuccinimida, siglas en inglés de *N-hydroxysuccinimide*.

NK: *Natural Killer*.

nM: nanomolar.

NOD1: Siglas en inglés de *Nucleotide-binding oligomerization domain protein 1*

NP-40: Siglas en inglés de *nonyl phenoxypolyethoxylethanol*.

ON: Durante toda la noche, siglas en inglés de *Over night*.

OPD: Ortofenilendiamina, siglas en inglés de *Ortofenilendiamina*.

OVA: Ovoalbumina

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida, siglas en inglés de *Polyacrylamide Gel Electrophoresis*.

PAMPs: Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, siglas en inglés de *Pathogen Associated Molecular Patterns*.

PBMC: Células mononucleares, siglas en inglés de *Peripheral Blood Mononuclear Cells*.

PBS: Buffer Fosfato Salino, siglas en inglés de *Phosphate Buffered Saline*.

PBS-T: PBS-Tween.

PG: Piruvato-glutamina.

PGNs: Peptidoglicanos.

pgr: picogramos

PGRPs: Proteína de Reconocimiento de Peptidoglicanos, siglas en inglés de *peptidoglycan recognition proteins*.

PGRP-S: PGRP corta, siglas en inglés de *PGRP SHORT*.

PGRP-I: PGRP intermedia, siglas en inglés de *PGRP INTERMEDIATE*.

PGRP-I $\alpha$ C: Dominio C-terminal de PGRP-I $\alpha$ .

PGRP-I $\beta$ N: Dominio N-terminal de PGRP-I $\beta$ .

PGRP-L: PGRP larga, siglas en inglés de *PGRP LONG*.

PI3K: Fosfoinositol 3-quinasa.

PM: Peso molecular.

PMN: Polimorfonucleares.

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo, siglas en inglés de *Phenylmethylsulfonyl Fluoride*.

PRRs: Receptores de reconocimiento de PAMPs.

RI: Respuesta inmune.

RPMI: Siglas en inglés de *Roswell Park Memorial Institute*.

Rs: Radio de Stokes.

RU: Unidades de resonancia, siglas en inglés de *Resonance Units*.

*S. aureus*: *Staphylococcus aureus*.

SDS: Dodecilsulfato de sodio, siglas en inglés de *Sodium Dodecyl Sulfate*.

SFB: Suero fetal bovino.

SHN: Suero Humano Normal.

SI: Sistema inmune.

SN: Sobrenadante.

SPR: Resonancia Plasmática de Superficie, siglas en inglés de *Surface Plasmon Resonance*.

TBS: Buffer Tris Salino, siglas en inglés de *Tris Buffered Saline*.

TCR: Receptor de Célula T, siglas en inglés de *T-Cell Receptor*.

THP-1: Líneas tumorales de monocitos humanos.

TLR: Receptor tipo *Toll*, siglas en inglés de *Toll Like Receptor*.

TNF: factor de necrosis tumoral.

UFC: Unidades formadoras de colonias.

VD3: D3 1,25-dihidroxitamina, siglas en inglés de *vitamin D3*.

7-AAD: 7-Amino-Actinomicina D, siglas en inglés de *7-Aminoactinomycin*

## ÍNDICE

<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
I. Generalidades del Sistema Inmune.....	2
II. Inmunidad Innata.....	5
III. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs).....	9
IV. Peptidoglicanos (PGNs).....	9
V. Proteínas de Reconocimiento de peptidoglicanos (PGRPs).....	11
VI. Función de PGRPs en la inmunidad innata.....	16
<b>Objetivos</b> .....	<b>22</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>24</b>
PGRPs recombinantes.....	25
Preparación de <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ y BL21 (DE3) competentes.....	25
Trasformación de bacterias competentes.....	25
Expresión y purificación de proteínas recombinantes.....	26
Perfil hidrodinámico de las proteínas. Evaluación de la estructura cuaternaria.....	27
Generación de antiseros en ratones y conejos.....	28
ELISA.....	29
Obtención de PGN insoluble.....	29
Unión de PGRPs a Bacterias y PGN.....	30
SDS-PAGE.....	30
Immunoblotting.....	31
Obtención de muestras biológicas.....	31
Identificación de PGRPs en muestras biológicas.....	33
Inmunoprecipitación.....	33
Inmunofluorescencia directa (IFD).....	33
Unión de PGRP a PBMC o monocitos THP-1.....	34
Marcado de las PGRPs con FITC.....	34
Endocitosis de PGRP-FITC.....	34
Citometría de flujo.....	35

BIAcore .....	35
Expresión diferencial de NF- $\kappa$ B .....	36
Ensayos de viabilidad.....	37
Ensayo de fagocitosis.....	37
Ensayo de infección.....	37
Efectos de las PGRPs sobre monocitos/macrófagos.....	38
Determinación de actividad metabólica y daño de membrana.....	38
Análisis de apoptosis temprana .....	39
Ensayo de proliferación celular .....	39
Determinación de citoquinas.....	39
Expresión de marcadores de activación y complemento .....	40
Análisis estadísticos .....	40
<b>Resultados .....</b>	<b>41</b>
Expresión y purificación de PGRPs recombinantes .....	42
Comportamiento hidrodinámico .....	44
Las PGRPs recombinantes son proteínas biológicamente activas.....	46
Identificación de PGRPs en muestras biológicas .....	48
Las PGRPs son reconocidas y endocitadas por monocitos .....	51
Las PGRPs recombinantes no tienen actividad bactericida ni bacteriostática .....	58
Las PGRPs incrementan la actividad fagocítica y la eliminación de bacterias.....	59
Función protectora de las PGRPs .....	62
<b>Discusión .....</b>	<b>69</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>85</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>88</b>
<b>Bibliografía.....</b>	<b>92</b>



# Introducción

## I. Generalidades del Sistema Inmune

Durante toda la vida de un organismo existe una interacción permanente con el medio que lo rodea. Como consecuencia de este intercambio, los organismos han desarrollado diferentes mecanismos de defensa que les permiten sobrellevar las agresiones provenientes del ambiente externo. Estos mecanismos varían en complejidad según la ubicación en la escala biológica en que cada uno se encuentra. En los mamíferos se encuentra el sistema más desarrollado que se denomina sistema inmune (SI).

Cuando un individuo inmunocompetente sufre una infección, el SI trata de erradicar al patógeno mediante diversos mecanismos que en conjunto reciben el nombre de respuesta inmune (RI). La defensa contra los microorganismos ocurre en primer lugar a través de la denominada inmunidad innata y luego por la inmunidad adaptativa [Abbas 2012].

La principal característica del SI es la capacidad de diferenciar lo propio de lo extraño y, excepto en situaciones patológicas, la RI se desencadenará contra microorganismos invasores, productos de estos o incluso alguna sustancia ajena que no tenga carácter infeccioso. En términos generales, se denomina antígeno (Ag) a toda sustancia que es capaz de desencadenar una RI e interactuar con los productos de la misma [Margni 1996].

Previamente a que se desencadene la RI, existen barreras naturales de defensa que tratan de impedir, ya sea física o químicamente, la entrada de los patógenos al organismo. Cuando estas barreras naturales, por ejemplo: la piel, el mucus, las enzimas contenidas en las secreciones (especialmente la lisosima), etc. son vulneradas, entonces actúa el SI innato, que si bien no es altamente específico, es el primer paso para discriminar entre lo propio y lo extraño. Si la RI innata no logra controlar la infección, entonces se montará la RI adquirida.

Ambas RI se caracterizan por presentar sustancias solubles o humorales y celulares que serán compartidos o particulares de cada tipo de RI. Ejemplos de los componentes humorales son los anticuerpos (Acs), el sistema complemento y las citoquinas (CKs). Las células involucradas en la RI derivan de un precursor común o *stem cell* en médula ósea, que puede ser un progenitor mieloide, que origina a los granulocitos (neutrófilos, basófilos y eosinófilos), macrófagos, monocitos y células dendríticas (CDs); o un progenitor linfoide, que da origen a los linfocitos T (LT), linfocitos B (LB) y células *natural killer* (NK). Los órganos en los que se originan y maduran los componentes del SI se llaman órganos linfoides primarios y en el humano son la

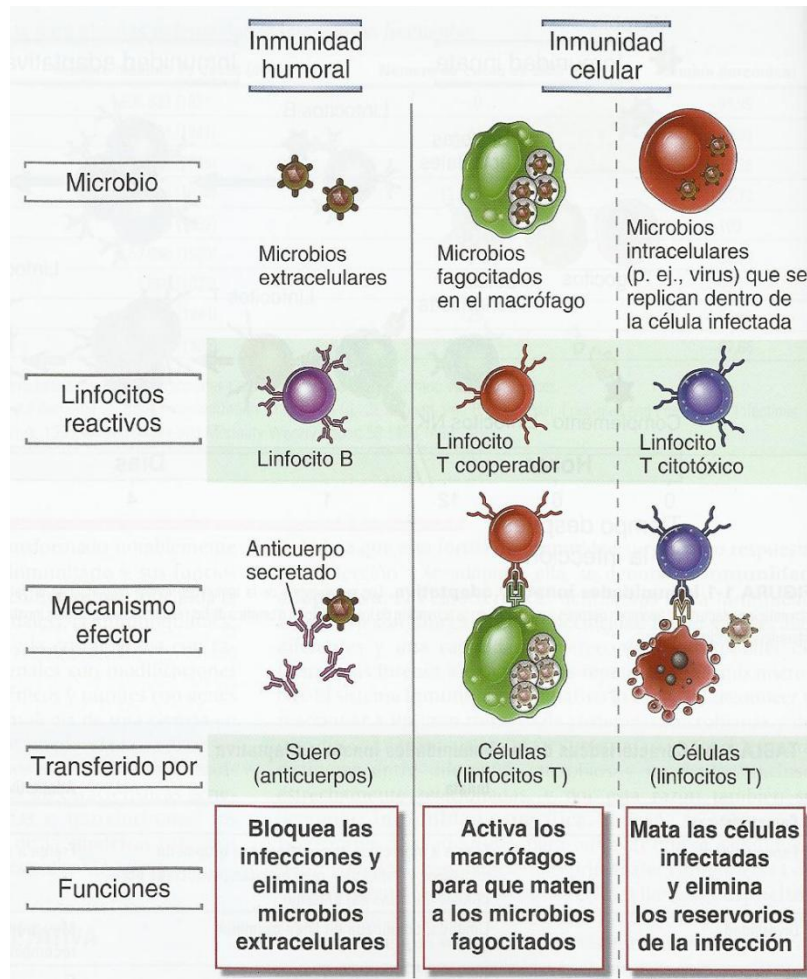
médula ósea y el timo. Los órganos linfoides secundarios son los ganglios linfáticos y el bazo, donde se desencadena la RI o hay procesos relacionados con ésta [Janeway 2009; Abbas 2012].

La RI adquirida se caracteriza por ser altamente específica y generar memoria. Ante la presencia de un patógeno se requieren células capaces de procesarlo y mostrar los péptidos antigénicos al SI, para que este los reconozca como no propios y desencadene mecanismos para eliminarlos. Estas células denominadas células presentadoras de antígenos (CPA), como los macrófagos y las CD, exponen a estos péptidos asociados a las moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (CMH-II). Los péptidos que se asocian a las moléculas CMH-II se generan por la acción de proteasas sobre Ags extracelulares que han sido fagocitados o sobre las proteínas secretadas por patógenos intracelulares, como ciertos parásitos, que son capaces de vivir en el sistema endosomal. Éstos se fusionan con el lisosoma para constituir los fagolisosomas que en una etapa posterior se asociarán con las vesículas exocíticas. Allí también se encuentran las moléculas del CMH-II protegidas por la cadena invariante. Al encontrarse con los péptidos antigénicos, esta cadena es removida, dándose la asociación entre el CMH-II y el péptido antigénico para su posterior presentación en la superficie de la CPA. Posteriormente, los LT CD4<sup>+</sup> reconocen a los péptidos antigénicos presentados en el contexto de las moléculas del CMH-II mediante sus TCRs y, al activarse, liberaran mediadores solubles que permitirán el desarrollo de la RI adaptativa (**Fig. 1**).

Por otro lado, todos los tipos celulares a excepción de los espermatozoides y de los glóbulos rojos, son capaces de presentar Ags asociados a moléculas del CMH-I. Que un Ag se presente asociado al CMH-I o II estará íntimamente ligado al tipo de patógeno y al ciclo de vida del mismo. En líneas generales, los patógenos intracelulares como los virus, son capaces de sintetizar sus proteínas intactas en el citoplasma de la célula infectada, las que luego son degradadas en péptidos menores por un sistema catalítico presente en el citoplasma celular llamado proteosoma. Estos péptidos antigénicos se presentarán en la superficie celular asociados a moléculas del CMH-I. Allí los LT CD8<sup>+</sup> reconocerán, a través de su receptor de superficie (TCR), al péptido en el contexto del CMH-I activándose y eliminando a la célula infectada [Janeway 2009; Abbas 2012].

Además, la RI adquirida reconoce patógenos circulantes por medio de los Acs, los que pueden encontrarse como receptores en la superficie de membranas de los LB donde actúan en el reconocimiento de los Ags o como Acs secretados en circulación y otros fluidos.

La interacción entre el Ac de membrana y su Ag específico activa los LB vírgenes e inicia la respuesta inmune humoral. Los LB estimulados secretan los Ac para que interactúen con los Ags específicos desencadenando múltiples mecanismos efectores que requieren la interacción de otros componentes del sistema inmune como las proteínas del complemento, fagocitos y otros, cuya finalidad es la completa eliminación de los mismos (**Fig. 1**).



**Figura 1. Inmunidad adaptativa.** En la inmunidad humoral, los LB secretan anticuerpos que actúan en la eliminación de los microbios extracelulares. En la inmunidad celular, los LT cooperadores activan a los macrófagos para que maten a los microbios fagocitados, o los LT citotóxicos destruyen directamente las células infectadas.

## II. Inmunidad Innata

El sistema inmune innato emplea diferentes estrategias para discriminar Ags propios de aquellos que no los son [Medzhitov 2002; Janeway 2009]. Una de ellas, el denominado reconocimiento de lo propio perdido, *missing self*, está basada en la detección de marcadores de Ags propios normales que, acoplado a señales inhibitorias, bloquean el inicio de la respuesta contra lo propio. La segunda estrategia, el reconocimiento de lo propio inducido, *induced self*, se basa en la detección de marcadores de lo propio anormal, que son inducidos ante una infección o transformación celular. Las bases del tercer mecanismo, el reconocimiento de lo no propio microbiano, *microbial nonself*, subyace en la habilidad del hospedador para reconocer productos conservados del metabolismo microbiano que son únicos a estos como el lipopolisacárido (LPS) en bacterias gran-negativas, el ácido lipoteicoico (LTA) en bacterias gran-positivas, las secuencias de DNA CG no metiladas (CpG), la flagelina y los peptidoglicanos (PGN), denominados genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs) [Medzhitov 2002]. Esta estrategia permite al SI innato discriminar entre lo propio no infeccioso y lo no propio infeccioso [Hoffmann 2003].

Estos mecanismos comienzan a actuar inmediatamente después de la penetración del agente agresor, a diferencia de lo que ocurre con la inmunidad adaptativa, que requiere un cierto tiempo para que se haga efectiva (Fig. 2).

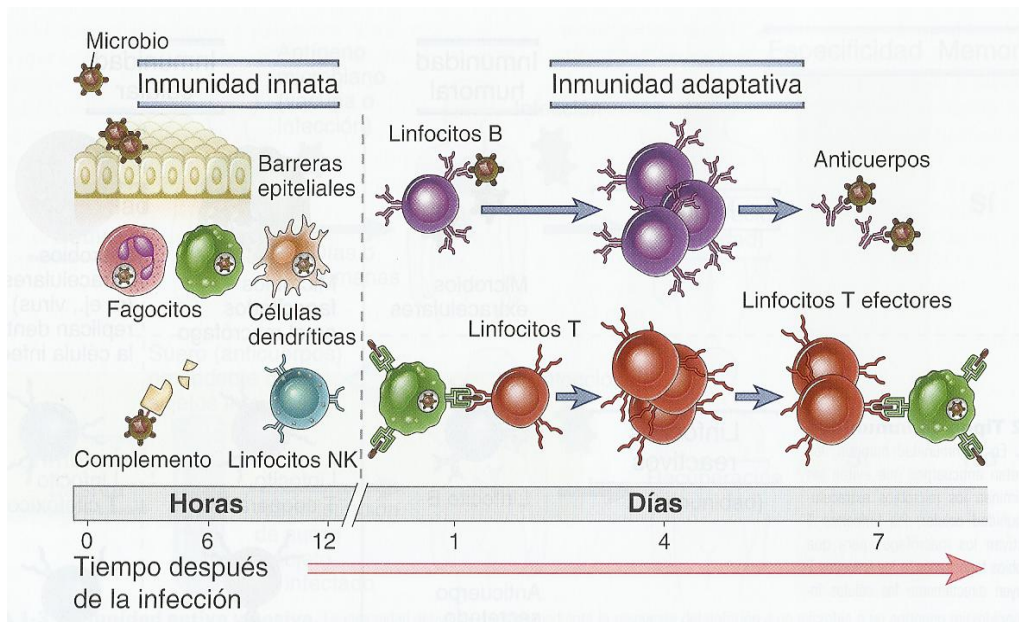
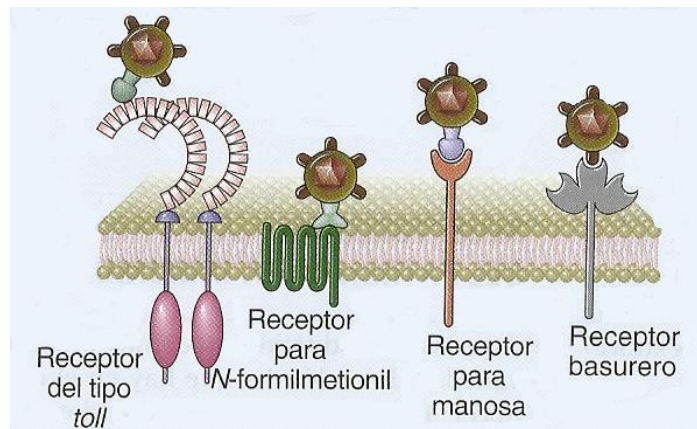


Figura 2.- Evolución cronológica de la RI.

En la RI innata participan componentes celulares como: fagocitos (monocitos y polimorfonucleares), linfocitos NK, células endoteliales, etc. (**Fig. 2**) y componentes humorales provenientes de la activación del sistema de complemento ya sea por la vía alterna o la vía de las lectinas, CKs, metabolitos del ácido araquidónico, etc. [**Abbas 2012**].

Las células fagocíticas, como los neutrófilos polimorfonucleares y macrófagos, son las encargadas de destruir a los microorganismos ingeridos mediante la síntesis de intermediarios radicales del oxígeno, óxido nítrico y enzimas presentes en los fagolisosomas. Los fagocitos reconocen y responden a los productos microbianos a través de diferentes tipos de receptores de reconocimiento de PAMPs (PRRs), tales como los de tipo Toll (TLRs), los de manosa, y los asociados a la proteína G que pueden reconocer péptidos pequeños que contienen N-formilmetionina (**Fig. 3**). Los microorganismos que acceden a los compartimientos internos del huésped, al ser detectados por los PRRs inducen una RI.



**Figura 3. Distintos receptores de reconocimiento de PAMPs presente en las membranas de los fagocitos.**

En primera instancia, la invaginación de la membrana citoplasmática engloba a las partículas, originando un fagosoma. La fusión de los fagosomas con los lisosomas origina los fagolisosomas, donde se concentran los mecanismos microbicidas.

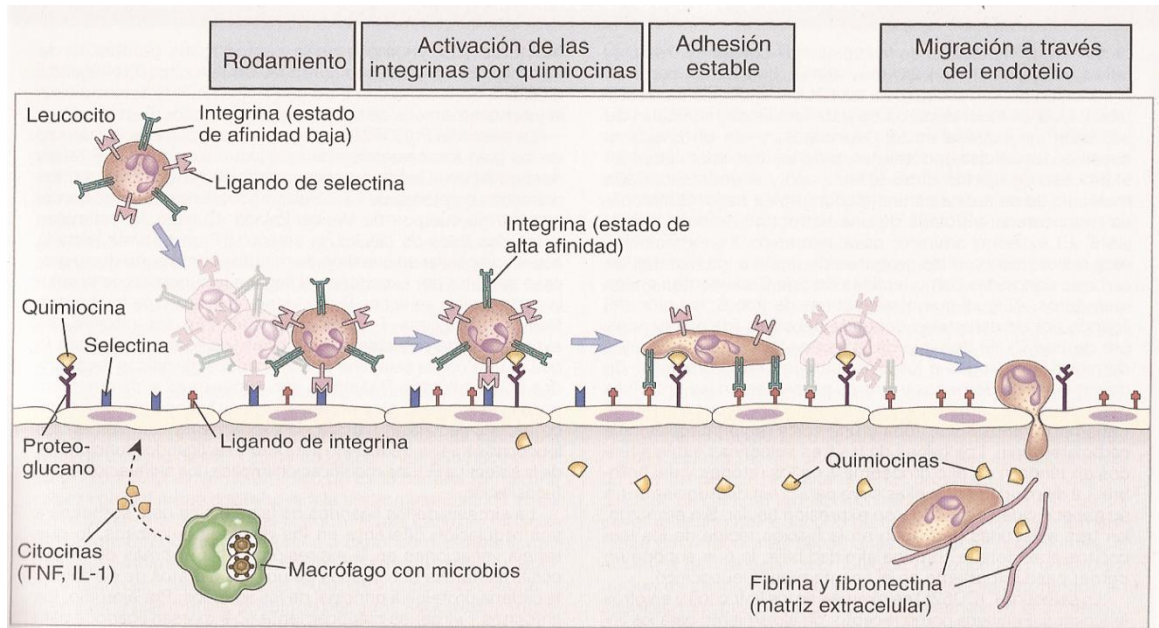
La reacción local inicial de la inmunidad innata es la respuesta inflamatoria caracterizada por calor, dolor, rubor y tumor. El proceso inflamatorio es quizás la respuesta más importante para la defensa del organismo y por lo tanto resulta esencial para la vida. Al mismo tiempo, es el mecanismo que con mayor frecuencia produce daños en las estructuras celulares, pudiendo incluso producir la muerte del individuo. Esta es una respuesta que se pone en marcha frente a

estímulos nocivos de muy variado origen; pudiendo ser desencadenada por bacterias, virus, parásitos, injurias físicas, etc.

La inflamación es una respuesta dinámica y compleja que involucra la participación de múltiples factores celulares, humorales y tisulares. La función de la inflamación es limitar localmente una lesión e inactivar las causas desencadenantes, destruyendo a los microorganismos invasores. También debe eliminar las estructuras orgánicas dañadas e inducir la reparación o regeneración de los tejidos. La composición de leucocitos inflamatorios en los tejidos se modifica con el tiempo y pasa de rica en neutrófilos a rica en células mononucleares, lo que refleja un cambio en la atracción de diferentes leucocitos y la vida corta de los neutrófilos [Pennimpede 2003].

Ante una infección, las células que actúan en primera instancia son los macrófagos locales preexistentes (**Fig. 4**) que reconocen al agente agresor empleando diferentes receptores de complemento (CR), como CR1 y CR2 que unen productos del sistema de complemento (C3b y C3bi) que están pegados al microorganismo. Como consecuencia de esa interacción los macrófagos sintetizan y liberan CKs como la interleuquina 1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral (TNF)  $\alpha$  e IL-8, que tiene un alto poder de quimiotaxis y de activación de neutrófilos circulantes. Esto induce a los mismos a una rápida migración a los sitios extravasculares donde se encuentra el agente patógeno. Esta migración es mediada por moléculas que se expresan en las membranas de los neutrófilos, LFA-1 (antígeno asociado a funciones de linfocitos 1) y las moléculas de adhesión ELAM-1 (moléculas endoteliales de adhesión de leucocitos), ICAM-1 e ICAM-2 (moléculas de adhesión intercelular), que se expresan en el endotelio de los vasos, inducidas por IL-1 y TNF- $\alpha$  de origen macrofágico (**Fig. 4**). Estas CKs inducen, a su vez, alteraciones en el endotelio vascular a través del cual se produce la migración de los neutrófilos y son responsables, en buena medida, de la reacción orgánica general que suele observarse acompañada a un proceso inflamatorio: fiebre, disminución de la presión arterial, taquicardia, etc., siendo además de crucial trascendencia para la cicatrización de heridas.





**Figura 4. Secuencia de eventos en la migración de leucocitos sanguíneos a los sitios de infección.** Se puede observar los fenómenos de *rolling* de los leucocitos, activación de las integrinas, desarrollo de una adhesión estable, migración transepitelial, en primera instancia, y posteriormente a través de la matriz extracelular, hacia el foco de infección orientado por quemoquinas liberadas por los macrófagos.

La activación de los neutrófilos, da inicio al proceso de injuria tisular e inflamación causado por la liberación, por parte de estos, de productos intermediarios del oxígeno (peróxido de hidrógeno, anión superóxido y radicales hidroxilo) y la exocitosis de los contenidos de sus gránulos citoplasmáticos, especialmente la elastasa y defensinas. En este proceso de injuria participan también los metabolitos del ácido araquidónico (tromboxanos, leucotrienos), y los fragmentos C3a y C5a del sistema de complemento (**Fig. 4**).

Todo este proceso hace que los neutrófilos sean las células defensivas que acuden en primer término al lugar de la infección, observándose un acumulo de ellas en las primeras 24 horas. A partir de este momento las células predominantes son los macrófagos que, dada su distribución, tardan más tiempo en llegar con el objetivo de fagocitar los microorganismos invasores.

En el caso particular de las bacterias, su muerte tiene lugar por mecanismos intracelulares que ocurren en células fagocíticas, y por mecanismos extracelulares mediados por el sistema de complemento. La acción fagocítica se ejerce no sólo cuando un microorganismo llega a los tejidos si no también cuando hay una invasión del torrente circulatorio [**Abbas 2012**].

Dentro de los componentes humorales que actúan en la respuesta innata se pueden destacar por un lado la existencia de los llamados anticuerpos naturales, generados por un subgrupo de



LB, que se caracterizan por estar presentes antes de que se desencadene una infección, y que a pesar de tener un número limitado de especificidades, reconocen patrones moleculares comunes en las membranas bacterianas, y por el otro la presencia de varias proteínas plasmáticas del sistema de complemento producidos por la vía alterna, que son activadas por los microorganismos y que favorecen su destrucción y el proceso inflamatorio.

A pesar de todos los mecanismos presentes para destruir a los microorganismos patógenos muchos de ellos logran evadirlos y persistir en el tiempo constituyendo infecciones crónicas como lo hacen ciertos virus, bacterias (intracelulares preferentemente), hongos, etc.

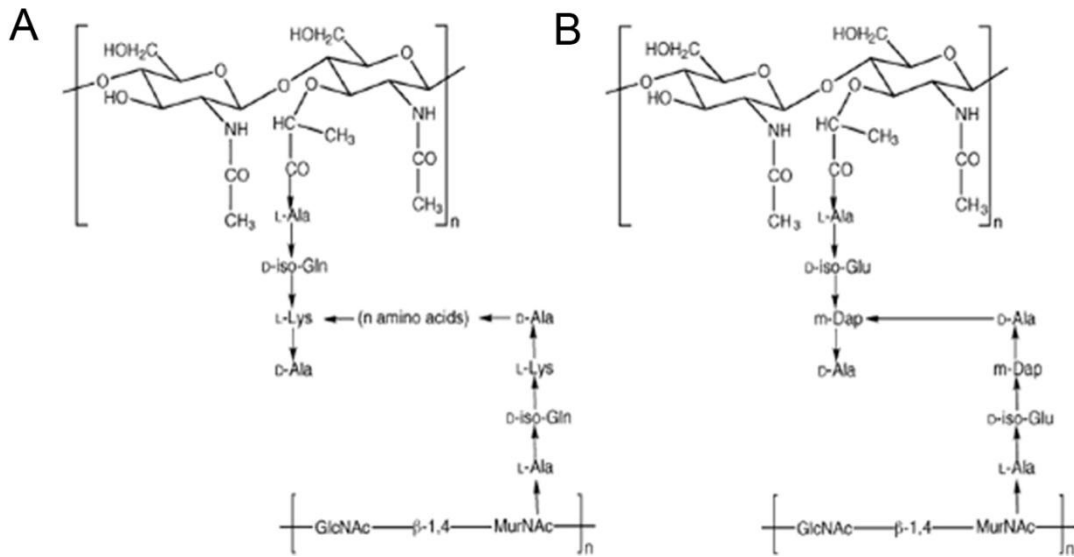
### **III. Patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs)**

Como fuera mencionado anteriormente, el SI innato, a diferencia del adaptativo no reconoce más que una cantidad total concreta de productos microbianos sumamente conservados que no están presentes en las células del hospedador. Los productos microbianos capaces de estimular la inmunidad innata reciben el nombre de PAMPs. Microorganismos de diversas clases (bacterias, virus, hongos) expresan PAMPs distintos, como es el caso del ARN bicatenario que poseen los virus en proceso de multiplicación, así como las secuencias de ADN CpG, la presencia de N-formilmethionina en proteínas, LPS y PGNs son características propias de microorganismos de origen bacteriano.

Este trabajo de tesis trata sobre el rol que desempeñan los receptores de PGN denominados PGRP (*peptidoglycan recognition proteins*).

### **IV. Peptidoglicanos (PGNs)**

Los PGNs constituyen uno de los principales componentes de la pared celular de todas las bacterias, constituyendo una densa red que provee el soporte mecánico necesario para prevenir la ruptura de las células bacterianas debido a las presiones osmóticas fluctuantes del medio. Químicamente son polímeros alternados de N-acetilglucosamina (NAG) y de ácido N-acetilmuránico (NAM), combinados por uniones  $\beta$  (1-4) que se entrecruzan con cortos péptidos conectores o *stems*, compuesto por L- y D- aminoácidos alternados [Schleifer y Kandler 1972; Doyle y Dziarski 2001] (Fig. 5).



**Figura 5.- Estructura de PGNs.** Representación esquemática de PGN *Lys-Type* (A) y de PGN *Dap-Type* (B).

Si bien el esqueleto carbohidratado se encuentra altamente conservado en todas las bacterias (excepto por la variante O-acetilada o N-acetilada), los motivos peptídicos contienen una alta diversidad. De acuerdo al residuo que ocupe la tercera posición en el péptido stem, los PGNs se dividen en dos grandes categorías:

- Tipo lisina (*Lys-Type*)
- Tipo diaminopimelico (*Dap-Type*)

En los PGNs *Lys-Type*, los péptidos *stems*, están unidos por puentes peptídicos compuestos por una a cinco glicinas. Sin embargo, este puente varía tanto en su largo como en su composición aminoacídica en las diferentes bacterias. En los PGNs *Dap-Type*, la lisina en posición 3 del péptido stem, es reemplazada por ácido meso-diaminopimelico, lo que se traduce en la ausencia del puente aminoacídico y en la unión directa del péptido *stem* al esqueleto carbonado.

Debido a su amplia distribución en prácticamente todas las paredes celulares bacterianas, los PGNs, representan un excelente blanco para el reconocimiento del SI innato, [Liu 2001], interactuando con factores humorales como lisozima, complemento, CD14 soluble y proteínas de reconocimiento de PGNs; y celulares, como los macrófagos y linfocitos. La activación de macrófagos a través de CD14 [Gupta 1996; Weidemann 1997] y TLR2 [Yoshimura 1999], induce la producción de CKs [Wang 2000a; 2000b] responsables de las manifestaciones clínicas en infecciones (fiebre, inflamación, etc.).

## V. Proteínas de Reconocimiento de peptidoglicanos (PGRPs)

Las PGRPs son moléculas de reconocimiento de PAMPs, que unen (como CD14 y TLR2), y en ciertos casos hidrolizan (lisozima), PGNs [Kang 1998; Liu 2000; Werner 2000; Liu 2001; Medzhitov 2002; Hultmark 2003; Mellroth 2003; Wang 2003; Dziarski 2004]. Es por ello que estas moléculas son muy importantes para la defensa contra infecciones bacterianas y se encuentran altamente conservadas desde invertebrados (como insectos, equinodermos, moluscos) hasta vertebrados; aunque está ausente en nematodos así como también en plantas [Michel 2001; Choe 2002; Gottar 2002; Ramet 2002; Travassos 2004, Onoe, 2007]. La familia de las PGRPs incluye alrededor de 100 miembros. Todos tienen un dominio homólogo de unión a PGN de aproximadamente 165 aminoácidos que posee hasta un 30% de similitud con la secuencia aminoacídica de la lisozima del bacteriófago T7 (una amidasa dependiente del ión  $Zn^{++}$ ). De acuerdo a su actividad, las PGRPs, se las clasifica en dos grandes grupos:

- PGRPs catalíticas: al igual que la lisozima del bacteriófago T7 algunas PGRPs hidrolizan PGN, rompiendo la unión amida entre NAM y L-Ala [Gelius 2003; Kim 2003; Mellroth 2003; Wang 2003].

- PGRPs no catalíticas: este grupo se corresponde a la gran mayoría de la familia de estas proteínas, estas se unen a PGNs, pero no poseen actividad amidasa debido a que carecen del residuo clave de cisteína (Cys) 160 para la unión al  $Zn^{++}$  [Kang 1998; Kim 2003; Guan 2004a; 2004b].

Si bien las PGRPs están ampliamente distribuidas, han sido estudiadas y caracterizadas principalmente en insectos y mamíferos. Las PGRPs han sido agrupadas en 3 clases [Werner, 2000; Liu 2001; Hultmark 2003; Blanco 2008]:

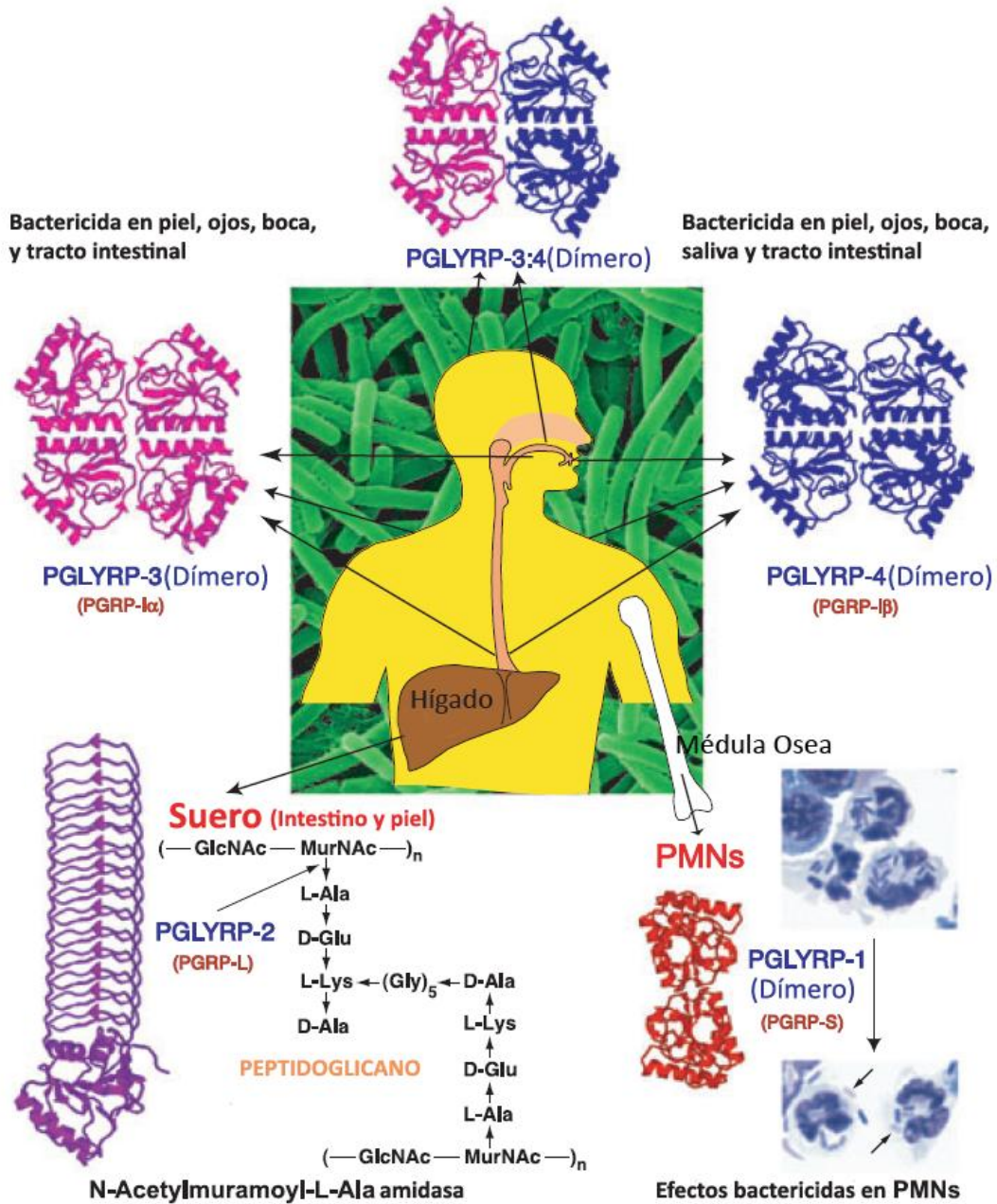
- 1)- PGRP-S (corta), con un peso que varía entre 20 y 25 KD.
- 2)- PGRP-I (intermedia), cuyo peso varía entre 40 y 45 KD.
- 3)- PGRP-L (larga), cuyo peso varía entre 30 y 90 KD.

En los mamíferos se han identificado 4 tipos de PGRPs (PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$ ) las que son productos de la expresión de 3 genes codificantes. Alternativamente fueron renombradas como PGLYRP-1, PGRLYRP-2, PGRLYRP-3 y PGLYRP-4 respectivamente [Kang, 1998; Werner 2000; Liu 2001; Xu 2004; Dziarski 2006a; 2006b; Lu 2006; Dziarski 2011]. En *Drosophila melanogaster* se han identificado 13 genes codificantes para PGRPs, los

cuales se transcriben en al menos 19 proteínas diferentes [Werner 2000], que basado en el tamaño del ARNm transcripto se clasifican en PGRP-S y L [Dziarski 2011], mientras que en algunas especies de mosquito, como el *Anopheles gambiae*, hay 7 genes codificantes de PGRPs, los cuales se transcriben en 9 proteínas [Christophides 2002].

La distribución de las PGRPs en insecto es variada, la PGRP-S corresponde a proteínas extracelulares, mientras que PGRP-L, corresponde no solo a proteínas extracelulares e intracelulares sino que también a proteínas de transmembrana, como es el caso de PGRP-LC, la cual presenta 3 isoformas distintas LCa, LCx, y LCy. Muchas de estas PGRPs se expresan en órganos inmunocompetentes, como el intestino, los cuerpos de grasa y los hepatocitos.

En contraste de lo que sucede en insectos, donde algunas PGRPs son receptores de transmembrana (PGRP-LC y PGRP-LF), todas las PGRPs de mamíferos son proteínas solubles [Guan 2004a; Dziarski 2006a]. Se describió que la expresión de PGRPs en humanos era mayoritariamente en la médula ósea, y se producía en menor medida en el hígado, riñón, intestino delgado, pulmones, leucocitos periféricos, etc.; lo que sería consistente con su función inmunológica [Kang 1998; Liu 2001] (Fig.6).



**Figura 6. Distribución y función de las PGRPs.** Descripción de la distribución y la función de las distintas isoformas de PGRPs expresadas en mamíferos. (Extraído de Dziarski 2006a)

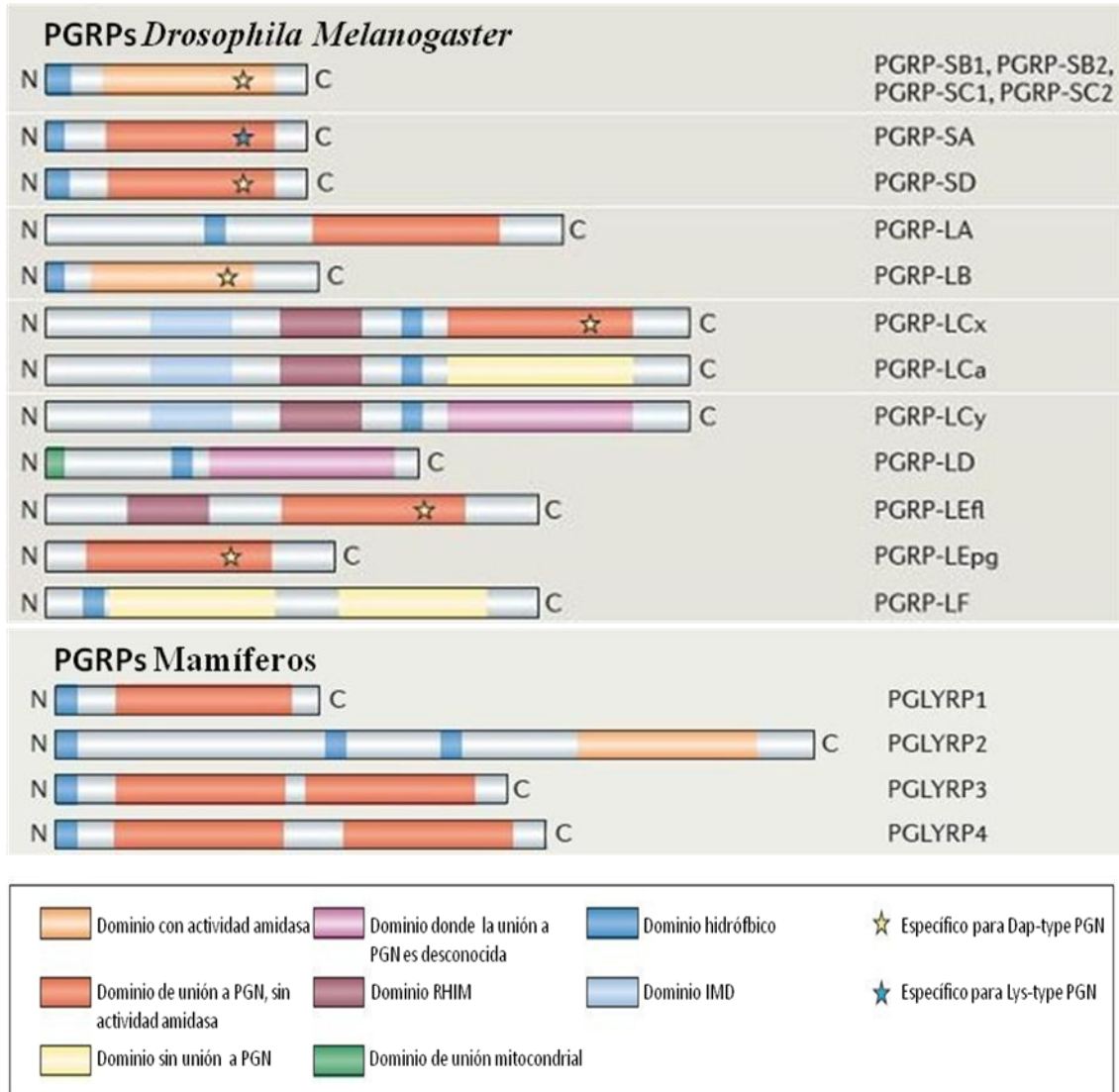
La distribución de PGRPs en mamíferos es muy amplia, y varias de ellas son secretadas. PGRP-S se expresa en los neutrófilos (pero no se la ha detectado en LB, LT, NK, fibroblastos ni monocitos) [Liu 2000; Cho 2005], PGRP-Iα y PGRP-Iβ están selectivamente expresadas en los tejidos expuestos al medio, como la piel, ojos, glándulas salivales, lengua, garganta, esófago, estomago e intestino [Mathur 2004; Lu 2006], los cuales están en contacto con

microorganismos ambientales y se encuentran habitados por microorganismos comensales. Se piensa que debido a los efectos bactericidas de las PGRPs, estas influyen en la microbiota en estos sitios. La PGRP-L es producida constitutivamente por el hígado y es secretada al torrente sanguíneo en respuesta a un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  y TNF- $\alpha$ . Recientemente se describió que PGRP-L es producida por los LT [Lu 2006; Bu 2010; Ma 2010; Duerr 2011]. Muchos de los estudios realizados hasta el momento han sido en su mayoría mediante técnicas de detección de mRNA (Northern-Blot o RT-PCR) lo que no garantiza la presencia de la proteína ya que la regulación de la expresión puede ocurrir a nivel transduccional y, además, se emplearon mayoritariamente tejidos y pocos tipos celulares aislados e identificables [Liu 2000; 2001; Kaneko 2004].

Las cuatro PGRPs de mamífero controlarían la adquisición y el mantenimiento de la microbiota normal del intestino, la cual protege al hospedador de procesos inflamatorios, daños en los tejidos y colitis [Saha 2010; Dziarski 2011]. PGRPs (en particular, PGRP-S y PGRP-I $\beta$ ) se expresan también en las glándulas mamarias, por lo que están presente en la leche materna y podrían influenciar la microbiota presente en la boca y el intestino del recién nacido.

Cada PGRP contiene un sólo dominio de unión a PGN (en la mayoría de los casos, en el extremo C-terminal), a excepción de PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  de mamíferos y PGRP-LF de *Drosophila*, en las que hay 2 dominios de unión a PGN dispuestos en tándem [Guan 2004b]. Se ha planteado que el rol funcional de los dominios de unión en tándem podría deberse a que promueven una mayor actividad, pues permitirían un ataque multivalente o que estos dominios en tándem representan múltiples sitios de unión a PGN específicos para una sola PGRP, permitiendo a un pequeño número de proteínas detectar a un amplio espectro de microorganismos patógenos (Fig.7).

Si bien las PGRPs se caracterizan por su capacidad de unión a PGNs, [Dziarski 2004; Guan 2004a; 2004b; Dziarski 2011], algunas también son capaces de unirse a otras moléculas microbianas con alta afinidad, como el LPS y el LTA; empleando un sitio de interacción diferente al de unión al PGN [Liu 2000; Tydell 2006; Sharma 2013a]. Es para destacar también que moléculas derivadas de hongos pueden ser reconocidas por algunas PGRPs, incluyendo PGRP-S bobina y las PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  humanas [Lu 2006; Tydell 2006] (Fig.7).



**Figura 7. Estructura de las PGRPs.** Descripción de los distintos dominios presentes en las diferentes isoformas expresadas en *Drosophila Melanogaster* y en mamíferos (Extraído de Dziarski 2011).

Se han resuelto diversas estructuras de PGRPs: como la de PGRP-LB de *Drosophila* [Kim 2003], el dominio C-terminal de PGRP-I $\alpha$  humana [Guan 2004a], la porción C-terminal de la PGRP-I $\alpha$  humana unida a muramil tripéptidos derivados de G(+) [Guan 2005a], la porción C-terminal de la PGRP-I $\beta$  humana unida a glicopéptidos sintéticos [Cho 2007] y PGRP-S [Guan 2005b]. Estas estructuras revelaron la existencia de una topología general común, las PGRPs de *Drosophila*, y las PGRPs de mamíferos poseen un dominio carboxilo-terminal sumamente conservado y homólogo al de la lisozima T7 [Cheng 1994; Gobert 2003; Guan 2004b; Reiser 2004; Guan 2007]. El frente de la molécula contiene el sitio de unión al PGN, mientras que la

parte posterior de la misma contiene un segmento específico de las PGRPs (ausente en la lisozima), esta región es altamente hidrofóbica, y podría representar un punto de unión a otras moléculas [Kim 2003].

La estructura general de las PGRPs se muestra en las **Figuras 8A y 8B**. Si bien difieren por su tamaño y actividad, todas las PGRPs presentan un alto grado de similitud estructural. Todas contienen una región central hoja  $\beta$  plegada, compuestas por cinco cadenas  $\beta$ , 4 de ellas dispuestas en forma paralela, y una de ellas, la  $\beta_5$ , en forma antiparalela; además poseen tres cadenas hélice  $\alpha$  (**Fig. 8A y 8B**).

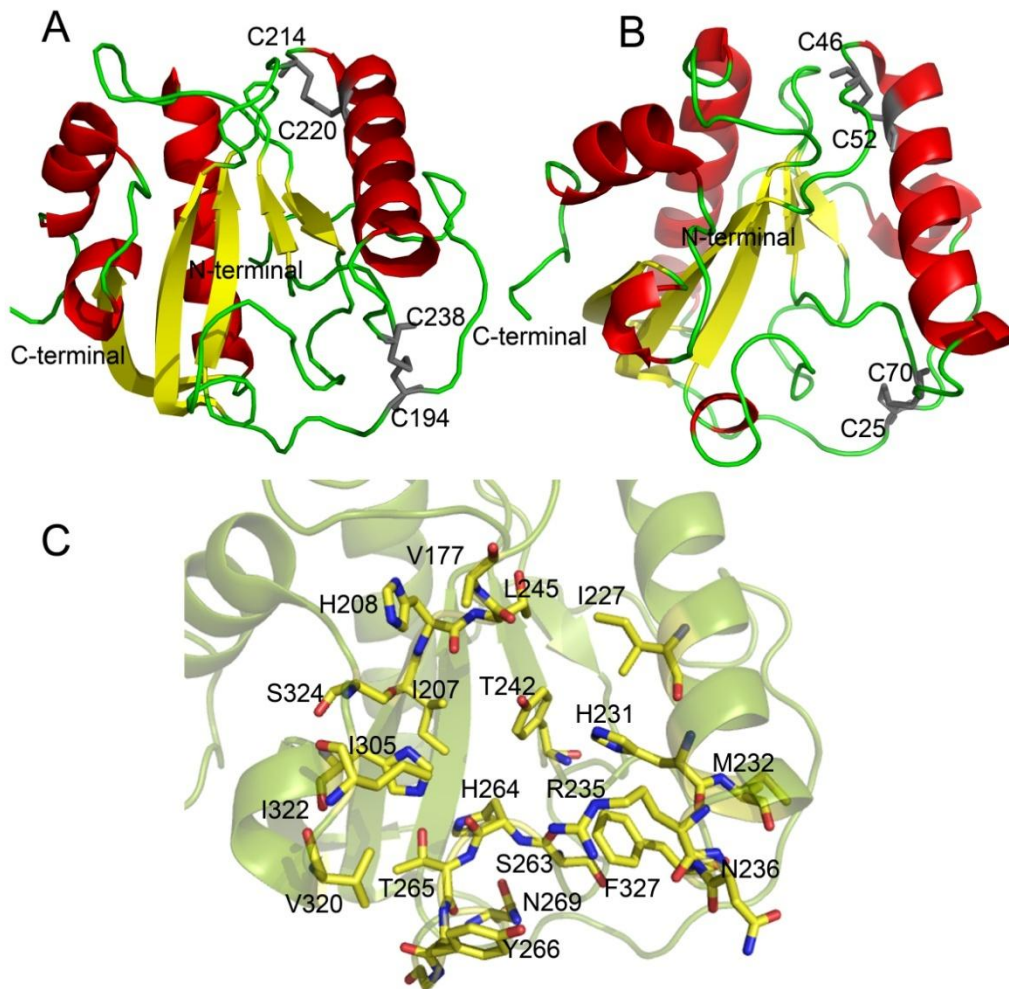
Estas proteínas cuentan con puentes de disulfuro intramoleculares, los que sirven para estabilizar las estructuras de las PGRPs en el duro ambiente de los compartimientos extracelulares o el de los gránulos fagocíticos. Uno de ellos (Cys214-Cys220 o su análogo estructural), está conservado en todas las PGRPs excepto en PGRP-LE de *Drosophila*. Además, el puente de disulfuro Cys194-Cys238 o su análogo estructural, es observado en todas las PGRPs no catalíticas de todos los mamíferos, pero está ausente en todas las PGRPs con actividad catalítica conocida (**Fig. 8A y 8B**). Todas las PGRPs comparten un dominio de unión a PGN en forma de L, que se muestra en detalle en la **Figura 8C**.

Estudios cristalográficos demostraron que PGRP-S es capaz de unirse al LPS y al ácido esteárico de la misma manera que al PGN [Sharma 2012; 2013a].

## **VI. Función de PGRPs en la inmunidad innata**

Como se mencionara anteriormente, las PGRPs son moléculas de reconocimiento de PAMPs que unen, y en ciertos casos hidrolizan, PGNs. Estas realizan un reconocimiento dual de los PGNs, por un lado distinguen entre PGNs *Lys* o *Dap-Type*, y por otro sensan los puentes peptídicos entre los péptidos *stem*. Se observó que diferentes PGRPs muestran distintas especificidades para PGNs de diferentes microorganismos, presumiblemente por el reconocimiento diferencial de los péptidos variables [Liu 2000], quedando aún por establecerse las bases estructurales del reconocimiento diferencial entre las diferentes PGRPs conocidas.



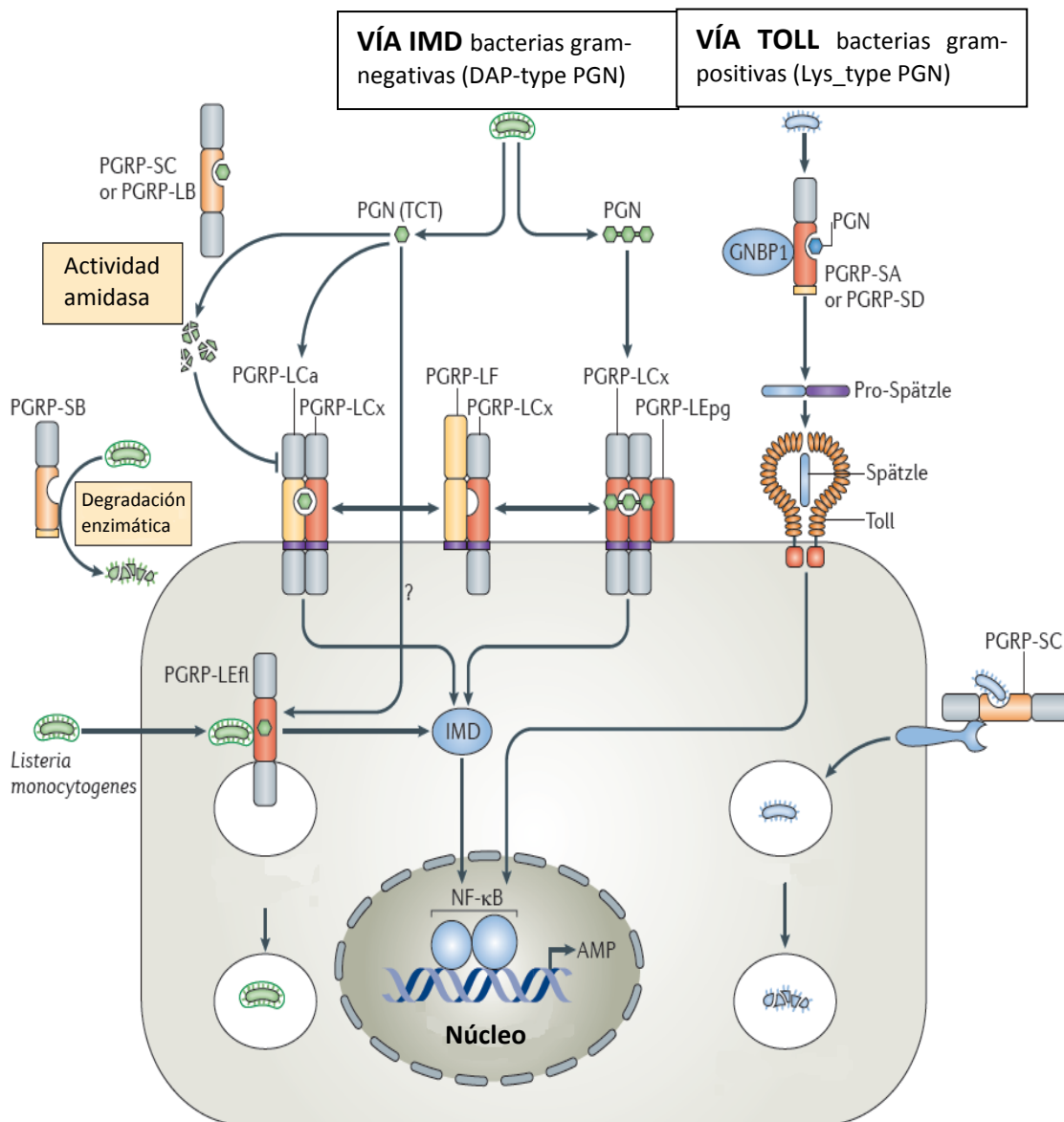


**Figura 8. Estructura Cristalográfica de las PGRPs.** Diagrama de cintas de la estructura de PGRP Iα (A) y S (B). El puente disulfuro formado por la Cys9 y la Cys133 se omitió por claridad. Se muestran en rojo: hélices α; amarillo: láminas β; verde: *loops* conectores y gris: puentes disulfuro. Detalle del sitio de interacción con PGN, los residuos involucrados se colorearon en amarillo, según el código de elementos: N azul y O rojo (C).

Si bien, el reconocimiento de microbios y su fagocitosis mediada por macrófagos, es un aspecto principal de la RI innata que se encuentra conservado tanto en mamíferos como insectos, actualmente las funciones de las PGRPs de mamíferos en estos procesos son menos comprendidas que en insectos.

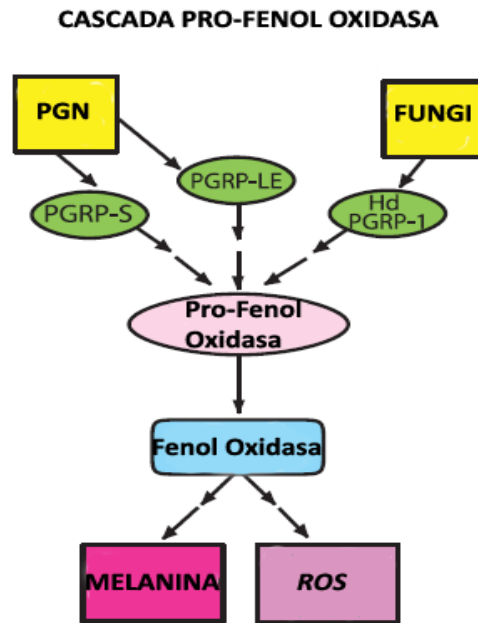
Las PGRPs de insectos están involucradas en vías de señalización muy importantes para la RI de los mismos que se limita a innata. PGRP-SA y PGRP-SC1 de *Drosophila*, reconocen PGNs que contienen lisina y activan los receptores Toll con la consecuente activación de la RI [Michel

2001; Bischoff 2006; Garver 2006, Yano 2011], iniciando por un lado el proceso de fagocitosis y por el otro activando una cascada de transducción de señales que lleva a la producción de péptidos antimicrobianos (como la drosomicina) que actúan frente a bacterias G(+) y hongos [Ramet 2002; Garver 2006]. La vía Imd, la cual regula la expresión de dipterimicina y otros péptidos antimicrobianos contra bacterias G(-) es gatillado por la unión de un PGN (*Dap-type*) con PGRP-LC en cooperación con PGRP-LE [Choe 2002; Kaneko 2004; Takehana 2004] (Fig. 9).



**Figura 9. Reconocimiento de PGNs por parte de PGRPs de insectos.** Las PGRPs regulan múltiples vías de defensa contra microbios (Vía IMD y Vía TOLL – [Dziarski 2011]).

Por otro lado, se describió que la PGRP-S presente en la hemolinfa y en la cutícula del gusano de seda, activa la cascada de profenol-oxidasa con el objetivo de eliminar la presencia de bacterias [Yoshida 1996]. Además, parte de dicha vía puede activarse por la unión de las PGRPs a polímeros presentes en las paredes celulares de hongos tales como el LTA o LPS [Tydell 2006] (Fig. 10).



**Figura 10.** Activación de la cascada Pro-fenol oxidasa por el reconocimiento de PGN de bacterias y  $\beta$ -glicanos de hongos. Esta activación regula la producción de melanina y especies reactivas del oxígeno contra los mismos. (Extraído de Dziarski 2006).

Dicha activación lleva a la producción de melanina, que rodea y contiene el sitio de infección, y desencadena también la producción de especies reactivas del oxígeno que tienen como finalidad eliminar los microbios presentes. PGRP-LE de *Drosophila* [Takehana 2004], PGRP-1 de escarabajo (*Holotrichia diomphalia*), y probablemente otras PGRPs también activan dicha cascada, pero PGRP-1 de *H. diomphalia* tiene la particularidad de actuar en respuesta a 1,3- $\beta$ -d-glucano, un componente común de las paredes celulares fúngicas.

En cuanto a las PGRPs de mamíferos, se sabe que todas ellas son proteínas solubles, las cuales actuarían como puente entre el reconocimiento de PGNs y la inducción de señales intracelulares o la cascada del complemento, por lo que estas tendrían al menos dos sitios de interacción, uno para reconocer al PGN y otro para interactuar con proteínas efectoras del hospedador que aun no han sido identificadas. [Gobert 2003; Hoffmann 2003; Dziarski 2004; Guan 2004a; 2004b;

**Kaneko 2004; Reiser 2004; Guan 2005b**]. En principio se observó que PGRP-S de origen murino y humano poseían acción bacteriostática mientras que la de origen bovino era bactericida, pero posteriormente, se demostró que si estaban glicosiladas, podían actuar como bactericidas sobre ciertas especies bacterianas [**Dziarski 2003; Lu 2006; Dziarski 2006a; 2006b; Osanai 2011**] ya sean G(+) o G(-), aunque solo podría llevar a cabo su actividad catalítica en presencia de los cationes divalentes de Ca y Zn, sin los cuales solo sería bacteriostática [**Liu 2000**].

Tanto PGRP-I $\alpha$  como PGRP-I $\beta$ , son secretadas como homo u heterodimeros, y poseerían actividad bactericida directa contra algunas especies de bacterias G(+) patogénicas o no patogénicas pero no contra la flora normal bacteriana (FNB) [**Lu 2006**]. Estas presentan también actividad bacteriostática frente a bacterias G(-) y por la FNB G(+). Si bien la FNB resiste la presencia de PGRPs, estas limitarían su expansión, evitando de esta manera el sobrecrecimiento de las mismas. Al igual que PGRP-SA, PGRP-I $\alpha$  humana une mejor PGNs que contienen lisina, aunque este reconocimiento no es absoluto [**Gelius 2003; Hoffmann 2003; Leulier 2003; Kaneko 2004**], además se describió que PGRP-I $\alpha$  tiene la capacidad de asociarse al PGN internalizado en el citoplasma de las células epiteliales intestinales [**Bu 2010**].

Al contrario de lo que hacen los péptidos antimicrobianos, como las defensinas (que permeabilizan las membranas), PGRP-S, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$ , eliminarían a las bacterias interactuando con sus paredes celulares. Las PGRPs inhibirían la biosíntesis de PGNs [**Lu 2006**] debido a que se unirían a sus precursores, generando una disrupción de la pared celular, no solo por una inhibición estérica que le impediría el contacto con las enzimas biosintetizadoras sino que también prevendría la formación de puentes cruzados entre los péptidos *stem* de las paredes celulares en crecimiento.

Recientemente se observó que la expresión de PGRP-S, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  fue estimulada en células epiteliales de la córnea humana en respuesta a ligandos de TLRs 1, 2, 3, 5 y 6 (como PGN) [**Ma 2010**].

PGRP-L, como numerosas PGRPs de *Drosophila* [**Mellroth 2003**], tiene función enzimática hidrolizando la unión amida entre el NAM y los motivos L-alanina de los PGNs [**Wang 2003**]. Esta es producida en el hígado y liberada al sistema circulatorio [**Zhang 2005; Duerr 2011; Osanai 2011**], pudiendo prevenir respuestas inflamatorias agudas o atenuar la respuesta inmune contra bacterias por medio de la hidrólisis de PGNs, y su acción puede generar ligandos para otras proteínas de la inmunidad innata, tales como NOD1 [**Dziarski 2006a; 2006b**].

Se observó que la PGRP murina altera la fagocitosis en macrófagos y el estallido respiratorio en neutrófilos, sugiriendo que la posible presencia de PGRP en fluidos biológicos, como el suero, podría modular la respuesta del hospedador contra PGN o bacterias como, por ejemplo, ocurre con el complemento [Liu 2000].

Los mayores avances en el estudio de PGRPs se han centrado principalmente en insectos y más recientemente en mamíferos. Las PGRPs de mamíferos funcionalmente mejor caracterizadas hasta el momento son las PGRP-S [Liu 2000; Dziarski 2003] y PGRP-L [Wang 2003; Xu 2004] de ratón y humana y la PGRP-S bovina [Gupta 1996; Tydell 2002; 2006]; pero mucho queda aún por conocer acerca de estas primitivas moléculas que se han conservado durante millones de años.

El escaso conocimiento en la localización y los mecanismos en que las PGRPs humanas están involucradas, en conjunto con la importancia del reconocimiento y la fagocitosis de microbios como mecanismo efector tanto de la inmunidad innata como de la adaptativa nos llevó a realizar un análisis acerca de la presencia de PGRP-S, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  en diferentes muestras humanas y estudiar los efectos que estas proteínas ejercen sobre la actividad de células fagocíticas.

# Objetivos

La RI innata es la primera barrera interna de defensa de un organismo. Entre los mecanismos implicados en esta respuesta se destaca el reconocimiento de productos conservados de los microorganismos, denominados genéricamente PAMPs. Las PGRPs son moléculas de reconocimiento de PAMPs que interactúan con PGNs. La existencia de síndromes de inmunodeficiencia y el desarrollo de resistencia a antibióticos por parte de los patógenos, hacen que el estudio de la RI innata se torne vital para prevenir la instalación y el desarrollo de una infección.

Atento a lo descrito, nos planteamos como **Objetivos Generales** contribuir al estudio de la RI innata contra bacterias, identificando los fluidos y tipos celulares que expresan PGRPs; y estudiando el rol biológico de las PGRPs en los mecanismos de defensa vinculados con el SI innato.

En base a lo planteado anteriormente proponemos los siguientes **Objetivos específicos**:

1. Expresar, replegar *in vitro* y purificar PGRP-S, los dominios C terminal de PGRP-I $\alpha$  y el N terminal de PGRP-I $\beta$ .
2. Obtener antisueros específicos que servirán como herramientas biológicas para identificar la presencia de PGRPs en diferentes muestras.
3. Analizar la presencia de las PGRPs humanas en fluidos biológicos y células implicadas en la RI innata.
4. Dilucidar la importancia de estas moléculas en el accionar de mecanismos de defensa innatos contra bacterias, incluyendo:
  - 4a. Determinar la capacidad bacteriostática o bactericida de las PGRPs humanas.
  - 4b. Evaluar la influencia de las PGRPs sobre la fagocitosis.
  - 4c. Evaluar si las PGRPs alteran la capacidad infectiva de las bacterias.
5. Analizar la posible interacción de estas proteínas con algún componente celular de la respuesta inmune innata y evaluar la existencia de algún cambio en las células como consecuencia de dicha interacción.

# **Materiales y Métodos**



### **PGRPs recombinantes**

En nuestro laboratorio contamos con el gen codificante de PGRP-S y de los dominios C-terminal de PGRP-I $\alpha$  y N-terminal de PGRP-I $\beta$  clonados en el vector de expresión bacteriano pT7-7, el que otorga resistencia a ampicilina a las células que lo incorporan.

El dominio C-terminal de PGRP-I $\alpha$  comprende los residuos de aminoácidos 162-341, denominada PGRP-I $\alpha$ C, mientras que el dominio N-terminal de PGRP-I $\beta$  comprende los residuos de aminoácidos 51-208 y se denomina PGRP-I $\beta$ N, ambos contienen uno de los sitios de unión a PGN de los dos que posee la proteína entera [Guan 2004a; 2004b].

Bacterias *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  y BL21 (DE3) fueron transformadas con el plásmido pT7-7-PGRPs para su expansión y posterior expresión como cuerpos de inclusión (CI), respectivamente.

### **Preparación de *E. coli* DH5 $\alpha$ y BL21 (DE3) competentes**

Las bacterias competentes *E. coli* DH5 $\alpha$  o BL21 se prepararon por el método de cloruro de calcio [Sambrook y Russell 2001]. Se realizaron precultivos a partir de los correspondientes *stocks* conservados en glicerol al 10% a -70° C, en medio Luria Bertani (LB) durante la noche (ON) a 37° C. Posteriormente, se diluyeron 200  $\mu$ l de precultivo en 10 ml de LB y se incubaron a 37° C hasta alcanzar una DO<sub>600nm</sub>: 0.6-0.8. El pellet bacteriano obtenido se resuspendió suavemente en 10 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M estéril a 4° C y se incubó 30 min en hielo. Finalmente, se centrifugaron y resuspendieron las bacterias en 1 ml de CaCl<sub>2</sub> 0.1 M, glicerol 10% estéril para su uso inmediato o para su preservación en N<sub>2</sub> (l).

### **Trasformación de bacterias competentes**

Alícuotas de *E. coli* DH5 $\alpha$  competentes fueron transformadas con las construcciones pT7-7-PGRP-S, pT7-7-PGRP-I $\alpha$ C o pT7-7-PGRP-I $\beta$ N mediante el método químico. Para ello, las células se incubaron con 2  $\mu$ l de cada construcción durante 30 min a 4° C. A continuación se realizó un shock térmico a 42° C durante 45 segundos, para permeabilizar la membrana y favorecer el ingreso del plásmido al interior de las bacterias. Posteriormente, se le agregó 1 ml de medio LB e incubó 1 h a 37° C para la recuperación celular. Finalmente, se sembraron 100  $\mu$ l de este cultivo en placas de LB-ágar con 100  $\mu$ g/ml de ampicilina las que se incubaron ON a 37° C para la selección de los clones positivos. Cuatro de las colonias que desarrollaron crecimiento fueron tomadas al azar y expandidas en medio líquido con antibiótico. La mitad de la

preparación se empleó para la extracción de plásmido, empleando el QIAprep Miniprep Extraction Kit de QIAGEN. La eficiencia del método y pureza de los plásmidos obtenidos se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 0.7% revelado con bromuro de etidio. La otra mitad del cultivo se empleó para la producción de los stocks, los que se conservaron en LB-glicerol al 10% a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

Empleando el mismo procedimiento, se transformaron células *E. coli* BL21 (DE3) competentes con los plásmidos pT7-7-PGRP-S, pT7-7-PGRP-I $\alpha$ C o pT7-7-PGRP-I $\beta$ N obtenidos previamente. Los clones seleccionados se preservaron en glicerol a  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### **Expresión y purificación de proteínas recombinantes**

Desarrollamos y ajustamos las condiciones de expresión, correcto plegamiento *in vitro* y purificación para PGRP-S, PGRP-I $\alpha$ C y PGRP-I $\beta$ N obteniendo rendimientos en el orden de los miligramos por litro de cultivo.

Brevemente, con las construcciones pT7-7-PGRP-S, pT7-7-PGRP-I $\alpha$ C o pT7-7-PGRP-I $\beta$ N se transformaron *E. coli* BL21(DE3) y las proteínas se expresaron como CI. Las bacterias fueron cultivadas en LB-Ampicilina 100  $\mu\text{g/ml}$  hasta  $\text{DO}_{600} = 0.7$  para posteriormente inducir la expresión de las proteínas con isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido (IPTG) 1 mM durante 3-5 h. Luego, las bacterias fueron centrifugadas y el pellet se resuspendió en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8.5 y se lisó por sonicación. El pellet obtenido luego de centrifugar las bacterias sonicadas se lavó con el mismo buffer conteniendo deoxicolato de sodio 2.5%. A continuación, el pellet resultante, correspondiente a CI, se lavó 3 veces con la misma solución más el agregado de Tritón X100 0.5%, luego con urea 2 M y por último, con Tris-HCl 100 mM pH 8.5. Después de cada lavado los CI fueron homogeneizados en mortero. Finalmente los CI se solubilizaron en guanidina 6 M. Las distintas soluciones utilizadas contienen EDTA como inhibidor enzimático y DTT como agente reductor. Con el fin de estimar la concentración de proteína solubilizada se realizó SDS-PAGE, utilizando como patrones concentraciones conocidas de seroalbúmina bovina (BSA).

Las proteínas desnaturalizadas fueron agregadas gota a gota al buffer de replegado (arginina-HCl 1 M pH 8, EDTA 2 mM, Tris-HCl 100 mM pH 8, cisteamina 6.3 mM, cistamina 3.7 mM) bajo agitación vigorosa hasta una concentración final de 20-50  $\mu\text{g/ml}$  durante 48 h a  $4^{\circ}\text{C}$ .

Alternativamente se empleó glutatión reducido 5 mM y glutatión oxidado 0.5 mM como cupla redox. Se empleó fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) como inhibidor enzimático.

Finalizado el replegado, las PGRPs fueron concentradas empleando un equipo Easy Load II (Masterflex, Cole Palmer, Illinois, USA), un aparato Amicón y Centripeps (AMICON, Beverly, MA, USA), dializadas extensivamente contra buffer Tris-HCl 50 mM pH 8, NaCl 150 mM y purificadas empleando exclusión molecular (Superdex 75 o 200, GE, Uppsala, Sweden). La concentración de proteína purificada fue calculada mediante la medición de la  $DO_{280/260}$ , concentrada a 0.5 mg/ml y la pureza corroborada mediante SDS-PAGE teñido con Coomassie Blue tanto en condiciones reductoras (DTT) o no. [Fernández 2006; 2010; Romasanta 2014]. Todas las PGRPs fueron tratadas con polimixina verificándose la ausencia de LPS por medio del test de *Limulus* (endotoxina <0.03 U/ml; Pyrotell Associates of Cape Cod, Falmouth, MA).

### **Perfil hidrodinámico de las proteínas. Evaluación de la estructura cuaternaria**

La cromatografía de exclusión molecular permite estudiar las propiedades hidrodinámicas de las proteínas. Estas se separan de acuerdo a su coeficiente friccional, expresado como radio hidrodinámico o radio de Stokes ( $R_s$ ). El  $R_s$  se define como el radio de una esfera con el mismo coeficiente friccional que la proteína, permitiendo de esta forma obtener una aproximación del volumen real que ocupa la macromolécula en solución [Uversky 1993].

Las proteínas purificadas PGRP-S, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  fueron eluidas a través de una columna de exclusión molecular Superdex 75 ó Superdex 200 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) acoplada a un cromatógrafo líquido AKTA (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) para evaluar su perfil hidrodinámico y su estructura cuaternaria. Las columnas se equilibraron previamente con al menos dos volúmenes de columna de PBS. El flujo empleado para las corridas fue de 0.5 ml/min y el volumen de muestra sembrado fue de 250  $\mu$ l. Se construyeron curvas de calibración para cada una de las columnas empleadas. Para ello, se hicieron corridas de patrones de proteínas globulares con identidades y pesos moleculares conocidos: tiroglobulina (670 kDa), IgG bovina (158 kDa), ovoalbúmina de pollo (43 kDa), mioglobina equina (17 kDa) y vitamina B12 (1.3 kDa). Posteriormente, utilizando la ecuación descripta por Uversky [1993], se calcularon los  $R_s$  teóricos para cada una de las proteínas patrón a partir de su peso molecular (PM):

$$\log R_s = 0.369 \log PM - 0.254$$

Se confeccionaron las curvas de calibración graficando los Rs de las proteínas patrón en función del volumen de elución. Se ajustó una recta a los puntos y se interpolaron los valores de volumen de elución hallados para cada una de las macromoléculas en estudio para finalmente obtener los Rs experimentales de las PGRPs.

### **Generación de antisueros en ratones y conejos**

Con el fin de contar con herramientas que permitan verificar la presencia de PGRPs en distintas muestras biológicas, hemos preparado antisueros policlonales específicos contra PGRP-S, PGRP-I $\alpha$ C y PGRP-I $\beta$ N en ratones y conejos, los que se obtuvieron empleando planes de inmunización convencionales. La manipulación de los animales fue llevada a cabo bajo las reglas de ética internacionales vigentes.

Los antisueros policlonales generados en ratones fueron obtenidos inmunizando 3 lotes de ratones hembra BALB/c provenientes del bioterio del Instituto de Estudios de la Inmunidad Humoral (IDEHU)-CONICET, Cátedra de Inmunología- FFYB-UBA. Estos se inmunizaron con 10  $\mu$ g de PGRPs en 100  $\mu$ l de PBS y 100  $\mu$ l de adyuvante de Freund (AF) vía intraperitoneal según el siguiente plan: el día 0 se inoculó al primer lote con PGRP-S, al segundo lote con PGRP-I $\alpha$ C y al tercero con PGRP-I $\beta$ N mezclados con un volumen de AF completo. En los días 7, 14 y 28 se repitió la cantidad de PGRP inoculada a cada lote, pero con la diferencia de que en estos casos se empleo AF incompleto. En todos los casos los animales fueron sangrados a blanco por vía retro-orbital. Los sueros obtenidos en el día 35 se analizaron por ELISA e inmunoblotting para evaluar la reactividad con sus respectivos Ags y también para evaluar la reacción de cruce entre las PGRPs. Finalmente los sueros fueron testeados por ELISA e inmunoblotting, alicuotados y guardados a -20° C.

Los antisueros policlonales generados en conejos fueron obtenidos inmunizando con 100  $\mu$ g de PGRPs mezclado con AF completo, en el lomo o en las patas de los animales, alternativamente. Se realizaron sucesivas inoculaciones en los días 7, 14, y 28 empleando AF incompleto y, el suero obtenido de las venas de la oreja en el día 35, fue testeados por ELISA e inmunoblotting, alicuotado y guardado a -20° C.

## **ELISA**

Para la determinación de Acs específicos se desarrolló un enzimoimmunoensayo (ELISA) de tipo indirecto para la detección de Acs anti PGRPs en suero de ratones y conejos según lo descrito por Voller [1988] empleando policubetas de 96 pocillos de poliestireno de fondo plano (Nunc, Roskilde, Dinamarca). La sensibilización de las placas se realizó con 0.2 µg/pocillo de PGRP purificada en 100 µl de PBS ON a 4° C.

El bloqueo de los sitios libres se realizó con BSA 3%, gelatina 0.1% en PBS durante un tiempo mínimo de 1 hora a 37° C, para luego realizar 3 lavados con PBS-Tween 0.05 % (PBS-T).

Los sueros obtenidos a partir de ratones y conejos fueron analizados realizando diluciones seriadas al medio en PBS-T conteniendo BSA 1 % y gelatina 0.1 % a partir de una primera dilución 1:100, por duplicado, en un volumen de 100 µl/pocillo. Estos fueron incubados 1 hora a 37° C.

Luego de 3 lavados con PBS-T, se agregaron 100 µl de inmunoglobulina de cabra anti-conejo o de cabra anti-ratón conjugados con Peroxidasa (Sigma-Aldrich, SL, MO, USA) como segundo Ac en una dilución 1:10000. Los sueros que poseían una absorbancia (Abs) mayor a la media de los sueros de controles no inmunizados más 3 desvíos estándar fueron considerados positivos y se tomó como título la última dilución positiva de cada uno.

En todos los casos el revelado se realizó mediante el agregado de sustrato-cromógeno, agua oxigenada/ortofenilendiamina (OPD) durante 15 min en oscuridad a temperatura ambiente y se detuvo la reacción por el agregado de ácido sulfúrico 4 M. La Abs a 490 nm se midió en un espectrofotómetro metertech Σ960, Taipei, Taiwán.

### **Obtención de PGN insoluble**

Con el fin de obtener PGN insoluble, bacterias *E. coli*, *Brucella abortus*, *Staphilococcus aureus* y *Enterococcus faecalis* se cultivaron a partir de los stocks de glicerol en 6L de LB cada una a 37° C hasta una  $DO_{600nm}$ : 0.800. Se centrifugaron y los pellets obtenidos se lavaron 2 veces con agua destilada resuspendiéndolas finalmente en agua fría y sometiéndolas a 5 ciclos de sonicado de 1 min cada uno. Para completar la lisis, la suspensión bacteriana se pasó por una prensa French. El lisado finalmente obtenido se centrifugó a 2200 g durante 10 min. El pellet resultante se resuspendió en NaCl 1M frío, centrifugándolo nuevamente y resuspendiéndolo en

agua para hervirlo durante 20 min. A continuación se enfrió la suspensión; se le agregó AcNa 2M pH 5.9 y RNAsa, incubándose a 37° C durante 3 h y finalmente se centrifugó a 20000 g 1h.

El producto resultante fue resuspendido en buffer fosfato de sodio 50 mM pH 7.5 y digerido con tripsina a 37° C durante 2 h. Luego se centrifugo 1 h a 20000 g y al pellet obtenido se le agregó SDS al 4%, incubándolo 1 h a temperatura ambiente para centrifugarlo nuevamente 1 h a 20000 g. El pellet, que constituye la pared celular, se lavó 6 veces con agua y se liofilizó.

La pared celular obtenida se resuspendió en HCl 0.1 M e incubó a 60° C durante 24 h. Finalmente se lavó varias veces con agua obteniendo, luego de liofilizar, el PGN insoluble que se guardo a -20° C [Araki 1972; Yoshida 1996].

### **Unión de PGRPs a Bacterias y PGN**

Con el fin de analizar la funcionalidad de las PGRPs recombinantes producidas, se procedió a verificar la capacidad su unión a bacterias y a los PGN insolubles previamente obtenidos utilizando el método descripto por Yoshida *et al.* [1996]. Para ello, cultivos frescos de bacterias 10<sup>6</sup> unidades formadoras de colonias (UFC) de *S. aureus*, *E. faecalis*, *E coli* o *B. abortus* o sus PGN insolubles (100 µg) fueron incubadas con las diferentes muestras a ensayar en una concentración de 10 ug/ml de PGPR-S, PGRP-I $\alpha$ , PGRP-I $\beta$ , lizosima o sólo PBS (como controles) ON a 4° C en constante rotación. Luego se centrifugó durante 10 min a 15800 g y se lavó 3 veces con PBS. Finalmente se resuspendió en buffer muestra (Tris-HCl 50 mM pH 6.8, SDS 2%, glicerol 10%, azul de bromofenol 0.1%) con o sin DTT para su posterior análisis por SDS-PAGE o immunobloting.

### **SDS-PAGE**

La separación de proteínas por electroforesis en geles de poliacrilamida se desarrollo en presencia de SDS según la técnica descripta por Laemlli [1970]. Se emplearon geles de *stacking* al 3% de acrilamida:bisacrilamida (30:0.8) y geles de separación al 15%. Las muestras fueron tratadas con buffer muestra con o sin DTT y calentadas a 100° C durante 5 min. La separación se realizó a 140 mVolts hasta que el azul de bromofenol ingresó en el gel de separación pasando luego a 200 mVolts, en un equipo Mini Proteam II (Biorad). El buffer de corrida empleado fue Tris-HCl 25 mM, SDS 1%, glicina 250 mM pH 8.8. Las bandas proteicas fueron visualizadas tiñendo a los geles con Coomassie Blue R250 0.1% en una solución de metanol 42%, ácido

acético 16% y se decoloraron en una solución ácido acético/metanol/agua en una relación 10/12.5/77.5.

### **Immunoblotting**

La existencia de reacción de cruce entre las diferentes PGRPs, la unión de PGRP a PGN o bacterias y las diferentes muestras biológicas obtenidas fueron analizadas por immunoblotting transfiriendo los Ags de un SDS-PAGE a una membrana de nitrocelulosa (Protran, Schleicher & Schuell, Alemania) durante 90 min a 300 mAmper en un EQUIPO Trans-Blot (Biorad) empleando el método de Towbin [1979]. La transferencia a la membrana de las muestras y de los patrones de peso molecular se puso de manifiesto empleando Rojo Ponceau al 0.1% en tricloroacético [Salinovich 1986] durante 2 min. Posteriormente la nitrocelulosa fue bloqueada con una solución de TBS (Tris-HCl 50 mM pH 7.4, NaCl 150 mM) con 1% de leche descremada en polvo a 4° C ON. Luego de 3 lavados con TBS, se incubó 1 hora a 37° C con el antisuero policlonal 1:500 (generado en ratón o conejo) contra PGRP. Tras lavar nuevamente la membrana se la incubo 1 h a 37° C con el conjugado de cabra anti-ratón-peroxidada 1:1000 o cabra anti-conejo-peroxidada 1:2000 (ambos Jackson ImmunoResearch). Todas las diluciones fueron realizadas en TBS-leche 1%. Luego de lavar se agregó una solución de sustrato y cromógeno Agua oxigenada/4-cloro-1-naftol, en metanol/TBS. Se permitió el desarrollo de color y se detuvo la reacción enzimática por lavado con H<sub>2</sub>O destilada. Alternativamente para analizar las muestras biológicas y los ensayos de co-inmunoprecipitación se realizó la detección empleando quimioluminiscencia (ECL Plus-GE HealthCare, Uppsala, Suecia) para lo cual se emplearon los antisueros generados y los conjugados en dilución 1:2000 y 1:5000 respectivamente.

### **Obtención de muestras biológicas**

Se obtuvieron muestras de saliva y de sangre, con y sin heparina, de donantes sanos luego de recibir su consentimiento por escrito. A las muestras de sangre no heparinizada se las incubó 1 h a 37° C para luego centrifugarlas y obtener el suero. Por otro lado, a las muestras de sangre heparinizada, se les realizó diferentes gradientes de densidad para obtener poblaciones enriquecidas de células mononucleares (PBMC) o polimorfonucleares (PMN).

Para la obtención de PBMCs se diluyó la sangre entera heparinizada con PBS (1:1). Veinte ml de sangre diluida fueron lentamente agregados a 10 ml de Ficoll-Paque<sup>TM</sup> estéril (GE HealthCare,

Upsala, Suecia) y posteriormente se centrifugó a 400 g durante 20 min. Los PBMCs contenidos en la interfase fueron lavados con PBS y centrifugados 10 min a 200 g. La población de PBMC fue estimada, previa coloración de la misma con *Trypan Blue*, en una cámara de Neubauer y luego se resuspendieron en PBS.

Para obtener una fracción enriquecida en PMN, se retiró la capa de células mononucleares provenientes del gradiente de Ficoll-Hypaque, se tomó el sobrenadante (SN) hasta 1 cm por encima de la capa de glóbulos rojos y se lo descartó. A continuación, se diluyó el pellet con solución fisiológica agregando 2 veces el volumen del mismo. Se realizó un gradiente de Dextran colocando 3 ml de solución de Dextran al 6% por cada 9 ml de sangre, dejándolo reposar 30 min a temperatura ambiente. Se retiró el SN y se lavó con PBS, BSA 0.1 % centrifugándolo 5 min a 400 g. Por último, se descartó el sobrenadante, tratándose el pellet con agua destilada durante 30 segundos (lisando así los eritrocitos remanentes). La lisis se frenó con PBS y se contaron las células en una cámara de Neubauer. Los PMN ( $10^6$  células) previamente obtenidos se estudiaron antes y después de inducirlos a degranular con fermitol –metionil-leucil-fenilalanina (FMLP) 10 mM durante 15-45 min a 37° C y luego se centrifugaron para separar el pellet celular del sobrenadante de degranulación. Alternativamente, los PMNs se lisaron en Tris/HCl 0.2 M pH 7.0, con NaCl 0.2 M, EDTA 4 mM, glicerol 10%, NP-40 1%, y un mix de inhibidores proteasas. A partir de este momento, las células y los fragmentos celulares, fueron separados por centrifugación.

Las líneas tumorales de monocitos humanos (THP-1) y de células epiteliales pulmonares (A549) fueron obtenidas de ATCC (Manassas, VA). Las células THP-1 fueron cultivadas en medio completo (medio RPMI 1640 complementado con SFB 10%, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Setenta y dos horas antes de cada ensayo, las células fueron tratadas o no con D3 1,25-dihidroxivitamina (VD3) (0.05 µ M). Posteriormente dichas células fueron contadas después en una cámara Neubauer utilizando Trypan blue para aumentar el contraste. Por otro lado, las células A549 fueron cultivadas en DMEM completo (medio DMEM complementado con SFB 10%, glutamina 2 mM, piruvato 1 mM, penicilina 100 U/ml y estreptomycin 100 µg/ml). Veinticuatro horas antes del ensayo las células se despegaron de la botella de cultivo incubando con Tripsina 0.05%, EDTA 0.02%, se lavaron con PBS y se resuspendieron en medio completo.



### **Identificación de PGRPs en muestras biológicas**

Las muestras de saliva, suero, los PBMCs, los PMN y sus sobrenadantes de degranulación se diluyeron en buffer Laemlli. Alternativamente, con el objeto de recuperar PGRPs de los fluidos, las muestras de saliva, suero y de degranulación de PMN fueron tratados con los antisueros específicos obtenidos en conejos e inmunoprecipitados empleando proteína A-Sepharosa, o fueron incubados directamente con PGN insoluble purificado a partir de *S. aureus*, *E. faecalis*, *B. abortus* y *E. coli*. Todas las muestras obtenidas se analizaron por immunoblotting, inmunofluorescencia directa (IFD) y/o Citometría de Flujo (CF), empleando los Acs específicos anti-PGRPs descriptos previamente.

### **Inmunoprecipitación**

Alícuotas de 50 µl de saliva, suero o de los SN de degranulación de PMN se diluyeron con 450 µl de buffer de inmunoprecipitación (Tris 50 mM pH 7.5, NaCl 150 mM, PMSF 1 mM, Tween 20 0.05%) y 5 µl de suero de conejo anti-PGRP-S, anti-PGRP-Iα, o anti-PGRP-Iβ e incubaron ON a 4° C con agitación suave. Posteriormente, se agregó 50 µl de proteína A-Sepharosa, se incubó 2 h a 4° C con agitación suave, y se centrifugó 4 min a 15800 g. A continuación se lavó el pellet 3 veces con buffer de lavado (buffer de inmunoprecipitación, NaCl 0.2 M), y se lo resuspendió en 25 µl de buffer de siembra (con Azul de Bromofenol y glicerina), para posteriormente analizarlo por SDS-PAGE o immunoblotting.

### **Inmunofluorescencia directa (IFD)**

Las líneas celulares THP-1 y A549 fueron incubadas con los antisueros anti-PGRP-S, anti-PGRP-Iα o anti-PGRP-Iβ marcados con FITC diluidos 1:100 en PBS-BSA-Saponina 30 min a 4° C. Luego se lavó 3 veces la suspensión celular con PBS centrifugando 10 min a 400 g. Como control negativo se emplearon las mismas células sólo tratadas con el conjugado (anticuerpos de cabra anti-conejo-FITC –SIGMA-) diluido 1:100. Por último se resuspendieron las células marcadas en PBS, Azida Sódica 0.1% y se observaron al microscopio de fluorescencia (Olympus) o se analizaron 20000 eventos por CF en un equipo Partec y los datos obtenidos fueron analizados mediante el Software Winmdi (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

### **Unión de PGRP a PBMC o monocitos THP-1**

Se analizó por CF la unión de las PGRPs a PBMCs y a las células THP-1. Las células fueron tratadas con formaldehído al 2% para fijarlas y posteriormente incubadas a razón de  $2 \times 10^6$  células por ensayo en 1 ml de PBS suplementado al 10% con suero humano ON a 4° C para bloquear los receptores Fc y reducir la señal inespecífica. A continuación, se incubaron las células con 10 µg de PGRP-S, PGRP-I $\alpha$ , PGRP-I $\beta$ , o BSA como control negativo 30 min. a 4° C en agitación. La presencia de las PGRPs en la superficie celular fue analizada con los Acs anti-PGRPs de conejo obtenidos y con Acs conjugados anti-inmunoglobulinas de conejo-FITC. Por otro lado, las células incubadas con PGRPs fueron analizadas también por inmunoblotting, como se describiera anteriormente.

Alternativamente se emplearon las PGRPs marcadas con FITC para evitar el uso de conjugados.

### **Marcado de las PGRPs con FITC**

Las PGRPs (2 mg/ml) fueron dializadas contra buffer Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>/NaHCO<sub>3</sub> 0.05 M pH 9-9.5 y luego contra el buffer de conjugación (Buffer carbonato 0.05 M pH 9-9.5, NaCl 0.15 M, FITC 1 mg/ml) ON a 4° C en agitación constante. Posteriormente se concentró la proteína y se la purificó en una columna G25 empleando PBS como buffer de elución para separar las moléculas de FITC libres.

### **Endocitosis de PGRP-FITC**

Los PBMCs obtenidos o los monocitos THP-1 ( $2 \times 10^6$  células por ensayo) se incubaron con 10 µg de PGRP-S-FITC, PGRP-I $\alpha$ C-FITC o PGRP-I $\beta$ N-FITC tanto a 4° C como a 37° C durante 1 h con agitación permanente. Como control negativo se incubaron células con 10 µg de BSA-FITC. Los resultados se analizaron por CF con y sin tratamiento de las células con Trypan Blue, que nos permite eliminar la señal fluorescente debido a la unión de moléculas marcadas a la membrana externa y solo detectar aquella que provenían del interior de la célula. Con el fin de determinar el mecanismo involucrado en el ingreso de las PGRPs, se repitieron estos ensayos en presencia del inhibidor de la macropinocitosis, Wortmanina 100 nM y 50 µM, 15 min antes del agregado de las PGRPs-FITC. Como control se emplearon células tratadas con DMSO. Las

células fueron analizadas por CF o por microscopía de fluorescencia en presencia de los colorantes fluorescentes DiD (membrana celular) y DAPI (ADN) (Olympus BX-51).

### **Citometria de flujo**

Los análisis por CF fueron realizados en un equipo Partec PAS III colectando 20000 eventos por muestra, y los datos obtenidos fueron analizados mediante el Software Winmdi (The Scripps Institute, Flow Cytometry Core Facility). Todos los análisis fueron realizados por triplicado.

### **BIAcore**

La interacción de las PGRPs con los monocitos de la línea THP-1 fue monitoreada en un biosensor de espejo resonante BIAcore T100 (GE, Upsala, Suecia) que permite la determinación en tiempo real de la interacción entre dos moléculas [Jönsson 1991].

La resonancia plasmática de superficie (SPR) es un fenómeno que ocurre cuando vectores magnéticos de luz incidente resuenan con una nube de electrones libres sobre una superficie de metal de un grosor específico. Algunos metales como el oro, tienen una nube de electrones libres que pueden juntarse y resonar con ciertos ángulos de luz incidente. La resonancia absorbe energía de la luz incidente, observándose entonces una caída característica en la intensidad de luz reflejada. Los eventos de unión biomolecular causan cambios en el índice de refracción que son detectados como diferencias en la señal SPR, expresadas en RU (una RU=1 pgr/mm<sup>2</sup>).

Sintetizando este fenómeno, la luz que incide en una interfase de dos índices refractivos, entre los que se coloca una superficie de oro, va a resonar a un ángulo específico y resulta en la Abs de la luz reflejada. Este principio posibilitó el diseño de un detector de masa basado en que todas las proteínas, independientemente de sus secuencias, tienen el mismo índice de refracción. Por lo tanto ésta técnica óptica mide cambios del índice de refracción en la vecindad de la superficie. Dichos índices son directamente proporcionales al cambio de masa adsorbida.

Para estudiar la unión de dos moléculas mediante el uso de un biosensor se necesita acoplar uno de los componentes del complejo a la superficie del “chip” sensor o cubeta y pasar el otro componente en estado soluble sobre dicha superficie para que se produzca la unión. Para ello la superficie tiene moléculas de carboximetildextran que permite unir las proteínas.

El acople químico de la proteína al “chip” (BIAcore) se realizó mediante los grupos aminos de las proteínas. El acople se realizó mediante la activación de la superficie de la matriz con ésteres de N-hidrosuccinimida (NHS), los cuales reaccionan con grupos aminos de las proteínas formando una unión covalente amida. Los grupos reactivos remanentes fueron neutralizados con etanolamina. Se utilizó un “chip” sensor CM5. Para inmovilizar las PGRPs (~100 µg/ml) éstas fueron dializadas contra acetato de sodio 10 mM pH 5.5 y acoplados a la matriz de carboximetildextran del chip sensor CM5 usando el Amine Coupling Kit como describe el fabricante [Jönsson 1991]. Los períodos de activación e inmovilización fueron establecidos entre 5 y 7 min para acoplar la cantidad deseada de proteína para generar entre 1200-2300 RU.

Se emplearon diferentes diluciones al medio de las células THP-1 en PBS, para analizar la unión a la proteína inmovilizada a la superficie del chip sensor. Todos los experimentos de unión se realizaron a 25° C. La disociación fue llevada a cabo con PBS-tween 20. Para regenerar la superficie se empleó pulsos de HCl 10 mM. En los ensayos realizados se empleó un flujo de 5 µl/min.

### **Expresión diferencial de NF-κB**

Para la determinación del nivel de expresión de dicho factor nuclear, las células fueron cultivadas frente a diferentes estímulos durante 90 min. Las extracciones de proteína nuclear se obtuvieron utilizando buffer HEPES 10 mM en presencia de inhibidores de proteasas (aprotinina, pepstatina, leupeptina, PMSF, EDTA, EGTA y DTT) y el detergente NP40 para luego ser cuantificada por Bradford. La determinación de NF-κB en los extractos se realizó mediante inmunoblotting, empleando anticuerpos anti-NF-κB (1:2000) de ratón (Santa Cruz Biotecnología; Texas, EE.UU.) y como segundo anticuerpo un anti-IgG total de ratón hecho en cabra conjugado con peroxidasa (1:5000). Posteriormente el resultado fue visualizado por quimioluminiscencia. La Histona H8 fue usada como control de expresión de proteína. El programa Image-J fue empleado para la cuantificación.

### **Ensayos de viabilidad**

Con el fin de determinar si las PGRPs humanas recombinantes tenían actividad bactericida o bacteriostática realizamos cultivos incubando  $10^8$  UFC/ml de *S. aureus* o *B. abortus* en RPMI 1640 suplementado con SFB 10% en presencia o ausencia de  $10 \mu\text{g/ml}$  de las distintas PGRPs (aproximadamente  $3 \times 10^8$  moléculas de PGRP por bacteria) durante al menos 3 h como se ha descrito por Wang [2007]. Como control se incubaron bacterias en presencia de BSA. El número de bacterias vivas fue determinado por conteo en placa (LB-ágar) de las UFC/ml de cada muestra, en intervalos de una hora.

Posteriormente, con el objetivo de estudiar el posible daño que éstas moléculas pudieran ocasionar a la pared celular bacteriana, repetimos los cultivos realizados para la determinación del efecto bactericida o bacteriostático, en presencia del marcador fluorescente indicador de daño en la membrana Sytox-Green (Invitrogen, Eugene, OR, EEUU) para luego analizar las muestras por CF.

### **Ensayo de fagocitosis**

Monocitos de la línea celular THP-1 ( $10^6$  células por pocillo) fueron cultivados en presencia de  $10^8$  UFC/ml de *S. aureus*-FITC muertos por calor o con  $20 \mu\text{g/ml}$  of PGN-FITC previamente preincubados, o no, con las distintas PGRPs. Todos estos ensayos se realizaron en RPMI con piruvato-glutamina (PG) en presencia de SFB, suero humano normal (SHN) o, como control, sin suero. Luego de incubar 1-3 h a  $37^\circ \text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%, se lavaron las células 3 veces y se las resuspendió en PBS para finalmente analizar la fagocitosis de las bacterias o sus PGNs marcados por los monocitos empleando CF, con el agregado previo de Trypan Blue. Se analizó el porcentaje de células positivas en la region M1 de células con PGRPs-*S. aureus*-FITC (o sus PGNs-FITC)/células con *S. aureus*-FITC (o sus PGNs-FITC).

### **Ensayo de infección**

Se cultivaron  $10^6$  monocitos de la línea TPH-1 por pocillo en 1 ml de medio de cultivo completo (RPMI, SFB 10%; PG) durante 24 h a  $37^\circ \text{C}$ ,  $\text{CO}_2$  5%. Posteriormente las células fueron infectadas con *S. aureus*, crecidos previamente en medio LB hasta alcanzar su fase estacionaria, en una relación Bacteria:Célula 100:1, durante 1 h en un volumen final de 0.2 ml de medio sin suero y sin antibiótico. Transcurrido este tiempo, los monocitos fueron lavados 2 veces

con PBS estéril y resuspendidos en medio de cultivo completo con antibióticos (Gentamicina y Estreptomicina) para eliminar las bacterias residuales presentes. Con el fin de eliminar el antibiótico remanente y de analizar el éxito de la infección, las células se lavaron 3 veces con PBS estéril y se lisaron con TRITON X 100 2%. El pellet obtenido se resuspendió en LB y se procedió a realizar diluciones seriadas de esta suspensión, sembrándose 0.1 ml en placas de LB-ágar, las que fueron incubadas ON a 37° C para la determinación de las UFC que infectaron a los monocitos.

Estos ensayos fueron realizados tanto con *S. aureus* preincubados durante 1 h a 37° C en medio RPMI en presencia de 10 µg/ml de PGRP-S tratadas con polimixina o, en medio solo. También, se realizaron estos ensayos en presencia de SHN fresco. Para la co-localización del complejo *S.aureus*-PGRPs-FITC en el fagosoma, células de la línea THP-1 fueron cultivadas en vidrios tratados con poly-L-lisina, pulsadas 1 h a 37° C con 10<sup>8</sup> UFC/ml de *S. aureus* incubados con 10 µg de PGRPs-FITC u OVA-FITC y 50 µL de LysoTracker RED (Molecular Probes, invitrogen). Luego se lavaron las células e incubaron durante 1-4 h, para fijarlas posteriormente con paraformaldehído. Un control de células no pulsadas fue realizado en paralelo. La imagen obtenida se logro mediante la utilización de microscopia confocal (Nickon C1 Con PlanAPO 60Xoil AN1.40 lens). Para la detección de FITC se empleó un laser de 490nm. La longitud de onda excitación y de emisión del LysoTracker es de 546 y 590 nm respectivamente.

### **Efectos de las PGRPs sobre monocitos/macrófagos**

Las células (10<sup>6</sup>/pocillo) fueron cultivadas en 1 ml de medio RPMI 1640 conteniendo 10% de SFB con glutamina 2 mM, penicilina 100 U/ml, estreptomicina 100 µg/ml y piruvato 1 mM, en placas de 24 pocillos; a continuación las células fueron incubadas con 10 µg/ml de PGN insoluble de *S. aureus* a diferentes tiempos, 24, 48 o 72 h a 37° C, CO<sub>2</sub> 5%. Estos ensayos fueron realizados con PGN preincubados durante 1 h a 37° C en medio RPMI en presencia o ausencia de 10 µg/ml de PGRP-S, PGRP-IαC o PGRP-IβN tratadas con polimixina (para eliminar el LPS contaminante) o, como controles, PGRPs, BSA o en medio solo.

#### **A. Determinación de actividad metabólica y daño de membrana**

Las distintas determinaciones fueron llevadas a cabo utilizando el kit comercial, Sytox-Green/Resazurina (BD Pharmingen). La Resazurina es una molécula incolora que al ser

reducida en el citoplasma de las células metabólicamente activa adquiere una coloración medible, mientras que el Sytox-Green es incorporado en las células cuando existe un daño en sus membranas. Para determinar el estado de las células, se tomaron 100  $\mu$ l de cada muestra las cuales se incubaron 15 min a 37° C con el agregado de Resazurina y Sytox-Green de acuerdo a las especificaciones del fabricante para luego llevar a cabo un análisis final por CF.

### **B. Análisis de apoptosis temprana**

Estos análisis fueron llevados a cabo utilizando el kit comercial, PE Annexin V Apoptosis Detection Kit I (BD Pharmingen). La Anexina reconoce la fosfatidilserina que se expone a la membrana extracelular en los procesos apoptóticos tempranos, mientras que la 7-Amino-Actinomicina (7-AAD) es incorporada a las células cuando existe un daño en sus membranas. Los procesos apoptóticos tempranos se corresponden a las células que resultan positivas para la Anexina y negativas para el 7-AAD. Para determinar el estado de las células, estas fueron lavadas 2 veces con buffer “binding” 1X, luego de las respectivas incubaciones, para posteriormente agregar 5  $\mu$ l de 7-AAD y 5  $\mu$ l de V Anexina PE a cada tubo. Como control de compensación se fijaron las células en paraformaldehído al 2% y se agregó 5  $\mu$ l de 7-AAD o de V Anexina PE respectivamente. El análisis final fue llevado a cabo por medio de CF.

### **C. Ensayo de proliferación celular**

Los ensayos de proliferación celular se realizaron con PBMCs o con células THP-1 ( $2 \times 10^5$ /well, en 1 ml de medio completo) cultivadas en presencia de PGN (10  $\mu$ g/ml), PGRPs (10  $\mu$ g/ml), PGN-PGRPs o BSA (control) durante 24-72 h. La actividad biológica, como indicador de proliferación celular, fue determinada con el ensayo del tetrazolium (MTT). Cada experimento fue repetido al menos 3 veces.

### **D. Determinación de citoquinas**

A partir de los SN de cultivos obtenidos en las distintas incubaciones determinamos por medio de ELISA (R & D Systems, Oxon, GB) los niveles de expresión de las CKs IL-8, IL-12, IL-10 y TNF- $\alpha$ , así como también de IL-1 $\beta$  e IL-6 utilizando sus respectivos kits comerciales (BD Pharmingen).

### **E. Expresión de marcadores de activación y complemento**

Para determinar la expresión diferencial de los distintos marcadores, las células fueron bloqueadas con una dilución 1/100 de suero normal de conejo durante 1 h a 4° C. Posteriormente lavamos 2 veces con PBS y las incubamos con los respectivos anticuerpos monoclonales específicos (AcMo): anti-CD11-PE-Cy5, anti-CD14-PE-Cy7, anti-CD80-FITC o anti-CD86-FITC, según las especificaciones del fabricante (BD Pharmingen), durante 1 h a 4° C. Luego lavamos 2 veces más y las resuspendimos en 200 ul de PBS. Los resultados se analizaron por CF.

### **Análisis estadísticos**

Los resultados fueron estadísticamente testeados por medio de ANOVA con el test de comparación múltiple de Dunnett o por T-test (Graph-Pad Prism, GraphPad Software, San Diego, CA). Los resultados fueron estadísticamente significativos para valores de  $p < 0.05$ .

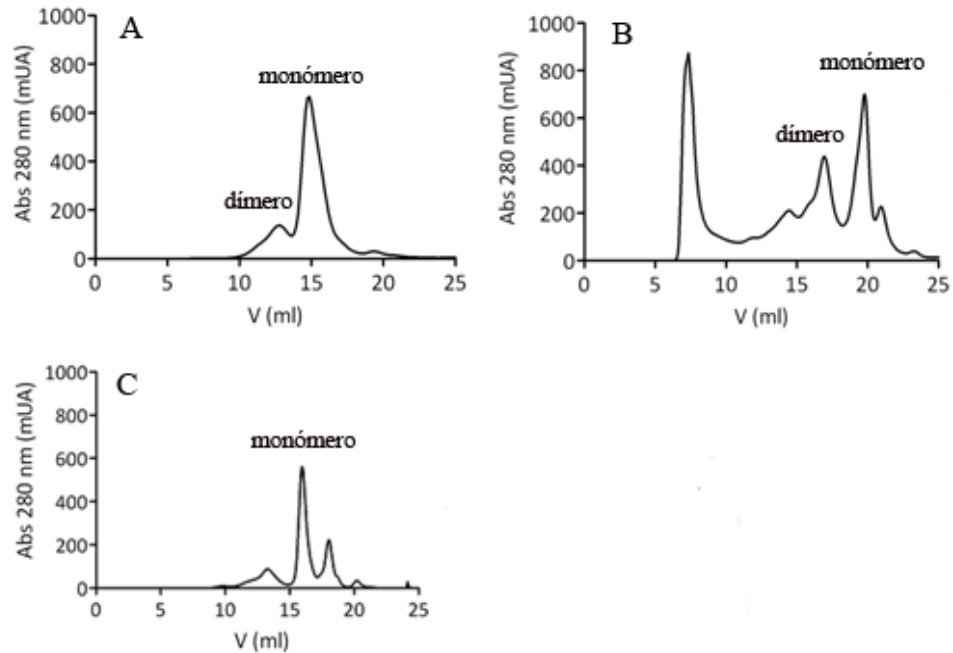


# Resultados

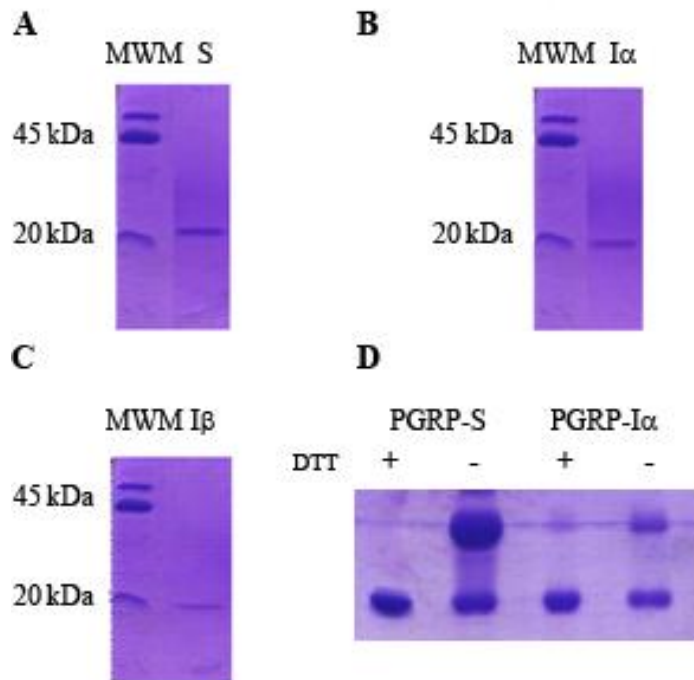
## Expresión y purificación de PGRPs recombinantes

Con el fin de caracterizar funcionalmente a las PGRPs, éstas se clonaron en el vector pT7-7 y se expresaron como CI en *E. coli* BL21 (DE3). Mediante SDS-PAGE se determinó que la inducción con IPTG efectivamente estimulaba la expresión de proteínas del peso molecular esperado (PM ~19600 Da para PGRP-S, ~18200 Da para PGRP-I $\alpha$  y ~17100 Da para PGRP-I $\beta$ ).

Luego de lisar las bacterias empleando sonicación, se lavaron extensivamente los CI obtenidos y se los solubilizó en guanidina 6 M. El rendimiento obtenido de proteína desnaturalizada, para ambas PGRPs, fue de 35-50 mg/L de cultivo. Los CI solubilizados en guanidina fueron diluidos en solución de replegado conteniendo arginina 1 M en presencia de la cupla cisteamina-cistamina para permitir la correcta formación de los puentes disulfuro. Luego del proceso de replegado se procedió a concentrar las muestras para su purificación, la que se realizó empleando una columna de exclusión molecular S-200 o S-75, mientras que la identidad y pureza de las proteínas se verificó por SDS-PAGE. Todas las PGRPs tuvieron un perfil de elución similar, observándose un primer pico de proteína que eluía en el  $V_0$  que no logró un plegamiento adecuado y se agregaba. Al estudiar este pico mediante SDS-PAGE, se desagregaban generando una banda de igual peso molecular que la proteína en estudio (resultados no mostrados). El perfil de elución obtenido para PGRP-S (S-200) presentó dos picos proteicos predominantes entre 12 y 16 ml (**Fig. 9A**), ambos con igual movilidad electroforética al analizarlos por SDS-PAGE en condiciones reductoras (**Fig. 10A**). Al purificar PGRP-I $\alpha$  (S-75) observamos dos picos de proteína entre 17 y 20 ml (**Fig. 9B**) que presentaron un comportamiento similar, por SDS-PAGE, al descrito para PGRP-S (**Fig. 10B**). Finalmente, el perfil de elución de PGRP-I $\beta$  (S-200) (**Fig. 9C**) mostró que solo el pico mayoritario (a los 16 ml) contenía proteínas con la movilidad electroforética esperada (**Fig. 10C**). El comportamiento de PGRP-S y PGRP-I $\alpha$  nos llevó a analizar las diferentes fracciones que presentaban PGRPs en condiciones no reductoras, observando mediante SDS-PAGE que ambas proteínas eran capaces de formar homodímeros, y que estos eran los responsables de los picos con menor volumen de elución en ambos cromatogramas (**Fig. 10D**).



**Figura 9.- Purificación de las PGRPs recombinates por exclusión molecular.** Perfil de elución de PGRP-S (A), PGRP-I $\alpha$  (B) y PGRP-I $\beta$  (C) por exclusión molecular. PGRP-S y PGRP-I $\beta$  fueron purificadas por medio de una columna S200 mientras que PGRP-I $\alpha$  fue purificada con una columna S75 y en todos los casos se detectó la presencia de proteínas a una DO de 280 nm.



**Figura 10.- Movilidad electroforética de las PGRPs purificadas y analizadas por SDS-PAGE.** Muestras de PGRP-S (A), PGRP-I $\alpha$  (B) y PGRP-I $\beta$  (C) fueron analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (DTT). SDS-PAGE de PGRP-S y PGRP-I $\alpha$  en presencia y ausencia de DTT (D).

El rendimiento final para todas las proteínas correctamente plegadas y purificadas fue de 0.5-1 mg/L de cultivo, suficiente para la realización de los ensayos planificados en el presente trabajo. Las PGRPs fueron conservadas diluidas hasta el momento de uso, donde se las concentró según lo requiriera el ensayo a realizar, ya que se observó que eran mucho más estables diluidas y se evitaba la generación de agregados o precipitados.

### Comportamiento hidrodinámico

Los perfiles de elución en columnas de exclusión molecular S75 y S200 (GE Healthcare, Uppsala, Suecia) rindieron picos homogéneos para las 3 PGRPs previamente purificadas, en presencia de DTT. La cromatografía de exclusión molecular es una técnica empleada para la determinación de las propiedades hidrodinámicas de las proteínas. Estas se separan de acuerdo a su radio hidrodinámico o  $R_s$ , que puede definirse como el radio de una esfera con el mismo coeficiente friccional que la proteína, lo que permite estimar el volumen real que ocupan las moléculas en solución. Los volúmenes de elución se interpolaron en curvas de calibración realizadas con patrones de peso molecular conocidos, obteniéndose los  $R_s$  experimentales en cada caso. Los  $R_s$  teóricos se calcularon utilizando la ecuación descripta por Uversky [Uversky 1993]. En la **Tabla 1** se muestran los perfiles de elución en columnas de exclusión molecular para las proteínas en estudio, junto con los PM, los  $R_s$  experimentales y los  $R_s$  teóricos. En todos los casos los  $R_s$  experimentales son cercanos a los teóricos.

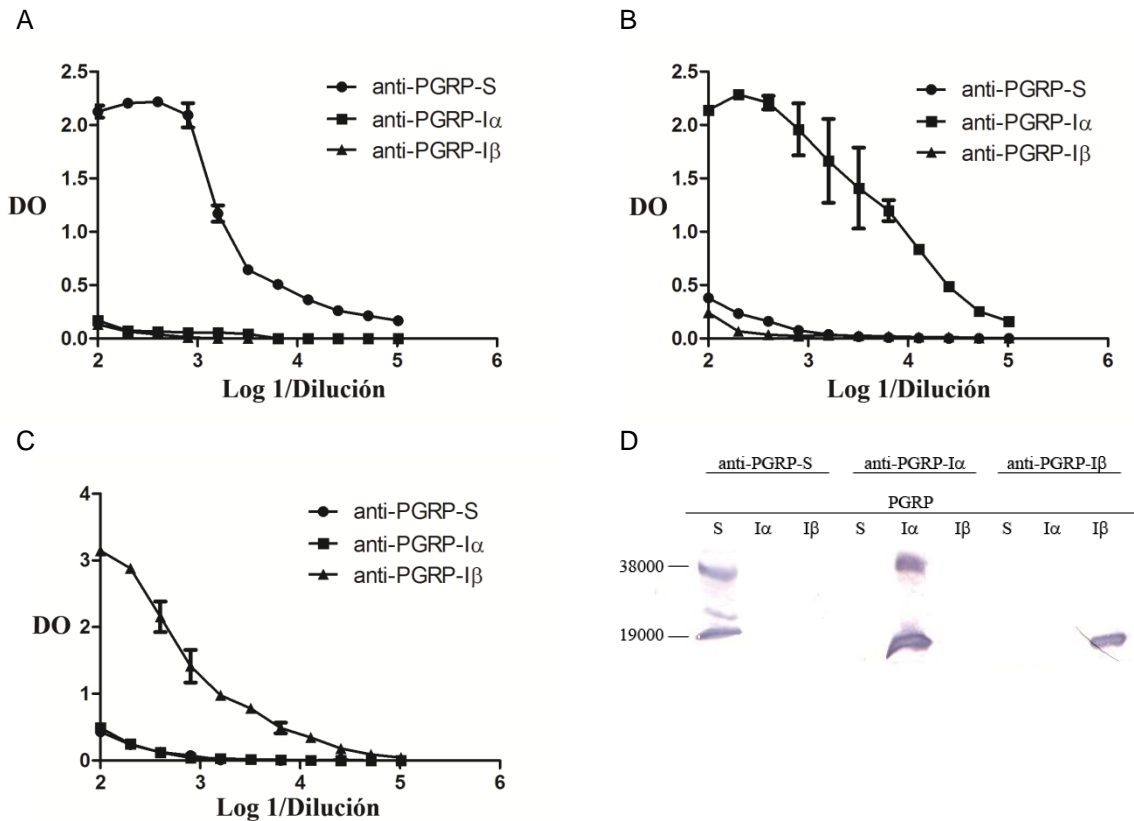
**Tabla 1. Comportamiento hidrodinámico de las proteínas en estudio analizado por cromatografía de exclusión molecular.**

Proteína	Peso molecular (kDa)	Volumen elución	$R_s$ teórico (Å)	$R_s$ experimental (Å)
PGRP-S*	19566	13.45	20.33	19.14
PGRP-I $\alpha$ ‡	18122	16.70	20.30	20.05
PGRP-I $\beta$ *	17068.27	16.10	19.95	18.89

‡Superdex 75; \*Superdex 200

**Antisueros generados en ratones y conejos**

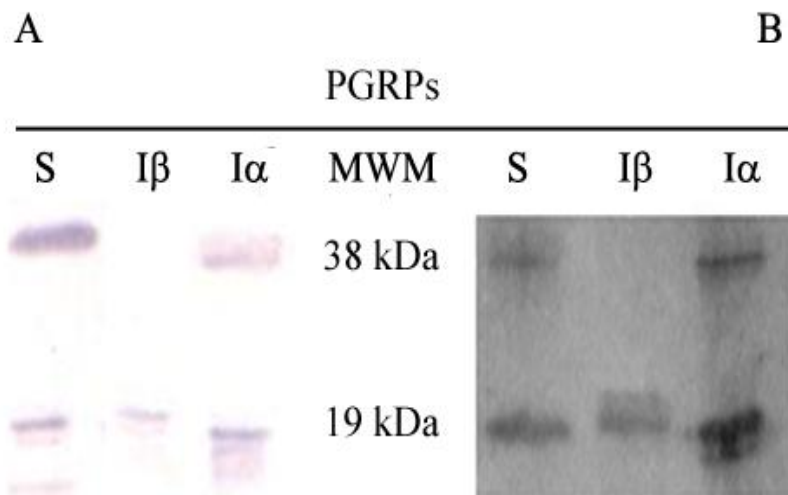
Con el fin de determinar la presencia de PGRPs en diferentes muestras biológicas generamos en nuestro laboratorio diferentes antisueros de ratón y de conejo específicos contra las PGRPs recombinantes producidas. El título de los sueros hiperinmunes fue determinado por ELISA, siendo de 25600, 102400 y 45500 para los antisueros anti-PGRP-S, anti-PGRP-I $\alpha$  y anti-PGRP-I $\beta$  respectivamente, generados en ratones, y de 25600, 51200 y 32100 para los generados en conejos. Estos antisueros también reconocen a los Ags que los generaron por inmunoblotting. Además, observamos que los sueros obtenidos eran específicos para sus respectivos Ags, sin presentar reactividad cruzada con las otras PGRP ni con lisozima, ya sea por ELISA o por inmunoblotting (**Fig. 11**).



**Figura 11.- Especificidad de los anticuerpos anti-PGRPs.** Determinación por ELISA de los títulos de Acs específicos presentes en los sueros anti-PGRP-S, anti-PGRP-I $\alpha$  y anti-PGRP-I $\beta$  usando como Ags sensibilizantes PGRP-S (A), PGRP-I $\alpha$  (B) y PGRP-I $\beta$  (C). Para el análisis por inmunoblotting se usó la dilución de antisuero con la mejor relación de señales específicas/inespecíficas (D).

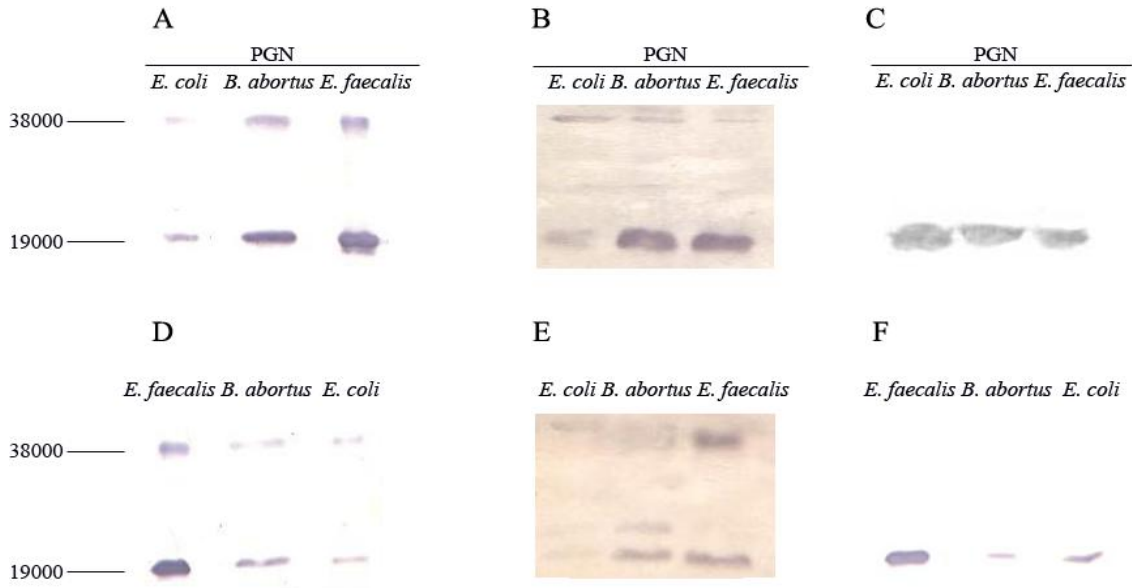
**Las PGRPs recombinantes son proteínas biológicamente activas**

Las proteínas recombinantes eucariotas expresadas en bacterias presentan pequeñas modificaciones que las diferencian de las proteínas nativas, entre ellas carecen de glicosilación. Para determinar si estas variaciones alteran o no la capacidad de las PGRPs recombinantes de unirse a bacterias y a sus respectivos PGN, realizamos incubaciones de *S. aureus* con 10 µg/ml de PGRP-S, PGRP-Iα o PGRP-Iβ (**Fig. 12A**). Observamos que todas las proteínas recombinantes mantenían su actividad biológica al unirse a las bacterias. Posteriormente, y con el fin de analizar si esta unión se debía a la interacción que estas proteínas tienen con PGN se realizó el mismo ensayo reemplazando las bacterias por PGN insoluble. El precipitado obtenido fue analizado por immunoblotting demostrando que todas las PGRPs no sólo se unían a *S. aureus* sino que también se unían a PGN como se describiera para las proteínas nativas (**Fig. 12B**).



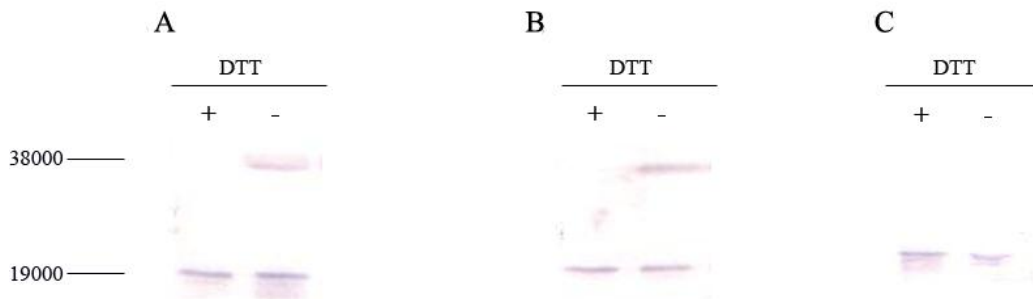
**Figura 12.- Determinacion de la funcionalidad de las PGRPs recombinantes.** Immunoblottings de PGRPs recombinantes precipitadas con *S. aureus* (A) o con PGN de *S. aureus* (B).

Al repetir ambos ensayos con distintas especies bacterianas (*E. faecalis*, *E. coli* o *B. abortus*) obtuvimos los mismos resultados (**Fig. 13**).



**Figura 13.- Determinación de la funcionalidad de las PGRPs recombinantes.** Immunoblotting de PGRPs precipitadas con PGN de *E. faecalis*, *E. coli* o *B. abortus* (A-C) o con *E. faecalis*, *E. coli* o *B. abortus* (D-F). A y D: PGRP-S; B y E: PGRP-I $\alpha$ ; C y F: PGRP-I $\beta$ .

Así mismo, observamos que tanto la PGRP-S como la PGRP-I $\alpha$  actúan no sólo como monómeros sino también como dímeros, lo que se evidenció mediante immunoblotting empleando los antisueros específicos luego de la precipitación con bacterias o PGN (Fig. 14).



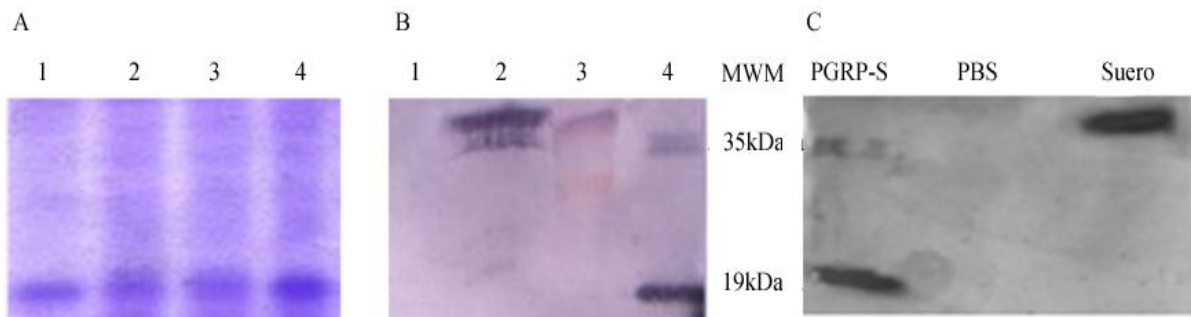
**Figura 14.- Determinación de la funcionalidad de los dímeros de PGRPs recombinantes.** Immunoblotting de PGRP-S (A), PGRP-I $\alpha$  (B) y PGRP-I $\beta$  (C) precipitadas con *S. aureus* en presencia y ausencia de DTT.

### Identificación de PGRPs en muestras biológicas

Dado que la localización de las PGRPs no se encuentra aún completamente esclarecida, analizamos la posible presencia de PGRPs en diferentes tipos celulares y en distintas muestras biológicas.

Para ello, agregamos PGN insoluble a muestras de saliva humana y analizamos la presencia de PGRP. Por SDS-PAGE observamos, la presencia de una banda que correspondería al monómero de PGRP-S (**Fig. 15A**), la que no esta presente al analizar las muestras por Immunobloting con el antisuero específico, en donde solamente se detecta una banda de 45 kDa (**Fig. 15B**). Estos resultados sugieren que la banda observada por SDS-PAGE no corresponde al monómero de PGRP-S sino a la lisozima, una proteína que también reconoce PGN y que tiene un peso molecular similar al de la PGRP-S de 20kDa. PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  no fueron detectadas en ninguna de las muestras de saliva estudiadas.

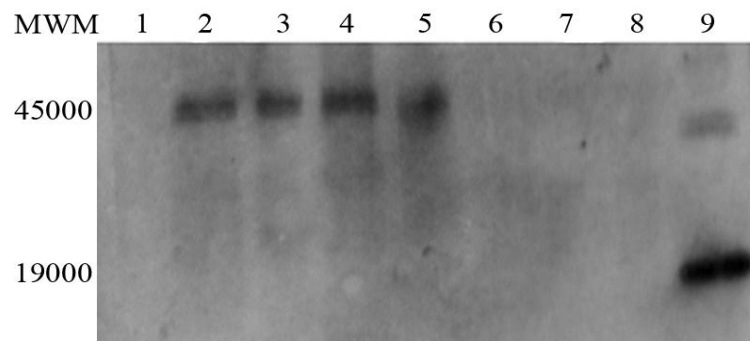
Al estudiar las muestras de suero empleando la misma metodología, detectamos una banda de 45 kDa, que reacciona con el suero de conejo anti-PGRP-S, coincide en PM con el dímero de PGRP-S y precipita con PGN insoluble, hechos que demostraban que estábamos en presencia de una proteína con funcionalidad de PGRP. No se detectaron monómeros de esta proteína (**Fig. 15C**). Por otro lado, no observamos ninguna banda al emplear como primer Ac el antisuero anti-PGRP-I $\alpha$  o anti-PGRP-I $\beta$ .



**Figura 15.- Identificación de PGRP-S en saliva y sueros humanos.** (A) SDS-PAGE de muestras de saliva precipitadas con PGN (calles 1 a 3) y control de lisozima comercial (calle 4). (B) Immunobloting de muestras de saliva precipitadas con PGN. Calle: 1- PBS, 2- muestra de saliva concentrada, 3- MWM, 4- PGRP-S recombinante. (C) Immunobloting de muestras de suero precipitadas con PGN. Calle: 1- PGRP-S recombinante, 2- PBS y 3- Suero humano.

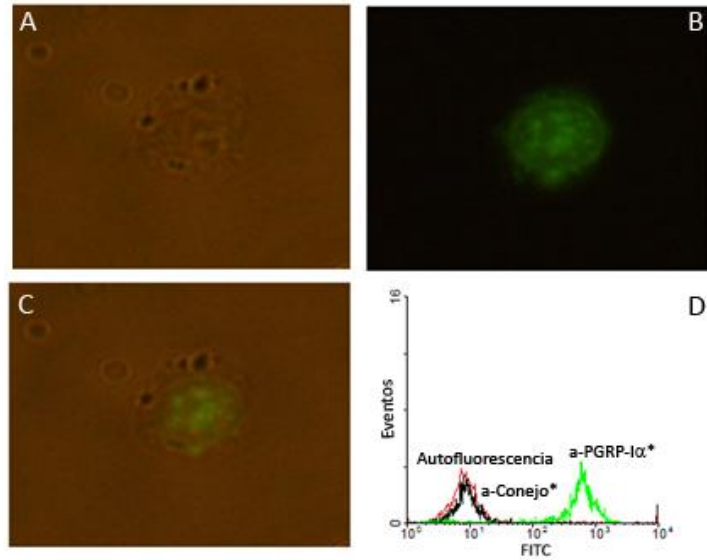


También analizamos la presencia de PGRP-S en gránulos de neutrófilos. Para ello, inducimos la degranulación de los PMN con FMLP y analizamos mediante inmunoblotting tanto las células como el SN de cultivo concentrado a diferentes tiempos pos-inducción de la degranulación (**Fig. 16**), observándose tanto en las células que aún no fueron inducidas a degranular como en los SN de PMN luego de degranular, una banda de ~45 kDa. La PGRP de los PMN puede ser también precipitada con PGN insoluble como ocurre con la proteína detectada en suero. Por otro lado, al repetir el ensayo y analizar las muestras por inmunoblotting empleando como primer Ac el antisuero anti-PGRP-I $\alpha$  o anti-PGRP-I $\beta$  no observamos ninguna banda.

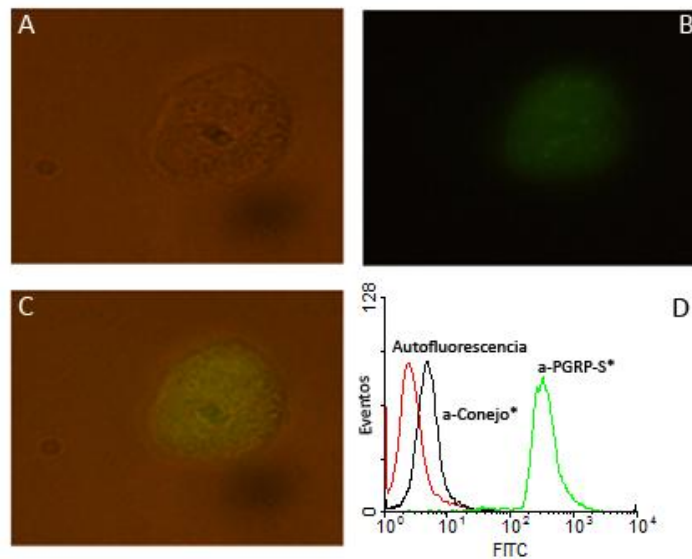


**Figura 16.- PGRP-S en PMN.** SN y pellet de PMN inducidos con FMLP a diferentes tiempos (min). Calle 1- SN sin inducción, 2-3- SN inducidos a 15 y 45 min., 4- SN inducidos y precipitados con PGN, 5- PMN no inducidos, 6-7- PMN inducidos a 15 y 45 min., 8-SN de PMN no inducidos precipitado con PGN, 9- PGRP-S recombinante.

En otro orden, detectamos por medio de CF e IFD, empleando los distintos antisueros de conejo anti-PGRPs purificados y marcados con FITC, que células epiteliales alveolares de la línea A-549 expresan PGRP-I $\alpha$  (**Fig. 17**) y que los monocitos de la línea THP-1 expresan PGRP-S (**Fig. 18**). El resto de los ensayos realizados con otras líneas celulares o cultivos primarios resultaron negativos en las condiciones ensayadas.

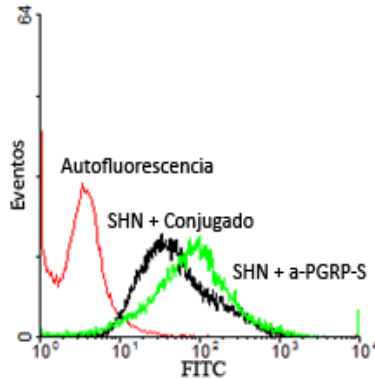


**Figura 17.-** Detección de PGRP-I $\alpha$  en células de la línea A549 por microscopía de fluorescencia y por CF. Célula epitelial observada bajo luz blanca (A), bajo fluorescencia (B), y superposición de las imágenes A y B (C). Aumento de la señal correspondiente PGRP-I $\alpha$  en células de la línea A549 (D).



**Figura 18.-** Detección de PGRP-S en células de línea THP-1 por microscopía de fluorescencia y por CF. Monocito observado bajo luz blanca (A), bajo fluorescencia (B), y superposición de las imágenes A y B (C). Aumento de la señal correspondiente a PGRP-S y PGRP-I $\alpha$  en células de la línea THP-1 (D).

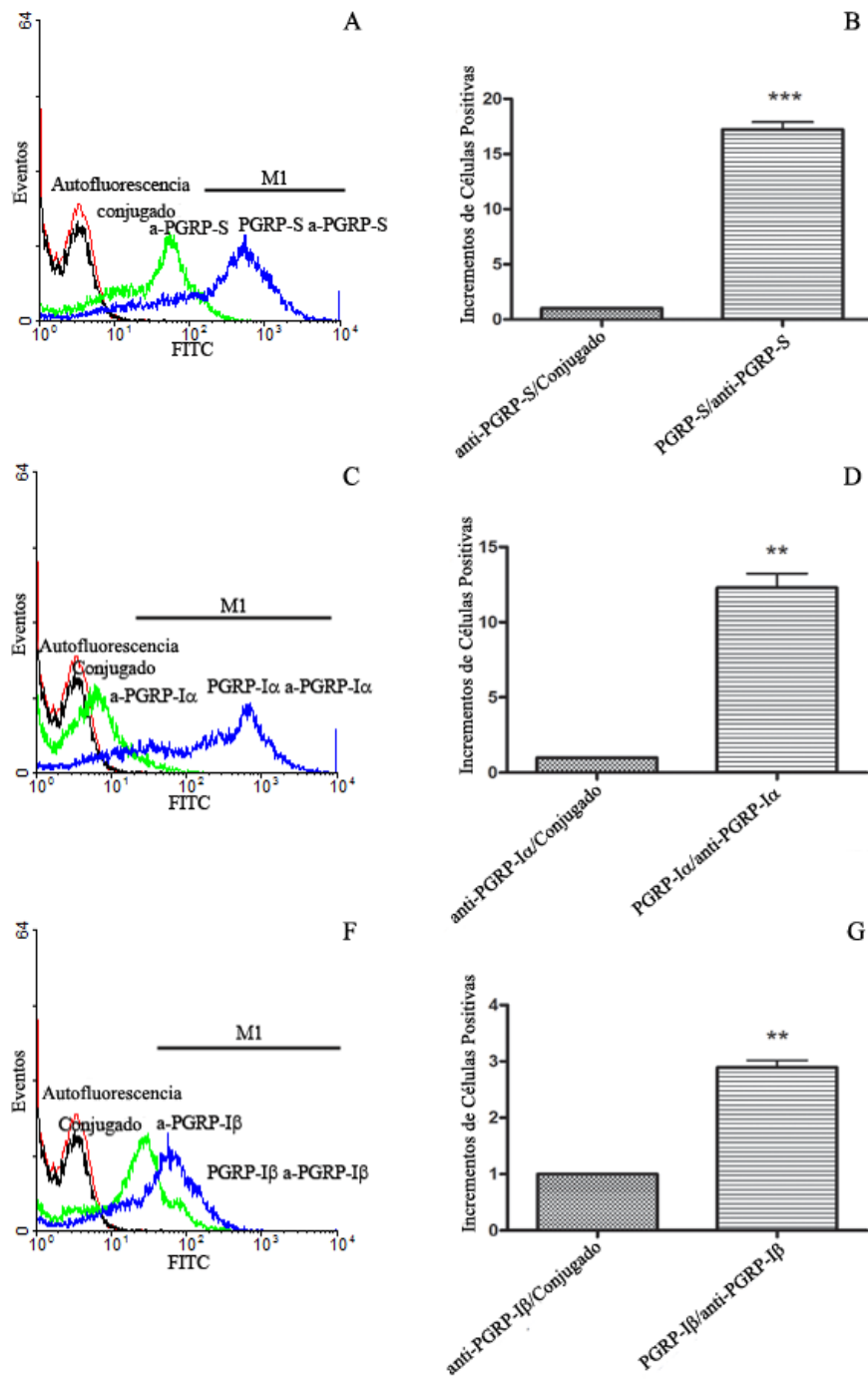
Debido a que PGRP-S se encuentra presente en suero, realizamos incubaciones de PBMCs con SHN ON a 4 °C para detectar la posible interacción de la PGRP-S presente en suero con dichas células. De esta forma, observamos por CF que al utilizar Acs anti-PGRP-S específicos la intensidad de la señal fluorescente aumentaba con respecto a los controles (**Fig.19**) lo que indicaría la posibilidad que PGRP-S se una a la membrana de las células mononucleares.



**Figura 19.- Interacción de PGRP-S con PBMCs.** Se observó por CF que la PGRP-S presente en SHN se uniría a células mononucleares. La detección se llevó a cabo empleando Acs específicos. Rojo: Autofluorescencia, Negro: Control de unión inespecífica, Verde: Unión de PGRP-S de SHN.

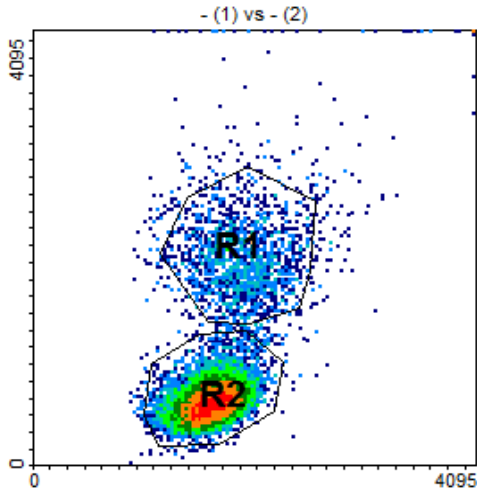
### Las PGRPs son reconocidas y endocitadas por monocitos

Estudiamos si las PGRPs pueden ser reconocidas por algún tipo celular implicado en la RI y la presencia de posibles receptores celulares para estas proteínas. Para ello, analizamos la unión de PGRPs a los PBMCs por CF empleando los antisueros específicos para cada PGRP generados en conejo y empleando un conjugado anti-conejo-FITC como segundo Ac. Observamos que todas las PGRPs ensayadas se unen a los PBMCs, siendo PGRP-S y PGRP-Iα las que resultan en un número mayor de células positivas demostrando incrementos de 12-17 veces respecto a los controles de células no tratadas con PGRPs pero incubadas con Acs específicos (**Fig. 20**).



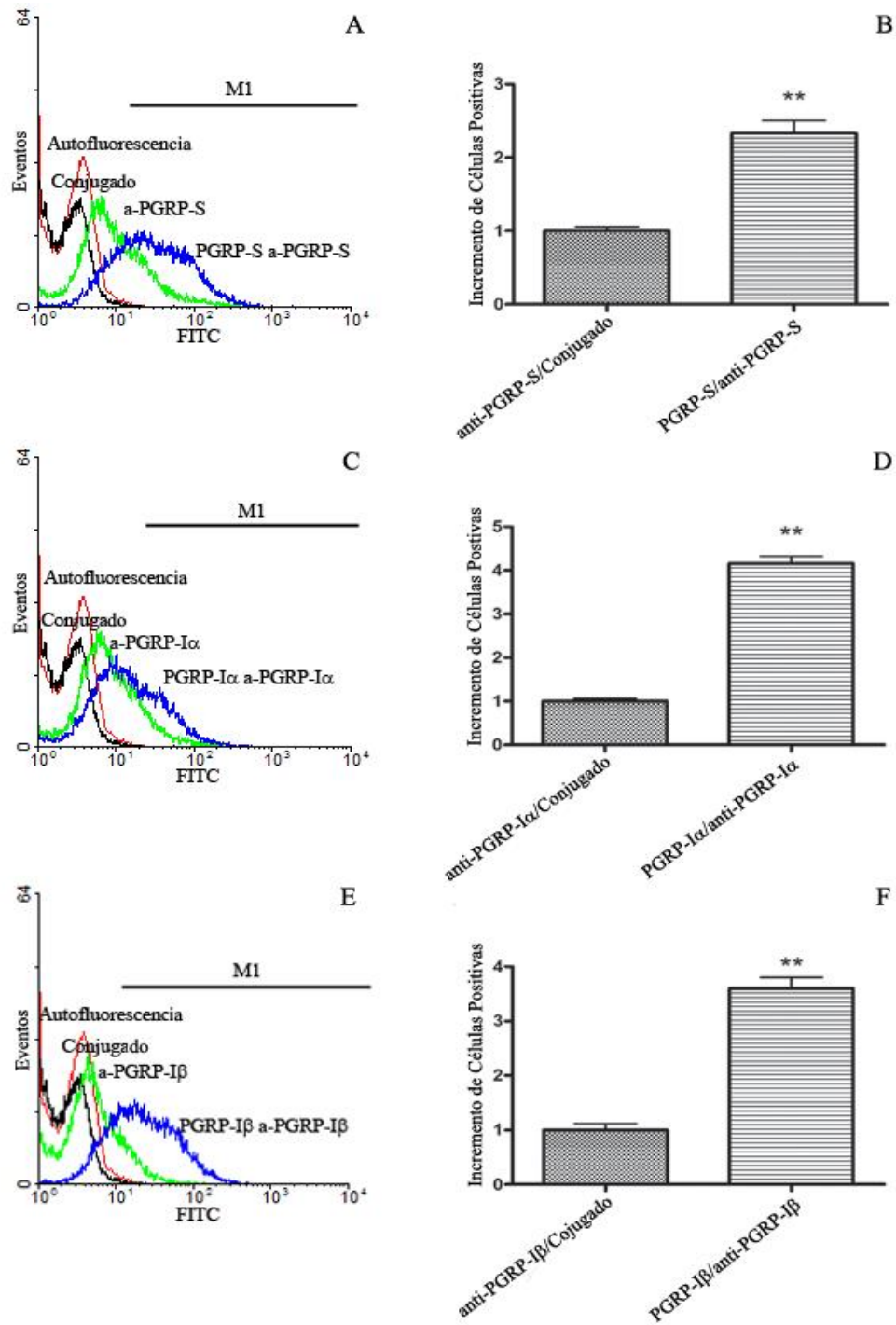
**Figura 20. Unión de las PGRPs a PBMCs.** Para estudiar si las PGRPs podrían actuar como unión entre el reconocimiento de PGN y la señalización intracelular, analizamos la unión de PGRP-S (A-B), PGRP-Iα (C-D) y PGRP-Iβ (E-F) a PBMCs con sus receptores Fc previamente bloqueados con suero humano por CF. La presencia de las PGRPs fue analizada empleando un suero de conejo anti-PGRP y un conjugado anti-conejo-FITC. Los resultados de fueron analizados como el % de células positivas presentes en la región M1 de las células tratadas con PGRPs/células no tratadas. \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ . La figura muestra un experimento representativo de 3 o 4.

Al realizar un análisis selectivo de los datos obtenidos, de las poblaciones de linfocitos y monocitos por separado, se observó que las PGRPs se unían preferentemente a los monocitos (**Fig. 21**).



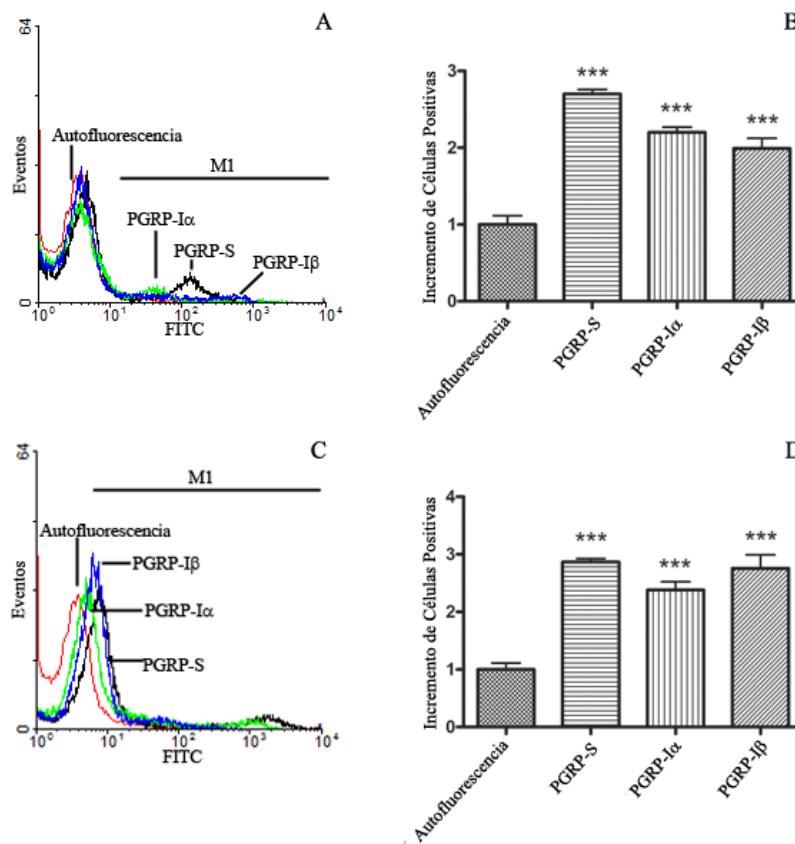
**Figura 21.-** Regiones correspondientes a monocitos y a linfocitos en una población de células mononucleares. A partir del Dot Plot FSC vs SSC de los PBMCs dos subpoblaciones celulares se definen como **R1**, que corresponde a los monocitos, y **R2**, que corresponde a los linfocitos.

Con el objetivo de confirmar estos resultados, repetimos los experimentos detallados anteriormente pero estudiando la unión de las PGRPs a la línea celular de monocitos/macrófagos humanos THP-1 con resultados similares. Determinamos que tanto PGRP-S, PGRP-I $\alpha$  como PGRP-I $\beta$  se unían a las células THP-1 de forma comparable con incrementos entre 2-4 veces respecto a los controles de células no tratadas con PGRPs pero incubadas con los Acs específicos (**Fig. 22**).



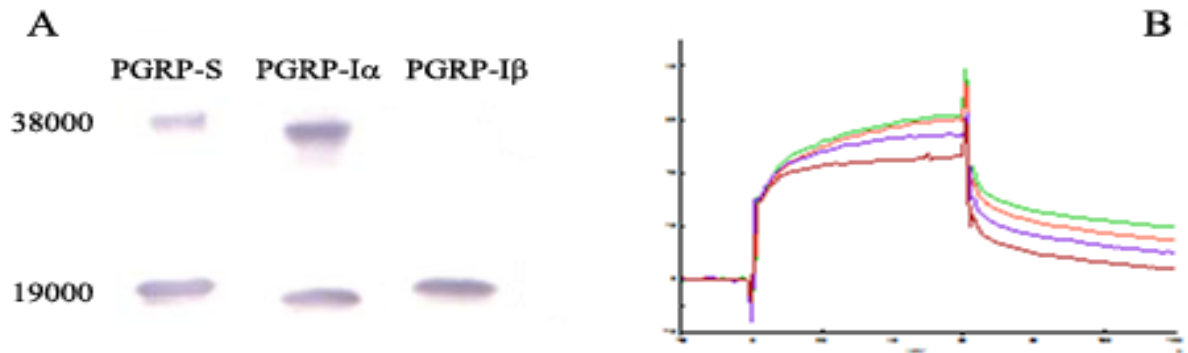
**Figura 22.- Unión de las PGRPs a células THP-1.** Para estudiar si las PGRPs podrían actuar como puente entre el reconocimiento de PGN y la señalización intracelular, analizamos la unión de PGRP-S (A-B), PGRP-Iα (C-D) y PGRP-Iβ (E-F) a monocitos/macrófagos de la línea celular THP-1 por CF. La presencia de las PGRPs fue analizada empleando un suero de conejo anti-PGRP y un conjugado anti-conejo-FITC. Los resultados de fueron analizados como el % de células positivas presentes en la región M1 de las células tratadas con PGRPs/células no tratadas. \*\*p< 0.01. La figura muestra un experimento representativo de 3 o 4.

Además, empleamos a las PGRPs marcadas con FITC para eliminar cualquier tipo de interacción de las IgG de los antisueros específicos con las células THP-1 y de esta manera evitar resultados falsos positivos. Células THP-1 tratadas con VD3 fueron incubadas con PGRPs-FITC a 4 y 37° C para inhibir y permitir la fagocitosis, respectivamente. Observamos a 4° C que el número de células positivas en la región M1 para todas las PGRPs se incremento entre 2-3 veces (100-200%) respecto a los controles de células no tratadas con PGRP-FITC, indicando que la unión a la membrana de los monocitos es específica (**Fig. 23A**). Para determinar si las PGRPs son internalizadas luego de unirse a la membrana celular, analizamos el resultado de los ensayos realizados a 37° C por CF en presencia de Trypan Blue, para apagar la fluorescencia extracelular. Encontramos un incremento entre 2-3 veces en la señal de fluorescencia del FITC para las células tratadas con PGRPs-FITC respecto a los controles no tratados (100-200%), sugiriendo que efectivamente la internalización ocurre luego de la unión (**Fig. 23B**).



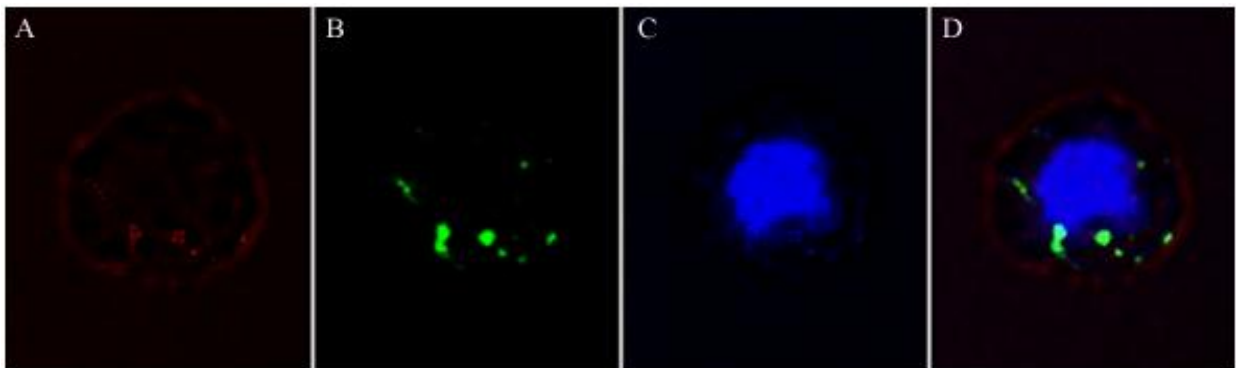
**Figura 23- Unión y fagocitosis de PGRPs-FITC por parte de monocitos THP-1.** La unión de PGRP-S-FITC, PGRP-Iα-FITC y PGRP-Iβ-FITC a células THP-1 a 4° C (**A-B**) y a 37° C en presencia de Trypan Blue (**C-D**) fue determinada por CF. \*\*\*p < 0.001. La figura muestra un experimento representativo de 3.

Los ensayos de inmunoblotting de células THP-1 previamente incubadas con PGRPs usando los Acs de conejo anti-PGRPs como primer Ac confirmaron que las PGRPs se unen a los monocitos THP-1 (**Fig. 24A**). Por otra parte verificamos esta unión por medio de SPR, inmovilizando la PGRP-I $\alpha$  (~100  $\mu$ g/ml) (**Fig. 24B**) en un equipo BIAcore.



**Figura 24- Unión de las PGRPs a monocitos.** Células THP-1 fueron incubadas con PGRPs a 4 °C y analizadas por inmunoblotting empleando los antisueros anti-PGRPs específicos (**A**). Sensograma por SPR de la interacción de PGRP-I $\alpha$  con monocitos (**B**)

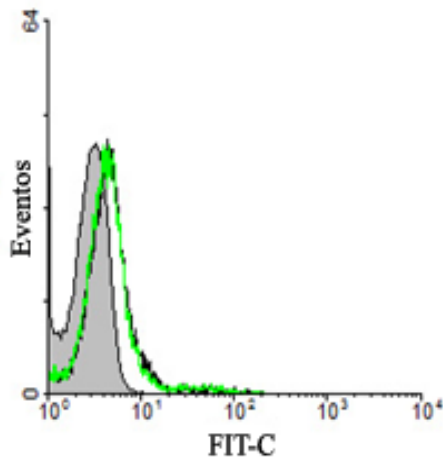
La internalización de PGRP-S-FITC por las células THP-1 fue también observada por microscopía de fluorescencia (**Fig. 25**).



**Figura 25- Unión y fagocitosis de PGRPs-FITC por parte de monocitos.** Imágenes de células incubadas con PGRPs-FITC en presencia de DiD y DAPI.

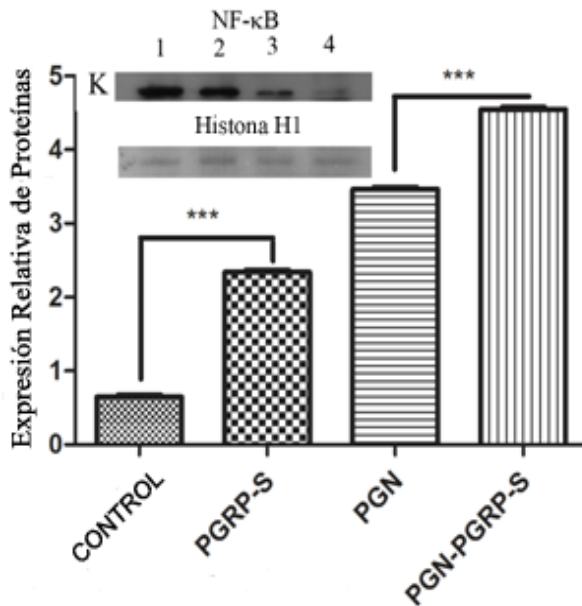
La presencia de Wortmanina, inhibidor de PI3K, en los cultivos, no redujo la incorporación de PGRPs por las células THP-1 (**Fig. 26**). Estos resultados sugieren que la macropinocitosis no jugaría un rol preponderante en la endocitosis de PGRPs por monocitos.





**Figura 26.- Incorporación de PGRP-S por células THP-1 y analizadas por CF.** Gris: Autofluorescencia; Negro: incorporación en ausencia de Wortmanina, Verde: incorporación en presencia de Wortmanina, el resto de las PGRPs mostraron un comportamiento similar.

Para estudiar si las PGRPs podrían actuar como un puente o “link” entre el reconocimiento de PGN y la señalización intracelular, analizamos la expresión de NF-κB en células THP-1. En la **Figura 27** podemos observar que las PGRPs incrementan los niveles de expresión de NF-κB con respecto a los controles así como también lo hacen los complejos PGRP-PGN respecto a los controles de células tratadas con PGN.

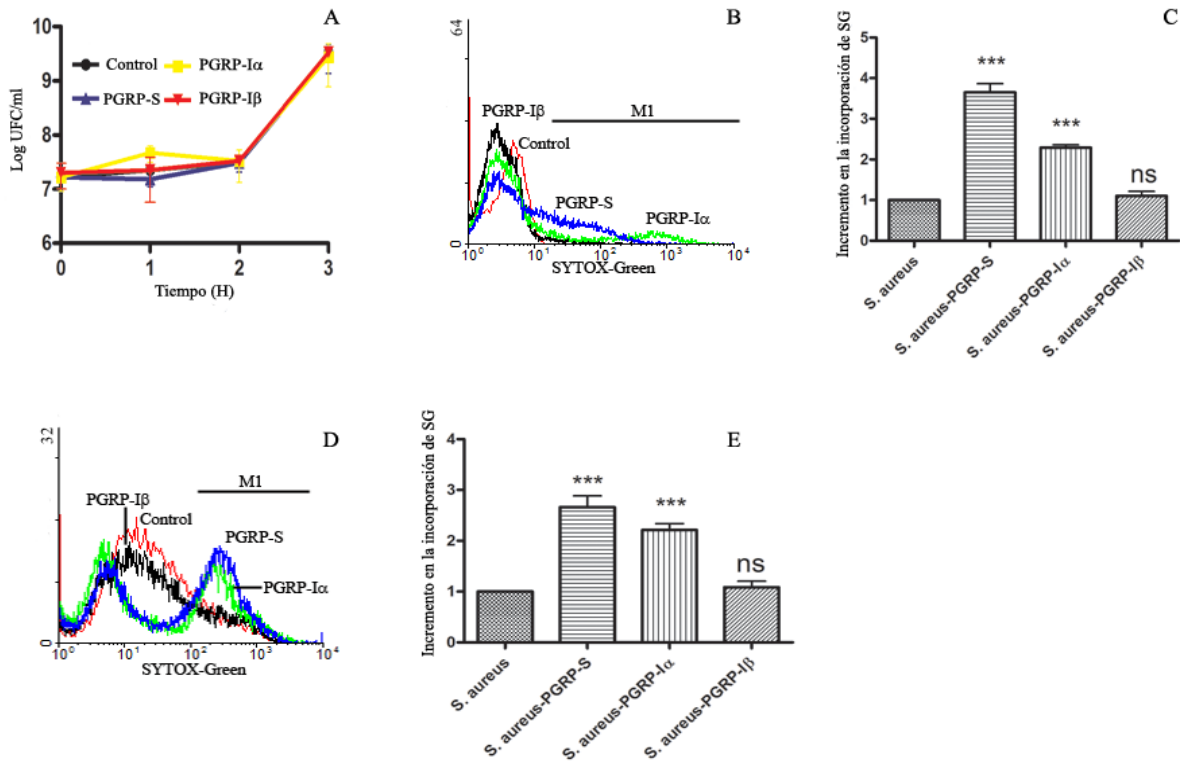


**Figura 27.- Expresión de NF-κB nuclear.** Para determinar la expresión diferencial de NF-κB se incubaron células THP-1 frente a distintos estímulos, utilizando como control de expresión basal la proteína Histona H1. Las muestras fueron analizadas por inmunoblotting observándose un aumento en la expresión de NF-κB en los tratamientos con PGRP-S respecto a sus controles correspondientes. \*\*\*p< 0.001.

### Las PGRPs recombinates no tienen actividad bactericida ni bacteriostática

Con el fin de determinar si las PGRPs humanas tienen actividad bacteriostática o bactericida, *S. aureus*, *E. faecalis*, *E. coli* y *B. abortus* ( $10^8$  UFC/ml) fueron cultivadas en RPMI con SFB durante 1-3 h en presencia de las PGRPs (10  $\mu$ g/ml). Los controles fueron realizados de forma similar pero en ausencia de PGRPs. Las UFC/ml de las diferentes bacterias empleadas fueron analizadas mediante el método de conteo en placa, con intervalos de una hora, observando resultados similares tanto en los cultivos con o sin PGRPs (**Fig. 28A**). Tampoco encontramos diferencias significativas en los cultivos de 24-48 h.

Luego, analizamos si las PGRPs eran capaces de generar daño en la membrana de las bacterias. Para ello empleamos el ensayo de marcación con Sytox-Green, un marcador fluorescente que solo puede pasar a través de las membranas si es que estas están dañadas para luego unirse al ADN. Observamos que PGRP-S produce un nivel bajo de daño en la membrana bacteriana luego de 1 h de exposición, y que PGRP-I $\alpha$  comienza a generar injuria en la membrana luego de las 2 h de incubación. Sin embargo, un fuerte incremento en la incorporación de Sytox-Green, determinada como el número de células positivas presentes en la región M1 para el ensayo/número de células positivas en la región M1 para los controles, fue detectada luego de 3 h de cultivo, para ambas, PGRP-S y PGRP-I $\alpha$  en comparación con los controles (**Fig. 28B-C**). No detectamos daño en la membrana cuando las bacterias fueron incubadas con PGRP-I $\beta$  en las diferentes condiciones ensayadas. Resultados similares fueron obtenidos al repetir estos experimentos en ausencia de SFB (**Fig. 28D-E**).



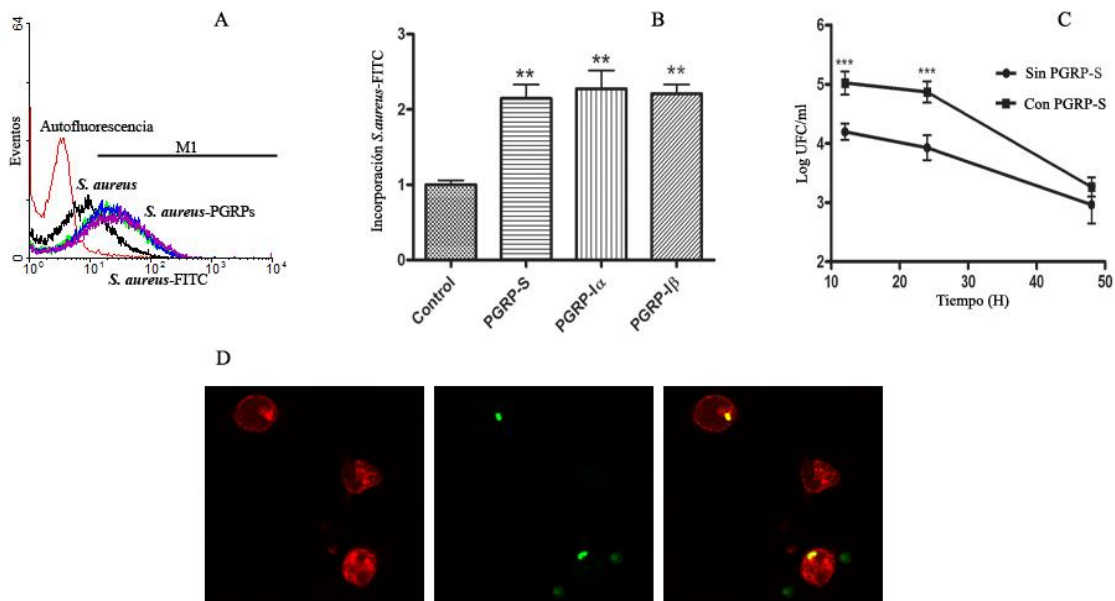
**Figura 28- Efecto de las PGRPs sobre *S. aureus*.** Se realizaron cultivos de *S. aureus* (10<sup>8</sup>/ml) en presencia o ausencia de PGRPs (10 µg/ml) y se determinó las UFC/ml resultantes para analizar la actividad bactericida o bacteriostática (A). Incorporación del marcador fluorescente Sytox-Green por *S. aureus* cultivados durante 3 h en presencia o no de PGRPs y analizados por CF (B-C). Analizamos el incremento en la incorporación de Sytox-Green como el % de bacterias tratadas con PGRPs presentes en la región M1/% de bacterias no tratadas con PGRPs presentes en la región M1. Se repitió el mismo experimento en ausencia de SFB en el medio de cultivo (D-E). \*\*\*p< 0.001.

## Las PGRPs incrementan la actividad fagocítica y la eliminación de bacterias

Con el fin de estudiar si las PGRPs modifican la actividad fagocítica de las bacterias por los monocitos/macrófagos, 10<sup>6</sup> células THP-1 fueron cultivadas con *S. aureus*-FITC muertos por calor (10<sup>8</sup> UFC) previamente tratados o no con PGRPs (10 µg/ml). El análisis de los resultados obtenidos por CF mostraron que la habilidad de los monocitos para fagocitar *S. aureus* en presencia de cualquiera de las PGRPs estudiadas se incrementa ~130% (Fig. 29A). El mismo experimento fue realizado empleando PGN-FITC (20 µg) en vez de *S. aureus* con resultados similares (Tabla 2).

Para determinar el efecto que este hecho tenía sobre las bacterias infectivas, usamos como modelo la infección de monocitos por *S. aureus*. Co-cultivamos las células THP-1, durante 1 h, con *S. aureus* pretratados o no con PGRP-S a una multiplicidad de infección de 100

(bacterias/monocitos). Las células THP-1 infectadas fueron lavadas y suspendidas en RPMI con gentamicina. Después de realizar incubaciones a diferentes tiempos, se removió el antibiótico y las células infectadas fueron lisadas con 2% Triton X100 en PBS. La determinación de las UFC de las bacterias intracelulares viables fue realizada mediante la técnica de conteo en placa. La **Figura 29C** muestra que a las 12 h el número de bacterias vivas incorporadas en presencia de PGRP-S es 10 veces superior que en ausencia de la misma, lo que está en concordancia con la incorporación de las bacterias muertas en el ensayo previo. A las 24 h las células THP-1 solo pudieron reducir el número de bacterias vivas en su interior en una pequeña proporción, independientemente de la presencia o no de PGRP-S. Sin embargo, para las 48 h de cultivo las células THP-1 que incorporaron bacterias con PGRP-S fueron capaces de eliminar 10 veces más bacterias que aquellas que las incorporaron sin PGRP-S. Adicionalmente, observamos que las bacterias previamente incubadas con PGRPs-FITC y fagocitadas por los monocitos/macrófagos colocalizan con el marcador de organelas ácidas (fagolisosoma) Lyso Tracker red.

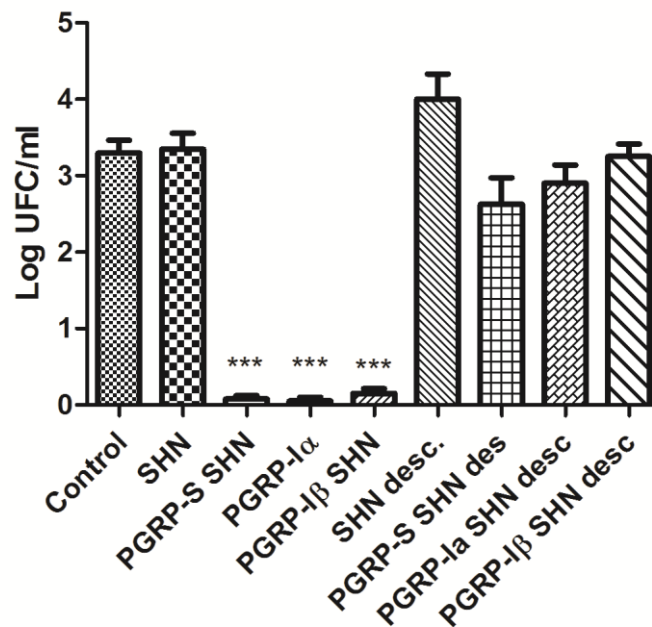


**Figura 29.- Efecto de las PGRPs sobre la incorporación de *S. aureus* por monocitos/macrófagos.** Ensayos de fagocitosis de *S. aureus*-FITC por células THP-1 en ausencia (negro) o presencia de PGRP-S (verde), PGRP-1α (azul) o PGRP-1β (violeta) (A-B). Analizamos por CF el % de células positivas presentes en la región M1 de los cultivos en presencia de PGRPs-*S. aureus*-FITC/células cultivadas con *S. aureus*-FITC (control). Estudios de infección en THP-1 por *S. aureus* pre incubado con PGRPs durante 48 h (C). Imagen de microscopía confocal de células THP-1 incubadas con *S. aureus*-PGRP-FITC y posteriormente marcadas con Lyso Tracker Red (D). La figura muestra un experimento representativo de 3. \*\*p< 0.01, \*\*\* p< 0.001

**Tabla 2. Fagocitosis diferencial de PGN marcado con FITC por monocitos THP-1.**

	% de células positivas en la región M1	Aumento relativo de la señal respecto al control Basal.	Aumento relativo de la señal respecto al control PGN
Basal	2.2	1	-
PGN	8.6	3.9	1
PGN/PGRP-S	17.9	8.13	2.08
PGN/PGRP-I $\alpha$	29.1	13.22	3.38
PGN/PGRP-I $\beta$	20.5	9.31	2.38

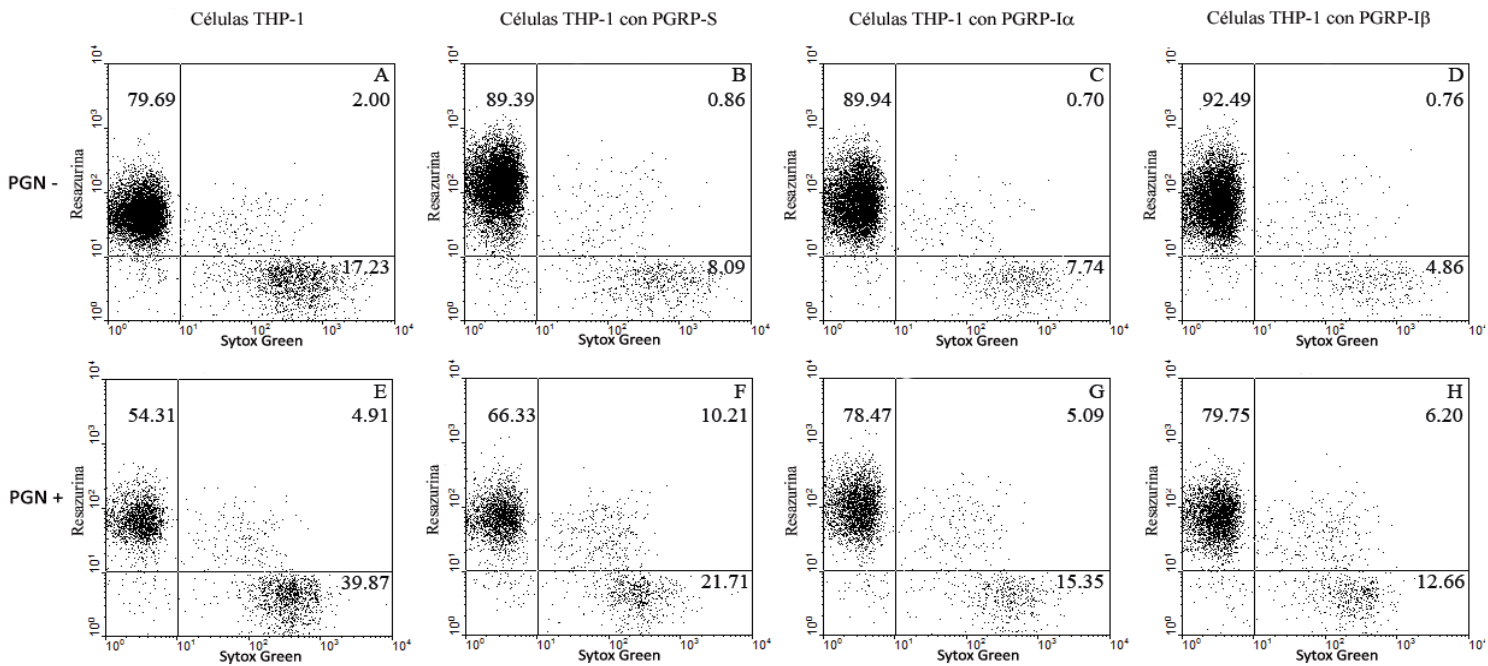
Por otro lado, al realizar experimentos similares pero empleando en el medio de cultivo SHN fresco, se observó una completa eliminación de *S. aureus* del interior de las células a las 72 h post infección. lo que no sucede en los controles respectivos o cuando se emplea el SHN descomplementado (**Fig. 30**).



**Figura 30.- Estudio de infección en presencia de suero humano.** Se realizaron cocultivos de células THP-1 con *S. aureus* en presencia de PGRPs durante 72 h en presencia o ausencia de SHN fresco o descomplementado. Luego se lisaron las células y se determinó las UFC/ml en cada muestra. La figura muestra un experimento representativo de 3. \*\*\* p< 0.001.

### Función protectora de las PGRPs

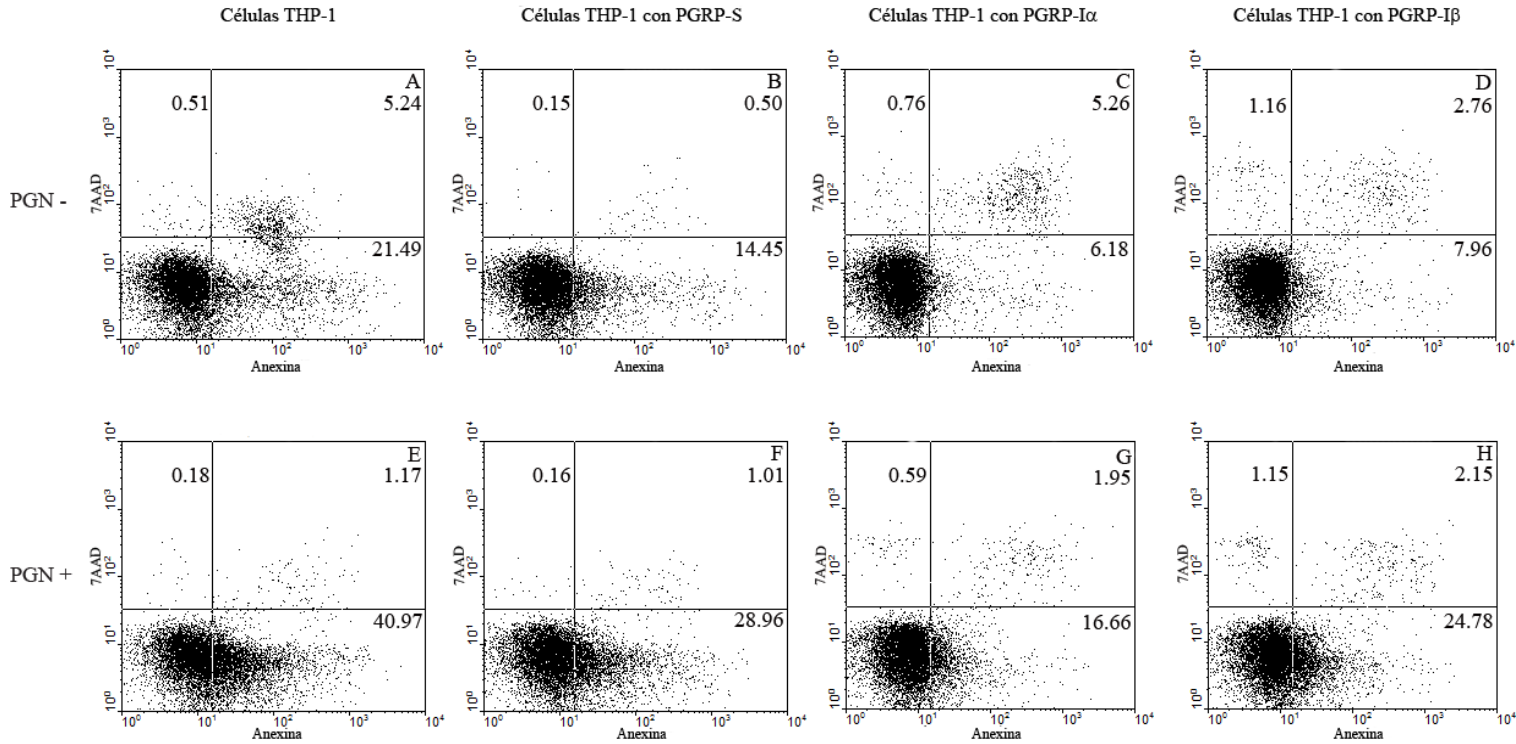
Para determinar la integridad de membrana y la viabilidad de las células THP-1, utilizamos el kit LIVE/DEAD Cell Vitality Assay. De esta manera, observamos que las PGRPs disminuyen ~60% la incorporación de Sytox-Green por las células THP-1 en comparación con las células no tratadas (**Fig. 31A-D**). En forma similar, las PGRPs fueron capaces de proteger el daño de membrana que producen los PGN (**Fig. 31E-H**) disminuyendo ~40% la incorporación de Sytox-Green. Además, las PGRPs o los complejos PGN-PGRPs incrementan 10-46% la actividad metabólica de las células THP-1 respecto a los controles, determinado como la incorporación de resazurina (**Fig. 31**).



**Figura 31.- Determinación de daño sobre la membrana y vitalidad celular.** Monocitos de la línea THP-1 fueron incubados con PGN o PGN-PGRPs, y luego marcados con Sytox-Green/resazurina para, finalmente, analizarlos por Citometría de Flujo. Análisis de los cultivos de células THP-1 sin (A) o con PGRPs (B-D). Del mismo modo, cultivos de células THP-1 con PGN (E) o con PGN preincubado con PGRPs (F-H). La figura muestra un experimento representativo de 4.

Con el objetivo de verificar estos resultados, empleamos el Kit de Annexin/7AAD Kit para determinar la influencia de las PGRPs en los fenómenos apoptóticos. Observamos que las PGRPs eran capaces de proteger a las células de la apoptosis inducida por el PGN con

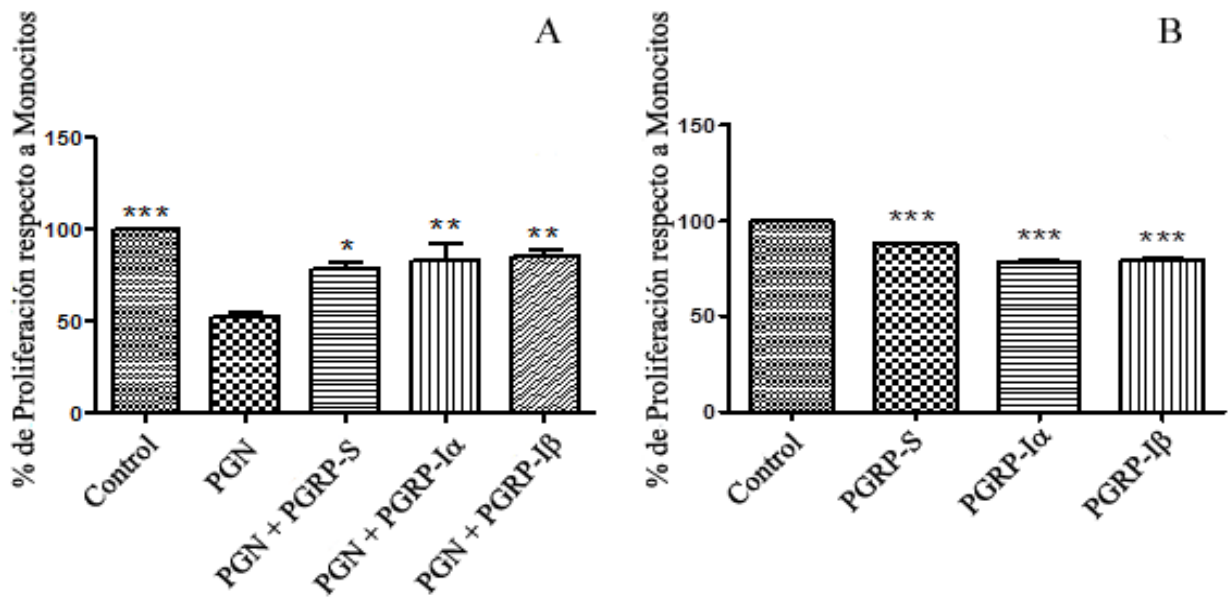
reducciones de ~40% respecto a las células no tratadas (**Fig. 32E-H**). Además, las PGRPs no solo disminuyen los procesos apoptóticos producidos por el PGN si no que también la disminuyen en la células cultivadas sin PGN alrededor del 42-58% (**Fig. 32A-D**).



**Figura 32. Efectos de las PGRPs en los procesos apoptóticos.** Análisis de la apoptosis en cultivos de células THP-1 sin (A) o con PGRPs (B-D). La apoptosis también fue determinada en cultivos de células THP-1 con PGN (E) o con PGN preincubado con PGRPs (F-H). Todos los cultivos fueron tratados con Anexina V/TAAD y luego analizados por CF. La figura muestra un experimento representativo de 4.

Para determinar el efecto de las PGRPs sobre la proliferación de los monocitos, células THP-1, sin tratar con VD3, fueron incubadas con 20  $\mu\text{g/ml}$  PGN previamente tratados o no con 10  $\mu\text{g/ml}$  de PGRPs o BSA (control) durante 24-72 h. Como se puede observar en la **Figura 33A**, el PGN produce un 50% de inhibición en la proliferación de las células THP-1, mientras que los PGNs pretratados con las PGRPs reducen significativamente la inhibición en la proliferación generada por el PGN. Sin embargo, también se observa que todas las PGRPs en ausencia de PGN reducen la proliferación celular en concentraciones  $\sim 10 \mu\text{g/ml}$  (**Fig. 33B**), probablemente como un mecanismo de control homeostático.

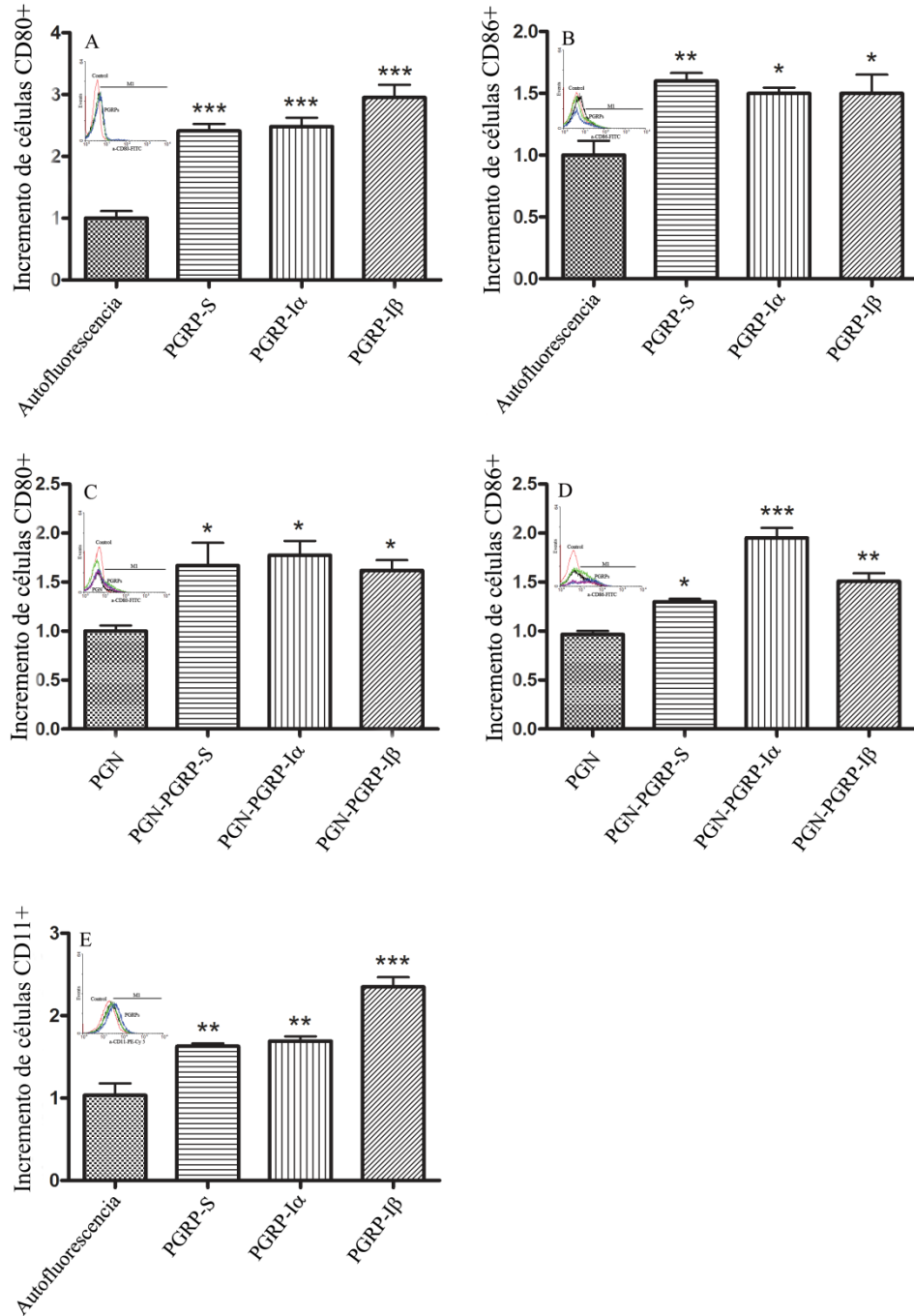




**Figura 33.- Efecto de las PGRPs sobre la proliferación de los monocitos.** Para determinar el efecto de las PGRPs sobre la proliferación de los monocitos THP-1, estos fueron incubados con el complejo PGN-PGRPs (A) o solo con las PGRPs (B) durante 48 h y se determinó la actividad biológica con MTT. La Figuras muestra un experimento representativo de 3. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

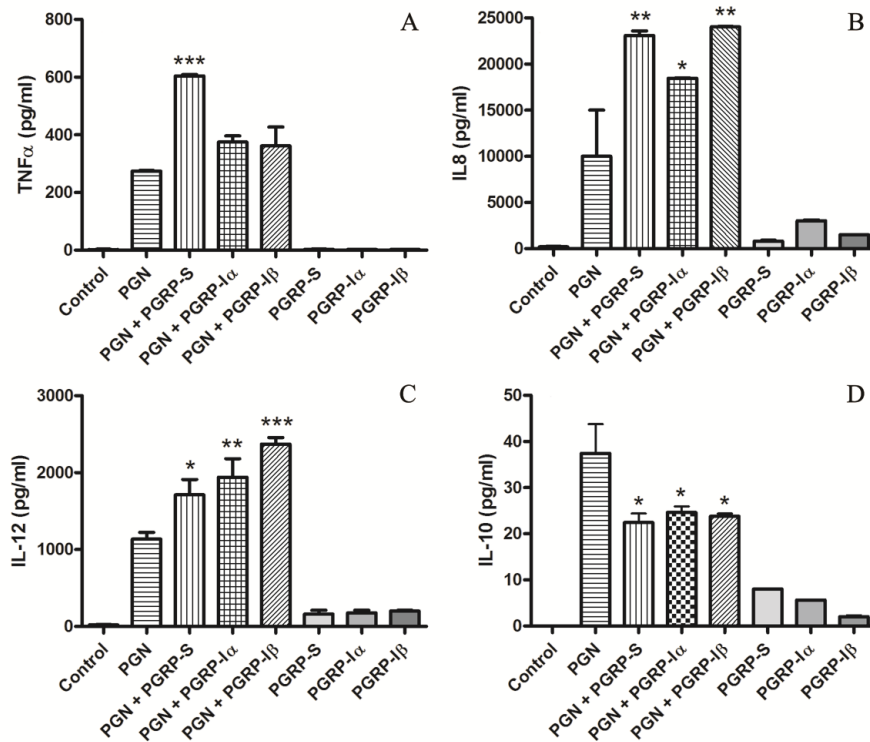
Con el fin de analizar el efecto de las PGRPs en la activación celular, monocitos/macrófagos THP-1 fueron incubados con PGN tratado previamente o no con PGRPs durante 24-72 h para luego analizar por CF la expresión en membrana de los marcadores CD11, CD80, CD86 y CD14. Observamos un incremento en la expresión de CD80 (100-200%) y CD86 (~50%) para las PGRP-S, PGRP-Iα y PGRP-Iβ a las 48 h de cultivo, en comparación con las células control (**Fig. 34A-B**). De manera similar, los complejos PGRPs-PGN incrementan la expresión de CD80 (>50%) y CD86 (40-100%) respecto a las células cultivadas solo con PGN (**Fig. 34C-D**). Además, observamos que las PGRPs incrementan la expresión de CD11 en un rango del 50-150% (**Fig. 34E**), sin embargo los complejos PGN-PGRP no modifican la expresión de CD11, respecto a los controles.





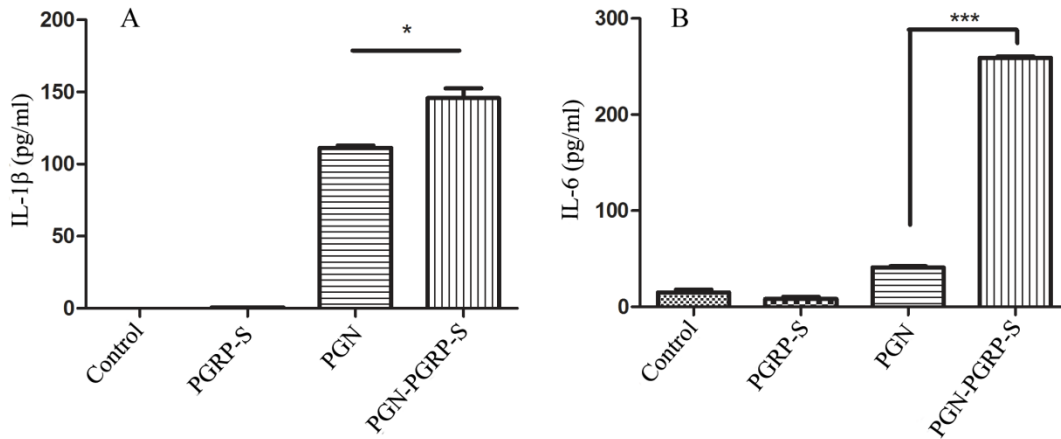
**Figura 34.- Efecto de las PGRPs sobre la activación de los monocitos/macrófagos.** Para determinar el efecto que las PGRPs tienen sobre la activación celular, células THP-1 fueron cultivadas con PGN, PGRPs o con PGN-PGRPs y posteriormente incubadas con Acs anti-CD80, CD86 y CD11. Los resultados fueron analizados por CF como el % de células presentes en la región M1 de las células tratadas con PGRPs o PGN-PGRPs/células controles (no tratadas o tratadas con PGN, respectivamente). Expresión de CD80 (A) y CD86 (B) en la membrana de células THP-1 tratadas con PGRPs. Expresión de CD80 (C) y CD86 (D) producido por PGN-PGRPs. Expresión de CD11 (E). Insertos: Histogramas de las citometrías. La Figuras muestran un experimento representativo de 3. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

Los SN de los cultivos de THP-1 con PGN, en presencia o no de PGRPs fueron empleados para determinar la producción de CKs luego de los diferentes estímulos. De esta manera, pudimos detectar que el PGN incrementa la producción de TNF $\alpha$ , IL-8, IL-12 e IL-10 por las THP-1 respecto a los controles, mientras que no se observó ningún cambio en las células cultivadas en presencia de PGRPs (**Fig. 35A-D**). Sorprendentemente, observamos una respuesta incrementada de TNF $\alpha$  (50-100%), IL-8 (100-150%) e IL-12 (50-150%) cuando las células fueron co-cultivadas con PGN y PGRPs (**Fig. 35A-C**). Todas las diferencias fueron estadísticamente significativas, excepto para TNF- $\alpha$  cuando fueron empleadas PRGP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$ , sin embargo, estas proteínas incrementan los niveles de TNF- $\alpha$  en forma consistente en todas las repeticiones realizadas. Por el contrario, como se muestra en la **Figura 35D**, el PGN incrementa la producción por parte de los monocitos de IL10 mientras que el pre tratamiento del PGN con las PGRPs produce una disminución significativa (30-45%) de esos niveles.



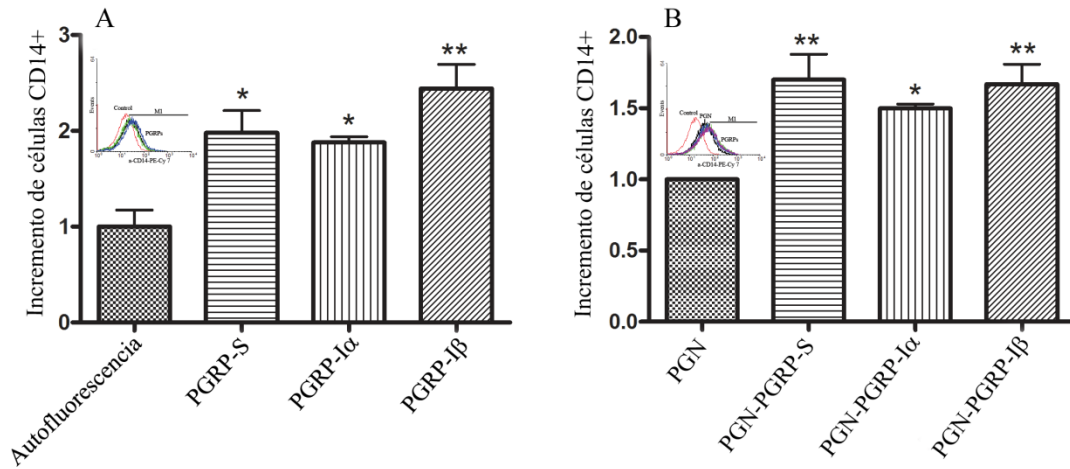
**Figura 35.- Efecto de las PGRPs sobre la secreción de CKs.** Para determinar el efecto de las PGRPs en la producción de CKs, los SN de cultivo de 48 h de monocitos/macrófagos con PGN, PGRPs o complejos PGN-PGRPs fueron analizados por ELISA para TNF- $\alpha$  (**A**) IL8 (**B**), IL12 (**C**) e IL-10 (**D**). La Figuras muestra un experimento representativo de 3. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ .

Al analizar el efecto de las PGRPs en la expresión de las citoquinas IL-1 $\beta$  y IL-6 en los SN de cultivo, no observamos cambios en los tratamientos con PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  frente a sus respectivos controles. Sin embargo detectamos cambios significativos en la expresión de dichas citoquinas en los tratamientos con PGN-PGRP-S respecto a sus controles de PGN solo (**Fig. 36**).



**Figura 36. Efecto de PGRP-S sobre la secreción de CKs.** Para determinar el efecto de PGRP-S en la producción de CKs, los SN de cultivo de 48 h de monocitos/macrófagos con PGN, PGRPs o complejos PGN-PGRPs fueron analizados por ELISA para IL-1 $\beta$  (A) e IL-6 (B). La Figuras muestra un experimento representativo de 3. \* $p < 0.05$ , \*\*\*  $p < 0.001$ .

En forma paralela, cuando analizamos la expresión de CD14 observamos que todas las PGRPs incrementan ~100% los niveles de dichas moléculas en las membranas de los monocitos, las cuales están involucradas en el reconocimiento de PGN. (**Fig. 37A**). De la misma manera el complejo PGN-PGRP incrementa significativamente (~50%) la expresión de CD14 respecto a los controles de PGN (**Fig. 37B**).



**Figura 37.- Efecto de las PGRPs sobre la expresión de CD 14.** Para determinar el efecto que las PGRPs tienen sobre la activación celular, células THP-1 fueron cultivadas con PGN, PGRPs o con PGN-PGRPs y posteriormente incubadas con Acs anti-CD14. Los resultados fueron analizados por CF como el % de células presentes en la región M1 de las células tratadas con PGRPs o PGN-PGRPs/células controles (no tratadas o tratadas con PGN, respectivamente). Expresión de CD14 en la membrana de células THP-1 tratadas con PGRPs (A) o con PGN-PGRPs (B). Insertos: Histograma de las citometrías. Las Figuras muestra un experimento representativo de 3. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

# Discusión

El incremento de patologías que afectan la RI relacionadas con síndromes de inmunodeficiencias y el gran desarrollo de resistencia a los antibióticos por parte de las bacterias, focalizaron nuestro interés en el estudio de la RI innata, principalmente en aquellas moléculas que pudiesen presentar alguna actividad que alterara la infección bacteriana. Entre los mecanismos implicados en la respuesta innata se destaca el reconocimiento de productos conservados de los microorganismos, denominados genéricamente PAMPs. Las PGRPs son moléculas de reconocimiento de PAMPs que interactúan con PGNs. El objetivo general de esta tesis es identificar los fluidos que contienen y los tipos celulares que expresan PGRPs; y estudiar el rol biológico de las PGRPs en los mecanismos de defensa.

Con estos objetivos planteados, obtuvimos las construcciones codificantes para PGRP-S como así también para los dominios C terminal de la PGRP-I $\alpha$  y N terminal de la PGRP-I $\beta$ , todas moléculas de unión a PGN bacteriano. La inducción de su expresión como CI en *E. coli* BL21 (DE3) produjo proteínas del PM esperado (~ 19600 Da para PGRP-S, ~ 18200 Da para PGRP-I $\alpha$ C y ~17100 Da para PGRP-I $\beta$ N). El rendimiento obtenido de proteína desnaturalizada, para todas las PGRPs, fue de aproximadamente 35-50 mg/L de cultivo. Luego del proceso de replegado en arginina y posterior purificación, el rendimiento de todas las PGRPs fue de 1-2 mg/L de cultivo. La diferencia entre el rendimiento de proteína final purificada y replegada con respecto a la presente en los CI solubilizados en guanidina, se debe a que una proporción muy importante de la misma forma agregados durante los procesos de replegamiento *in vitro* o durante el posterior paso de concentración a la que son sometidas.

La fracción de proteína que se mantiene en solución está compuesta tanto por proteína que adoptó una conformación adecuada, como por aquellas que sin tener un correcto plegamiento, forman agregados. Esto se puede observar en el pico obtenido en el  $V_0$  luego de la purificación por exclusión molecular (**Fig. 9**). Este fenómeno podría deberse a la exposición de regiones hidrofóbicas como consecuencia de un proceso de renaturalización erróneo. En este tipo de columnas las moléculas que eluyen en el  $V_0$  tienen un muy alto PM. En las condiciones de análisis empleadas mediante SDS-PAGE (**Fig. 10**) las proteínas se desnaturalizan y se desagregan por la presencia del detergente empleado (SDS). Al analizar el mencionado pico ( $V_0$ ) se obtuvo una banda con movilidad electroforética correspondiente al PM de PGRP lo que confirmaba la presencia de proteína agregada. Los perfiles de elución obtenidos para PGRP-S y PGRP-I $\alpha$  presentaron dos picos proteicos predominantes cada uno (**Fig. 9A y B**), con muy buena

resolución. Si bien las proteínas presentes en cada pico mostraban igual movilidad electroforética al ser analizadas por SDS-PAGE en condiciones reductoras (**Fig. 10A y B**), la utilización de una columna calibrada demostró que solo los picos que eluyen en segundo lugar en cada caso poseen un volumen de elución que coincide con el esperado para las PGRPs en base al PM de las mismas. El análisis de estos picos en condiciones no reductoras demostró que los que poseían menor volumen de elución correspondían a homodímeros de las PGRPs (**Fig. 10D**). Por el contrario, el perfil de elución de PGRP-I $\beta$  (**Fig. 9C**) mostró que solo el pico mayoritario contenía proteínas bien plegadas, con un alto grado de pureza y con la movilidad electroforética esperada (**Fig. 10C**).

Luego del procedimiento de purificación el rendimiento obtenido de proteína replegada y purificada de todas las PGRPs fue suficiente para la realización de los ensayos planificados en el presente trabajo. Cabe destacar que, al estudiar el comportamiento hidrodinámico de dichas proteínas por medio de cromatografía de exclusión molecular, detectamos diferencias mínimas entre el  $R_s$  teórico y el  $R_s$  experimental, lo que indicaría que efectivamente las proteínas se encuentran correctamente replegadas (**Tabla 1**).

Con el fin de contar con una herramienta útil en la detección de PGRPs en muestras biológicas se generaron antisueros que, al analizarlos empleando ELISA o inmunoblotting, demostraron ser específicos para sus respectivos Ags sin presentar reactividad cruzada con las otras PGRPs ni con lisozima, una proteína estructural y funcionalmente muy relacionada a las PGRPs. Al analizar la interacción de los sueros obtenidos tanto de ratón como de conejo (anti-PGRP-S, anti-PGRP-I $\alpha$ C y anti-PGRP-I $\beta$ N) mediante inmunoblotting con las PGRPs recombinantes, observamos que estos reconocían una banda reactiva de ~ 20000 Da para todas las PGRPs y una banda adicional de ~ 40000 con PGRP-S y PGRP-I $\alpha$ C (**Fig. 11**), la cual desaparece luego de tratar las muestras con DTT. Esto significaría que ambas PGRPs recombinantes, sufren un proceso de oxidación que genera la dimerización de las mismas. La presencia de especies monoméricas y diméricas no sorprende dado que la formación de dímeros ya ha sido registrada previamente. Se ha descrito que PGRP-S recombinante es secretada al medio como un homodímero, mientras que PGRP-I $\alpha$  recombinante es secretada tanto como homodímero o formando heterodímeros con PGRP-I $\beta$  cuando son co-expresadas. También se describió que la glicosilación de estas proteínas jugaría un rol muy importante en la relación monómero/dímero en favor de esta última [Lu 2006].

Para evaluar la funcionalidad de las proteínas recombinantes producidas y corroborar nuevamente que su plegamiento *in vitro* era correcto se examinó si tenían capacidad de unirse a bacterias y a sus PGN insolubles purificados. De esta forma, empleando ensayos de unión y precipitación (**Fig. 12-13**), pudimos comprobar que todas las PGRPs recombinantes obtenidas mantenían la capacidad de unión a bacterias de diferentes especies, tanto G(+) (*S. aureus*, *E. faecalis*) como G(-) (*E. coli* o *B. abortus*) [**Dziarski 2004**]. Además pudimos observar, como era esperable, que la intensidad de las bandas era mayor para los ensayos realizados con bacterias G(+) que con G(-) debido a que las primeras presentan una superficie expuesta mayor de PGN [**Kang 1998**]. Por otro lado, observamos que la capacidad de unión es mayor para PGRP-S y PGRP-I $\beta$ N, y que tanto los monómeros como los dímeros de PGRP son capaces de interactuar con las distintas bacterias empleadas o con sus PGNs insolubles (**Figuras 12-14**). Por lo tanto, el proceso de dimerización no afectaría la funcionalidad de las mismas, hecho ya sugerido por Lu [**2006**]. Por último, la incubación con PGN insoluble demostró que las PGRPs eran retenidas en la fracción de PGN luego de múltiples lavados con PBS, sugiriendo que dicha unión es de alta afinidad.

La presencia de dímeros es consistente con el número de Cys presentes en la estructura de las PGRPs. PGRP-S posee 7 Cys de las cuales solamente una se encuentra libre (Cys8) en su estructura cristalina y probablemente sea la responsable de la dimerización tanto de la proteína recombinante [**Guan 2005b; 2007**] como de la proteína nativa, debido a que está expuesta al medio por ubicarse en la superficie de la molécula. En la estructura de PGRP-I $\alpha$  se observan 5 Cys de las cuales solo la Cys 300 se encuentra libre. Por el contrario PGRP-I $\beta$  sólo se expresa como monómero a pesar de poseer cinco Cys. Es probable que la Cys libre no esté sobre la superficie de la molécula, pero esto deberá esperar la resolución de su estructura. En otro orden, Shrama y col determinaron una segunda constante de afinidad para la interacción PGRP-PGN, sugiriendo un efecto cooperativo que podría ser la causa de la unión múltiple de las PGRPs a cada molécula de PGN [**Shrama 2012; 2013b**]. En este sentido la dimerización de las PGRPs podría jugar un rol fisiológico muy importante en el reconocimiento de dichas moléculas.

La obtención de PGN insoluble nos brindó una herramienta para analizar la presencia de PGRP en fluidos biológicos mediante la realización de precipitaciones que, combinadas con inmunoblotting empleando los antisueros desarrollados, brindan a la técnica alta especificidad. Al analizar muestras de saliva precipitadas con PGN por SDS-PAGE observamos una banda



proteica de aproximadamente 18 kDa (**Fig 15A**), sin embargo esta banda no se observa por inmunoblotting, donde se detecta una banda proteica de ~45kDa cuando utilizamos el suero anti-PGRP-S (**Fig 15B**). Esto revelaría la presencia en saliva del dímero de la PGRP-S pues estos no sólo unían PGN (al precipitar con el PGN insoluble) sino que también eran reconocidas por el antisuero anti-PGRP-S específico. Esta proteína podría ser secretada por granulocitos, células epiteliales o las glándulas salivales [Lu 2006]. Por otra parte, la banda observada solo por SDS-PAGE correspondería a la lisozima que, como fue mencionado anteriormente, es una proteína que reconoce PGN y tiene un PM similar al monómero de PGRP-S pero no es reconocida por los antisueros anti-PGRPs específicos. No detectamos la presencia de PGRP-I $\alpha$  ni de PGRP-I $\beta$  en las muestras de saliva analizadas.

Al emplear esta metodología para estudiar las muestras de suero de pacientes sanos detectamos una banda proteica de 45 kDa que se une al PGN y es reconocido por el antisuero anti-PGRP-S específico (**Fig 15C**). La misma banda de 45 kDa también fue detectada al realizar inmunoprecipitación del suero pero empleando columnas de proteína A saturadas con Acs anti-PGRP-S, confirmando la identidad de la proteína. Los Acs, como era de esperar, inmunoprecipitan tanto con la PGRP-S recombinante así como también con la nativa. La PGRP-S nativa tiene 2 sitios hipotéticos para su glicosilación, un sitio potencial de O- glicosilación y otro sitio potencial de N-glicosilación calculados con NetOGlyc 4.0 y con NetNGlyc 1.0 (Universidad Técnica de Dinamarca, Lyngby, Dinamarca), respectivamente. Esto se ve reflejado en la mayor movilidad electroforética que poseen los dímeros generados por PGRP recombinante, que carece de glicosilación, respecto a la nativa [Lu 2006]. De esta forma, estos resultados en conjunto con conclusiones anteriores de otros autores [Lu 2006], sugieren que la PGRP-S es una proteína presente en suero como un homodímero. Hasta ahora PGRP-L era indicada como la única PGRP detectada en suero ya que ésta es producida constitutivamente por el hígado y secretada al torrente sanguíneo [Zhang 2005]. Si bien nosotros detectamos la presencia de PGRP-S en suero humano, aún queda por develar cuál es el origen de la misma.

PGRP-S ha sido descrita como una proteína presente en PMN y en médula ósea de mamíferos [Liu 2000]. La presencia en médula ósea se debería al hecho de que es el sitio donde se generan y maduran los neutrófilos, previo a su salida hacia el torrente circulatorio. Nosotros logramos no sólo confirmar la presencia de PGRP-S en estas células sino que también observamos que se encontraba predominantemente como dímero ya que, empleando inmunoblotting, observamos la

presencia de una banda de aproximadamente 45 kDa en los PMN [Lu 2006]. Mediante ensayos de degranulación de PMN (**Fig. 16**) pudimos comprobar que PGRP-S era secretada ante el estímulo con FMLP. La degranulación de los neutrófilos es un mecanismo fisiológico que los mismos efectúan para defender a nuestro organismo ante la presencia de un microorganismo o, también, lo pueden realizar en forma espontánea. La proteína de 45 kDa detectada en los gránulos de neutrófilos, presenta el mismo peso molecular que la observada en suero, lo que sugeriría que PGRP-S es secretada por PMN como un dímero y que estas células podrían ser las responsables de su presencia en suero [Liu 2000; Cho 2005] en donde la detectamos en bajas concentraciones ( $\leq 1-10 \mu\text{g/ml}$ ) en concordancia a las concentraciones de PGRP descritas en suero de ratón ( $\leq 5 \mu\text{g/ml}$ ) [Liu 2000]. Su identificación en PMN no sólo se basó en la detección de la proteína con los antisueros específicos por immunoblotting sino que también pudo ser precipitada con PGN insoluble, como ocurre con la proteína detectada en suero (**Fig. 16**).

Teniendo en cuenta que los neutrófilos son la población más abundante de leucocitos circundantes e intervienen en las primeras fases de la respuesta inflamatoria, la expresión selectiva de PGRP-S en estas células sugiere que estas proteínas podrían jugar un rol importante en la respuesta inmune [Dziarski 2003].

La capacidad de formar dímeros que tiene PGRP-S nos llevó a indagar cuál sería la génesis de los mismos. Comprobamos que tanto en la PGRP-S recombinante como en la nativa, la dimerización desaparece al tratar las muestras con DTT por lo que su formación se debe efectivamente a la presencia de puentes disulfuro entre las Cys libres presentes en su estructura. La Cys 8 de PGRP-S, al no estar implicada en la formación de uniones intramoleculares, sería la responsable de la dimerización sin ocluir el sitio de unión a PGN. Por otro lado, no pudimos observar la presencia de monómeros de PGRP-S en el suero ni en los PMNs. En definitiva, estos resultados sugieren que PGRP-S tendría actividad biológica tanto en su forma monomérica como dimérica, como se la detecta tanto en el suero como en los PMN en concordancia con lo sugerido previamente por Lu [2006].

Asimismo, al repetir los ensayos tanto en suero como en PMN y analizar por immunoblotting empleando como primer Ac el antisuero anti-PGRP-I $\alpha$  o anti-PGRP-I $\beta$  no observamos ninguna banda, lo que es consistente con el hecho de que ambas PGRPs están selectivamente expresadas en los tejidos expuestos al medio, como la piel, ojos, glándulas salivales, garganta, esófago, estomago, intestino, etc. [Mathur 2004; Lu 2006].

Además, empleando IFD y CF detectamos la presencia de PGRP-I $\alpha$  (pero no de PGRP-S ni de PGRP-I $\beta$ ) en la línea celular A-549 empleando los Acs específicos. Estas, son células epiteliales alveolares, por lo que es consistente con lo postulado por Mathur [2004] y Lu [2006] (Fig. 17). Por otro lado en la línea celular THP-1 se detectó la expresión PGRP-S, pero no de PGRP-I $\alpha$  ni de PGRP-I $\beta$  (Fig. 18).

Se sugirió que la posible presencia de PGRP en fluidos biológicos podría modular la respuesta del hospedador contra PGN o bacterias, como ocurre con CD14, un receptor soluble presente en plasma y en las membranas de macrófagos y monocitos o con el complemento [Liu 2000]. El hecho de que halláramos a PGRP-S en suero y el conocimiento de que las PGRPs tienen un dominio hidrofóbico sumamente conservado en todo el grupo (ausente en la Lisozima T7) sobre el lado opuesto al sitio de unión a PGN de la molécula, [Kim 2003] planteó la posibilidad de que dichas PGRPs interaccionen con algún tipo de población celular además del reconocimiento de la bacteria o del PGN. Para ello, incubamos muestras de suero con PBMCs y observamos por CF empleando los Acs específicos, que efectivamente PGRP-S era reconocida por esta población celular (Fig. 19).

Posteriormente, analizamos la capacidad de las distintas PGRPs de ser reconocidas por PBMCs. Al realizar estos experimentos se reveló la presencia de las PGRPs unidas a las membranas de estas células empleando los antisueros generados y un conjugado fluorescente (Fig. 20). También observamos, que si bien todas las proteínas eran reconocidas por esta heterogénea población celular, al analizar mediante CF las distintas poblaciones que la conforman, la unión era mayor a los monocitos que a los linfocitos circulantes obtenidos de sangre periférica (Fig. 21). Para confirmar este hecho, repetimos los experimentos estudiando la unión de todas las PGRPs recombinantes a la línea celular de monocitos THP-1 (Fig. 22). La disminución en la interacción de las PGRPs a células THP-1 comparadas con PBMCs podría ser debido a un número más alto de receptores en la población heterogénea de monocitos de sangre periférica que en las células de línea THP-1.

Este último experimento sugirió que PGRP-I $\alpha$  se unía más a monocitos que PGRP-S y PGRP-I $\beta$ . Esto podría deberse a que PGRP-I $\alpha$  tendría mayor afinidad por los supuestos receptores presentes en las células, a que hay más receptores para la misma, o en el caso de la PGRP-S, que dicha proteína proveniente del suero empleado como bloqueante de los receptores Fc, esté unida a las células, por lo que estos receptores estarían, en una proporción importante ocupados. De

esta manera el control realizado con el antisuero específico sin PGRP-S recombinante daría una mayor señal que la esperada al reconocer a la PGRP-S nativa unida a membrana. Así, el tratamiento con PGRP-S recombinante tendría una menor señal relativa respecto al mencionado control, que las otras PGRPs.

Como mencionáramos, el aumento de señal en los ensayos controles realizados empleando los antisueros anti-PGRP-S en ausencia de PGRP-S recombinante, podría deberse a la presencia de PGRP en el suero humano utilizado para bloquear los receptores Fc de los monocitos. Al repetir el ensayo empleando sueros de otras especies como bloqueante se volvieron a observar las diferencias descriptas, pero la posibilidad de reacción de cruce con PGRP-S de otras especies no puede ser descartada, independientemente de la afinidad hacia los mismos. Teniendo en cuenta estos resultados y conociendo el hecho de que las PGRPs se unen a alguna molécula de la membrana de los monocitos, marcamos todas las PGRPs con FITC para realizar ensayos de unión y endocitosis, con el fin de determinar si son incorporadas al interior de los mismos. De esta manera, la unión detectada fue mayor para PGRP-S-FITC que para el resto de las PGRPs-FITC, al contrario de lo que sucedió con los ensayos de unión realizados con las PGRPs sin marcar. Esto podría deberse a la ausencia de suero humano que aporte PGRP nativa (PGRP-S).

Por otro lado, como se demuestra en la **Figura 23A-B** los resultados obtenidos pusieron en evidencia que, además de unirse, la proteína estaba siendo internalizada. Para confirmar esto, tratamos a las células que previamente habían sido incubadas con las PGRPs-FITC a 4° C o a 37° C con Tripán Blue justo antes de su análisis por citometría. El Tripán Blue es un colorante que ejerce el efecto de *quenching* de la señal fluorescente extracelular originada por la unión de PGRPs-FITC a membrana pero no la intracelular ocasionada por la endocitosis de PGRPs-FITC. Este análisis nos permitió observar la desaparición de la fluorescencia a 4° C, que solo se debía a la unión de las proteínas a la superficie celular, pero no a 37° C, lo que confirmaba la presencia de las PGRPs-FITC dentro de las células (**Fig. 23C-D**).

También, verificamos la unión de las PGRPs a monocitos empleando inmunoblotting. Al incubar las distintas PGRPs con monocitos THP-1 y revelar con los antisueros anti-PGRPs específicos observamos la presencia de una banda reactiva de ~20 kDa para las 3 PGRPs analizadas y en el caso de PGRP-S e I $\alpha$  se detectó una segunda banda reactiva de ~40 kDa. Esto demostraría que no sólo el monómero de PGRP recombinante es reconocido por estas células, sino también el dímero (**Fig. 24A**). Posteriormente, se inmovilizaron las diferentes PGRPs a los chips

sensores del equipo BIAcore T100, y analizamos su interacción con diferentes concentraciones celulares. Observamos un aumento no lineal de la señal del sensograma, al aumentar linealmente las concentraciones celulares en la fase fluída, lo que indicaría la existencia de interacción específica (**Fig. 24B**).

En otro orden, para corroborar la endocitosis se empleo IFD. Verificamos el ingreso de las PGRPs-FITC utilizando como contracolor DiD y DAPI, para aumentar el contraste (**Fig. 25**). De esta manera pusimos en evidencia que, además de los fenómenos de unión, estaban ocurriendo fenómenos de endocitosis.

Para discernir si el ingreso de las PGRPs al interior de las células es resultado de un proceso inespecífico o estaría asociado a mecanismos de interacción con receptores específicos, repetimos el mismo ensayo de endocitosis pero en presencia y ausencia de Wartmanina, un inhibidor de la macropinocitosis. Evidenciamos por CF que no existían diferencias significativas entre los diferentes tratamientos (**Fig. 26**), lo que nos permite inferir que el ingreso de las PGRPs al interior celular correspondería a un proceso específico. Es por ello que podría existir un posible receptor celular para PGRPs que favorezca dicho fenómeno.

Con el fin de comprobar la existencia de un posible receptor celular para PGRPs, analizamos si estas proteínas eran capaces de activar la expresión de NF- $\kappa$ B (**Fig. 27**). Encontramos que las PGRPs incrementan la activación del mismo, lo que sugeriría la existencia de un receptor celular que al interactuar con las PGRPs podría comunicar la presencia de bacterias o fragmentos de PGN bacterianos. Sin embargo, hasta ahora, todos los intentos que realizamos de co-precipitar este posible receptor no fueron exitosos (resultados no mostrados).

Estudios cristalográficos y bioquímicos [**Guan 2004a; 2004b; 2005a; 2005b; Lu 2006**] demostraron que las PGRPs son proteínas solubles pero sus funciones no están aún totalmente dilucidadas. La bibliografía no es contundente acerca de la definición de estas proteínas como bacteriostáticas [**Liu 2000; Dziarski 2003; Cho 2005**] o bactericidas [**Lu 2006**]. Se ha reportado que estas necesitarían  $\text{Ca}^{2+}$  y/o  $\text{Zn}^{2+}$  para ejercer dicha función o que la ausencia de glicosilación, en el caso de proteínas recombinantes producidas en procariontes, eliminaría su función bactericida.

Si bien se ha descripto que las mismas desarrollan una actividad bactericida frente a bacterias G(+) patogénicas (*Listeria monocytogenes* y *S. aureus*) o no patogénicas (*Bacillus* y *Lactobacillus*), estas no afectan la FNB, sugiriendo que pueden haber desarrollado resistencia a

los diferentes mecanismos bactericidas presentes constitutivamente en la piel, ojos y membranas mucosas, pudiendo colonizar estas áreas [Lu 2006]. Recientemente Bosco-Drayon y col. [2012] describieron la importancia de PGRP-LE y PGRP-LB en el balance entre tolerancia a la flora normal y la respuesta a una infección bacteriana, sin embargo, las razones y fundamentos para estas acciones se desconocen.

Se observo también, que las PGRPs de mamíferos se unen tanto a PGN o a bacterias con afinidad nanomolar y que inhiben el crecimiento de bacterias G(+). Además estas PGRPs tienen una función análoga a las PGRPs presentes en insectos. Por otra parte, las PGRPs no tienen ninguna similitud estructural ni secuencias homólogas con TLR2, otro receptor de reconocimiento de PGN. La especificidad en la unión con PGN de las PGRPs es similar a la especificidad de lisozima. En definitiva, el reconocimiento por componentes del sistema inmunológico (como PGRP y lisozima) de las paredes celulares bacterianas, facilitarían la eliminación de las mismas por medio de la RI innata.

Por otro lado, no esta claro cuáles son los niveles de concentración necesarios para que las PGRPs ejerzan su actividad, ya que muchas de sus funciones han sido reportadas a partir de ensayos en los cuales se emplearon desde 45 hasta unos 200 µg/ml de proteína [Liu 2000; Lu 2006], generando la duda de si esos valores son fisiológicos. Estas concentraciones podrían ser encontradas dentro de los PMN, por los que serían representativas de lo que sucede en su interior cuando actúan como fagocitos, pero no se han comunicado esas concentraciones en fluidos. Por otra parte, las actividades bactericidas y bacteriostáticas de las PGRPs descritas por Wang [2007] fueron hechas incubando a las bacterias en buffer TRIS, que no es adecuado para la supervivencia de las mismas.

Para poder independizarnos de estas cuestiones decidimos llevar a cabo ensayos en otros medios como el RPMI o el LB y disminuir la concentración de las PGRPs, a valores próximos a los 10 µg/ml. La decisión de emplear 10 µg/ml de PGRP está basada en el hecho de que esta concentración era el nivel máximo de PGRP-S detectado en suero, de manera de simular un entorno más cercano a lo fisiológico. En estas condiciones, los resultados obtenidos arrojaron que las PGRPs no eran ni bacteriostáticas ni bactericidas para *S. aureus* (Fig. 28A). Lu [2006] reportó que sí era bactericida para esta especie bacteriana pero empleando concentraciones mayores de proteína recombinante glicosilada que, como mencionamos anteriormente, estas concentraciones podrían estar presentes dentro de los gránulos en PMN y serían importantes en la eliminación de

bacteria fagocitada. Como la ausencia de efectos bactericidas o bacteriostáticos no descartan la posibilidad de que las PGRPs generen algún tipo de daño en la pared celular bacteriana [Lu 2006], analizamos por medio de CF la incorporación por parte de *S. aureus* de Sytox-Green, un marcador fluorescente que ingresa a las células cuando sus membranas están dañadas. Observamos que PGRP-S y PGRP-I $\alpha$ C generaban un daño significativo sobre las paredes celulares (Fig. 28B-C), mientras que PGRP-I $\beta$ N no generó un aumento significativo del daño. El empleo de sueros por si mismo genera daño en la membrana, por lo que los efectos de las PGRPs fueron más notorios al realizar los ensayos en ausencia del mismo (Fig. 28D-E).

Estos resultados demuestran que, en contraste con péptidos antibacterianos, [Wenzel 2014] las PGRPs no glicosiladas no matan a la bacteria permeabilizando su membrana citoplasmática o lisando su pared celular, aunque tanto PGRP-S como PGRP-I $\alpha$ C dañan dicha pared. Las concentraciones fisiológicas de Ca<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> en el medio de cultivo eran suficientes para la completa actividad de las PGRPs.

Se ha descrito que una infección bacteriana induce la expresión de PGRP-S, la cual es distribuida luego en múltiples sitios como la hemolinfa, intestino y la epidermis. Esto es compatible con su rol de moléculas de reconocimiento de PAMPs, señalando la presencia de bacterias o como los receptores que median la respuesta a bacterias por células fagocíticamente activas [Werner 2000].

Independientemente de su probable actividad bactericida o bacteriostática, el hecho que no sean bacteriolíticas [Liu 2000; Lu 2006] lleva a plantear el interrogante sobre que sucede con las bacterias una vez que fueron reconocidas por las PGRPs, y la posible existencia de otras moléculas que reconozcan a estas proteínas para completar la eliminación de las bacterias no puede ser descartada. Los monocitos son miembros del sistema fagocítico mononuclear, el cual es importante para la defensa contra organismos patógenos y, además, ejerce funciones de regulación en el SI caracterizada por una amplia producción de CKs. Algunos autores han sugerido que las PGRPs podrían actuar como un inhibidor de la fagocitosis [Liu 2000] o que no incrementaba la captación de bacterias por los PMN [Dziarski 2003] aunque, por otro lado, se ha reportado que algunas isoformas de PGRPs de *Drosophila* (PGRP-SC1, PGRP-SA y PGRP-LC) desencadenan la fagocitosis por mecanismos no identificados [Ramet 2002; Garver 2006]. Es por ello que realizamos ensayos para determinar el efecto de las PGRPs sobre la actividad fagocítica de los monocitos/macrófagos, trabajando en todo momento con concentraciones de

PGRPs cercanas a los 10 µg/ml de proteína. De esta manera comprobamos que los monocitos en presencia de todas las PGRPs analizadas aumentan su actividad fagocítica de bacterias *S. aureus*-FITC muertas (para descartar el ingreso de bacteria debido a procesos infectivos) (**Fig. 29A-B**) o de sus PGNs purificados (**Tabla 2**). Este efecto es mucho más evidente cuando el ensayo se realiza en ausencia de SFB o suero humano, ya que la presencia del mismo de por sí aumenta la fagocitosis con respecto a los controles sin suero y, por ende, el agregado de PGRP solo modifica levemente esa función. En definitiva, si bien las PGRPs aumentan la capacidad fagocítica de los monocitos, en un entorno fisiológico sería uno más de los mecanismos implicados en la destrucción de las bacterias.

Liu [2000] analizó el efecto de PGRPs sobre la fagocitosis y sobre el estallido oxidativo inducido en leucocitos por la presencia de bacterias, debido a que PGRP podría estar presente en el suero en concentraciones bajas y/o podría ser liberado de PMNs en los sitios inflamatorios. A causa de su afinidad nanomolar de unión a PGN y bacterias, PGRP liberado de PMNs aún en concentraciones bajas podría modular las respuestas del hospedador a los PGN y bacterias de manera análoga a los componentes del complemento que actúan como opsoninas o proteínas que unen LPS.

Si bien *S. aureus* es un patógeno extracelular, se han descrito mecanismos de resistencia del mismo basados en su capacidad de permanecer intracelularmente en las células fagocíticas, hecho que es aprovechado en la evaluación de diferentes drogas antibacterianas [Paillard 2002; Nguyen 2006]. Es por ello que, con el fin de determinar si las PGRPs ejercían alguna influencia en la capacidad de *S. aureus* de ingresar y permanecer vivos en el interior de los monocitos, se realizaron ensayos de infección de dichas células con *S. aureus* en presencia o ausencia de las PGRPs. Se observó que los monocitos/macrófagos eran capaces de matar 10 veces más bacterias que las células que incorporaban *S. aureus* en ausencia de PGRP-S (**Fig. 29C**). En este sentido Kashyap [2014] recientemente demostró que las PGRPs humanas aumentan su capacidad de matar bacterias al actuar conjuntamente con distintos mecanismos, inducción de especies reactivas de oxígeno, depleción de tioles y aumentos de la concentración intracelular de metales.

Teniendo en cuenta que los tiempos de análisis empleados para los ensayos de fagocitosis son los mismos que el primer tiempo de análisis de los ensayos de infección, podemos suponer que algún mecanismo de ingreso a las células alternativo a la fagocitosis puede estar actuando en presencia de PGRP-S. Para verificar si la bacteria infectiva al igual que la muerta estaba siendo



fagocitada, estudiamos la presencia de estas en los fagolisosomas de los monocitos al pre-tratarlas con PGRP-FITC y analizando su co-localización con Lyso Tracker Red (**Fig. 29D**). Sin embargo, esto no descarta que las PGRPs actúen sinérgicamente con enzimas bacteriolíticas (como las lisozima) y péptidos antimicrobianos (como las defensinas) [**Cho 2005; Lu 2006**].

En otro orden, no hallamos diferencias significativas cuando los ensayos de infección/fagocitosis se realizaron en presencia o ausencia de SFB (el cual se emplea descomplementado), pero al agregar SHN fresco se observó una completa eliminación de *S. aureus* del interior de las células a las 72 h post infección, hecho que no sucedía en los controles respectivos o cuando se empleaba el SHN descomplementado (**Fig. 30**). Todavía queda por establecer si este hecho se debe a una mayor eliminación de *S. aureus* en el interior de las células, si ingresan menos a las mismas o si son destruidos en el espacio extracelular, pero lo que sí indicarían estos resultados es una clara asociación entre la presencia del complemento y las PGRPs en la eliminación de las bacterias en estudio.

Previamente fue comunicado que la PGRP-S forma un potente complejo citotóxico con HSP 70 (heat shock protein 70) que induce muerte por apoptosis en varias líneas de tumorales [**Guan 2005b; Dukhanina 2009; 2010; Yashin 2011**]. Observamos que las PGRPs son capaces de proteger del daño a membrana generado por PGN en monocitos/macrófagos, aumentando simultáneamente su actividad metabólica (**Fig. 31**). De la misma manera, las PGRPs protegen dichas células de los procesos apoptóticos desencadenados por PGN o una infección bacteriana, y ellas, por sí mismas son capaces de disminuir también la apoptosis de las células en cultivos sin PGN, por lo que podríamos estar en presencia de una proteína anti-apoptótica (**Fig. 32**). El incremento de NF- $\kappa$ B inducido por las PGRPs es otro indicador en este mismo sentido [**Wullaert 2007**].

Los monocitos/macrófagos juegan un papel crucial en la RI innata contra organismos infecciosos. Estos expresan una serie de TLRs que son críticos en el reconocimiento de PAMPs y en la posterior activación celular e incremento en la producción de CKs pro-inflamatorias, como IL-6 y TNF- $\alpha$ . Se ha descrito que las PGRPs de ratón inhiben la inducción de IL-6 y TNF- $\alpha$  por parte de PGNs en macrófagos y también la activación de macrófagos y neutrofilos, efectos que se suprimen en presencia de suero [**Liu 2000**]. Es por ello que determinamos el efecto que ejercen las PGRPs sobre la proliferación, activación y secreción de CKs en dichas células. Encontramos que las PGRPs reducen la inhibición en la proliferación de macrófagos/monocitos producido por

PGN, sin embargo, también observamos que las PGRPs sin PGN reduce la proliferación celular en concentraciones  $\sim 10 \mu\text{g/ml}$  (**Fig. 33**), tal vez como un mecanismo para el control de homeostasis. Este efecto proliferativo está asociado con la activación celular en presencia de las PGRPs, la cual se visualiza en un aumento en la expresión de los marcadores CD80, CD86 y CD11 sobre la membrana de las células (**Fig. 34A, C y D**). Esta evidencia apoya la hipótesis de un papel proinflamatorio de las PGRPs. La reacción inflamatoria es incrementada en presencia del complejo PGPR-PGN en comparación al PGN solo, ya que se observa un aumento en la expresión de CD80 y CD86 en las membranas de dichas células (**Fig. 34B y D**). El aumento de moléculas CD11 podrían facilitar el reconocimiento de complemento. Por otra parte, el incremento de CD80 y CD86 mejoraría las señales coestimuladoras para la presentación de Ags.

Estos resultados concuerdan con los análisis de CKs en los SN de cultivos de monocitos/macrófagos tratados con PGNs en presencia y ausencia de PGRPs. Detectamos un aumento en la producción de IL-8, IL-12 y TNF- $\alpha$  generados por los tratamientos con PGNs. Este efecto se potencio significativamente en presencia del complejo PGRP-PGN (**Fig. 35A-C**), que en su conjunto favorece la migración y reclutamiento de los neutrófilos circulantes desencadenando la respuesta inflamatoria. Se ha reportado que el PGN presente en las paredes celulares de algunas bacterias previenen el síndrome de shock toxico debido al aumento en los niveles de IL-10 el cual es un potente inhibidor de la respuesta proinflamatoria [**Chau 2009**]. Cuando incubamos macrófagos/monocitos con las distintas PGRPs estas generan una disminución en niveles de IL-10 inducido por PGN (**Fig. 35D**) reforzando de esta manera, el montaje de la respuesta inflamatoria. Además, se pudo observar que las PGRPs por sí mismas pueden aumentar los niveles de dicha CK. Esto representaría un mecanismo de control homeostático de la respuesta inflamatoria una vez eliminado el patógeno. No observamos cambios significativos en los niveles de secreción de IL-1 $\beta$  e IL-6 inducidos por PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  en estas células, respecto a los controles, sin embargo, si se detectaron diferencias significativas cuando las células fueron tratadas con PGRP-S (**Fig. 36**). Esta acción diferencial en las PGRPs podría deberse a que PGRP-S es una proteína presente en suero a diferencia de PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  que se expresan en tejidos expuestos al medio. Por otro lado, tanto PGRP-I $\alpha$  como PGRP-I $\beta$  nativas contienen 2 sitios de unión a PGN mientras que nuestros ensayos se llevaron a cabo utilizando los dominios PGRP-I $\alpha$ C y PGRP-I $\beta$ N, los cuales solo poseen un sitio de unión. Es importante notar que en todos los ensayos realizados, usamos 10-20  $\mu\text{g/ml}$  de PGN porque fue

descrito que PGN soluble activa células en 0.1-1 µg/ml, pero el PGN insoluble lo hace en un rango de 10-100 µg/ml [**Dziarsky 2005**].

En vertebrados se observa que PGN une directamente a CD14 [**Gupta 1996; Weidemann 1997; Dziarsky 2000**]. La activación de macrófagos a través de CD14 [**Weidemann 1997; Gupta 1996**] y TLR2 [**Yoshimura 1999**], induce la producción de las CKs IL-1, TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-12, etc. [**Wang 2000a; 2000b**], resultando en un feedback que retroalimenta positivamente la respuesta proinflamatoria. En base a ello, analizamos si las PGRPs afectaban la expresión de CD14 en las membranas de los monocitos/macrófagos. Observamos que estas proteínas aumentan la expresión de dicho marcador, lo que concuerda nuevamente con nuestros resultados previos (**Fig. 37**).

Basándonos en lo descrito podemos concluir que PGRP-S humana sería un dímero natural que es expresado en PMN como una proteína de 45 kDa, la cual es secretada al medio cuando el PMN degranula, y que su presencia puede ser detectada en suero y saliva. Es sabido que PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  se expresan naturalmente como homo u heterodímeros los cuales pueden ser encontrados en saliva pero no en suero. Por otro lado, hipotetizamos que la PGRP-S soluble en suero podría unirse a las bacterias por vía de sus PGNs facilitando de esta manera, su captura y muerte por parte de los macrófagos. La **Figura 38** muestra un esquema que resume de manera conjunta, los efectos inducidos por los PGNs sobre monocitos/macrófagos y el rol de las PGRPs que deriva a la respuesta innata a un aumento de la inflamación. De esta manera, los complejos PGRP-PGNs podrían interactuar con un receptor desconocido bloqueando los efectos inhibitorios de los PGNs sobre la proliferación de los monocitos. Además los complejos PGRP-PGNs incrementan la expresión de marcadores de activación CD80/86, así como también del receptor CD14 mejorando la RI contra patógenos. Estos complejos también incrementan la secreción de las CKs proinflamatorias IL-8, IL-12, TNF $\alpha$  y decrecen los niveles de la CK antiinflamatoria IL-10. Esta reacción inflamatoria atraerá PMNs al sitio de la infección aumentando la concentración local de PGRP-S favoreciendo la captura y eliminación de la bacteria. El complejo PGRP-PGNs podría rescatar a las células de la apoptosis inducida por PGNs e incrementar la sobrevivencia de células inmunes.

El hecho de que se produzca un aumento de la proliferación celular, en la expresión de marcadores de activación y en la producción de CKs proinflamatorias concuerda con el modelo de eliminación bacteriana por vías inflamatorias.

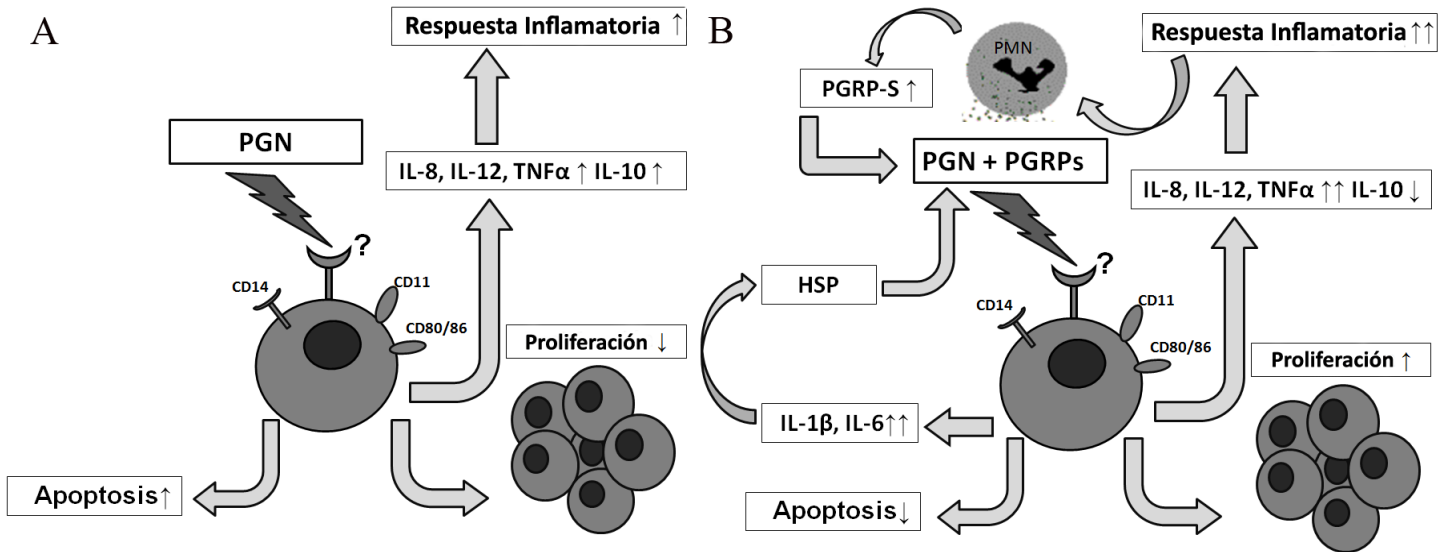


Figura 38.-Representación del rol del PGN en la RI innata (A), y la acción del complejo PGRP-PGN sobre la misma (B).

# Conclusiones

**En este trabajo de tesis se realizó la caracterización bioquímica y funcional de las PGRPs alcanzando los siguientes objetivos parciales:**

1. Expresamos, replegamos *in vitro* y purificamos con un alto grado de pureza PGRP-S y los dominios PGRP-I $\alpha$ C y PGRP-I $\beta$ N. El rendimiento de las proteínas correctamente plegadas y purificadas fue suficiente para la realización de los ensayos planificados en el presente trabajo. Obtuvimos también, antisueros policlonales específicos para cada una de las PGRPs, los cuales no demostraron reactividad cruzada con lisozima ni con otras PGRPs.

2. Observamos que las PGRPs recombinantes dimerizaban por la formación de puentes disulfuro, fenómeno que también ocurre con las PGRPs nativas. Demostramos que estos dímeros son funcionalmente activos ya que son capaces de unir bacterias y PGNs.

3. Detectamos la presencia de una proteína del PM descrito para el dímero de PGRP-S (45 kDa) en saliva, suero, monocitos y PMNs, con capacidad de unir PGN y que es reconocida por Acs específicos. PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  no fueron detectadas en ninguna de estas muestras estudiadas. Por otra parte observamos la presencia de PGRP-I $\alpha$  en células epiteliales alveolares de la línea A549.

4. Comprobamos la existencia de dímeros de PGRP-S en PMN humanos y, mediante ensayos de inducción de la degranulación, observamos que estos se secretaban. Como en el suero, los dímeros de PGRP-S estarían formados por la oxidación de Cys libres en la superficie del monómero ya que es sensible a la reducción con DTT.

5. Detectamos, mediante el análisis por CF, que todas las PGRPs se unen a las membranas de los PBMCs, incremento que obedece principalmente a la población de monocitos, como se confirmara posteriormente con la línea celular THP-1.

6. Comprobamos que los monocitos endocitan PGRPs a 37 °C. Estos datos se confirmaron por CF y microscopía de fluorescencia.

7. Verificamos, empleando un inhibidor de PI3K, que la macropinocitosis no jugaría un rol preponderante en la endocitosis de las PGRPs.

8. Observamos que las PGRPs incrementan los niveles de expresión de NF- $\kappa$ B con respecto a los controles así como también lo hacen los complejos PGRP-PGN respecto a los controles de células tratadas con PGN, lo que indicarían que las PGRPs podrían actuar como un “puente” entre el reconocimiento de PGN y la señalización intracelular.

9. Comprobamos que ninguna de las PGRPs estudiadas tienen efecto bactericida ni bacteriostático en las concentraciones ensayadas sobre *S. aureus*, pero que PGRP-S y PGRP-I $\alpha$ C generan daño sobre la membrana/pared celular.

10. Corroboramos que los monocitos son capaces de aumentar la fagocitosis de *S. aureus* y sus PGNs purificados en presencia de todas las PGRPs estudiadas, y observamos un aumento en la capacidad de los monocitos de eliminar bacterias en presencia de PGRP-S.

11. Determinamos que la presencia de SHN fresco produce una completa eliminación de *S. aureus* en presencia de PGRPs, efecto que desaparece al descomplementarlo. Esto indicaría una clara asociación entre PGRPs y los componentes del complemento en algún mecanismo efector bactericida.

12. Comprobamos el desarrollo de un perfil proinflamatorio en monocitos/macrófagos al inducirse en ellos un aumento de la proliferación, en la expresión de marcadores de activación y secreción de citoquinas cuando se incuban con PGRPs en presencia o ausencia de PGN. Por otro lado demostramos que las PGRPs disminuyen el daño en las membranas e incrementan sobrevivencia de estas células inmunes ya que inhiben los procesos apoptóticos.

**Estos estudios básicos contribuyen al conocimiento y a la caracterización funcional de las PGRPs humanas y su interacción con bacterias y sus respectivos PGNs. Esto con el fin de contribuir a una mayor comprensión de la RI innata y al futuro desarrollo de agentes terapéuticos específicos para el tratamiento de numerosas patologías causadas por bacterias.**

# Resumen



La RI innata es la primera barrera de defensa de un organismo. Entre los mecanismos implicados en esta respuesta se destaca el reconocimiento de productos conservados de los microorganismos (LPS, las secuencias de ADN -CpG, PGN, etc.) denominados genéricamente patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). Los PGNs interactúan con factores humorales (lisozima, CD14 soluble) y células (macrófagos y linfocitos) del hospedador induciendo la producción de citoquinas responsables de las manifestaciones clínicas en infecciones (fiebre, inflamación, etc.). Las PGRPs son proteínas de reconocimiento de PAMPs que unen (como el CD14 o el TLR) y en ciertos casos hidrolizan (como la lisozima) los PGNs presentes en la pared bacteriana. Es por ello que estas moléculas serían muy importantes a la hora de montar una defensa contra las infecciones bacterianas y, se encuentran altamente conservadas desde los insectos hasta los mamíferos. Estas se agrupan en tres clases: PGRP-S (*short*) (19-20 kDa), PGRP-I (*intermediate*), (40-45 kDa) y PGRP-L (*long*), (30-90 kDa). En los seres humanos se expresan 4 PGRPs distintas denominadas PGRP-S, PGRP-L, PGRP-I $\alpha$  y PGRP-I $\beta$  también nombradas como PGLYRP-1, PGLYRP-2, PGLYRP-3 y PGLYRP-4, respectivamente. Actualmente, las funciones de PGRPs en mamíferos son mucho menos entendidas que la de los insectos y hay poca certeza sobre que células expresan PGRPs. PGRP-S ha sido implicada en la destrucción intracelular de bacterias por PMNs, pero no se la detectó en LB, LT, ni en monocitos. Se detectó la presencia de PGRP-I $\alpha$  y de PGRP-I $\beta$  en células epiteliales y PGRP-L, la única con función enzimática, en el hígado o los LT. Menos se sabe aún acerca de los mecanismos que emplean para comunicar la presencia de bacterias.

Con el objetivo de estudiar el rol de estas proteínas en la RI innata, expresamos, replegamos *in vitro* y purificamos con un alto grado de pureza diferentes PGRP humanas en forma recombinante (PGRP-S, PGRP-I $\alpha$ C y PGRP-I $\beta$ N) obteniendo rendimientos de proteína correctamente plegada y purificada de aproximadamente 1-2 mg/L cultivo. Con ellas obtuvimos antisueros policlonales específicos para cada una de las PGRPs, los cuales no demostraron reactividad cruzada con lisozima ni con otras PGRPs, que fueron utilizados como herramientas biológicas para la detección de las mismas. Observamos que las PGRPs recombinantes dimerizaban por la formación de puentes disulfuro intermoleculares y demostramos que estos dímeros son funcionalmente activos, ya que son capaces de unir bacterias y PGNs.

Determinamos la presencia en saliva y en suero de PGRP-S sin embargo ni PGRP-I $\alpha$  ni PGRP-I $\beta$  fueron detectadas en ninguna de las muestras estudiadas. Por otro lado, comprobamos

la existencia de dímeros de PGRP-S en PMN humanos y observamos que se secretaban. Comprobamos que los dímeros se generan por la formación de puentes disulfuro intermoleculares sin perder su funcionalidad. Como se observara en el suero, los dímeros de PGRP-S estarían formados por la oxidación de Cys libres en la superficie del monómero ya que es sensible a la reducción con DTT. También detectamos PGRP-S en monocitos y PMN mientras que PGRP-I $\alpha$  fue detectada en células epiteliales alveolares .

Las PGRPs de mamíferos están descritas como proteínas solubles que actuarían como un puente entre el reconocimiento de PGN y la inducción de señales intracelulares, por lo que tendrían al menos dos sitios de interacción, uno para interactuar con el PGN y otro para hacerlo con proteínas efectoras del hospedador. Observamos que todas las PGRPs producidas no solo se unen a la superficie de los monocitos/macrófagos, sino que también, son endocitadas por estas células. No detectamos cambios al repetir los ensayos de endocitosis en presencia de Wortmanina en los cultivos, lo que sugiere que la macropinocitosis no jugaría un rol preponderante en la internalización de estas proteínas. Por otro lado, comprobamos que las PGRPs incrementan los niveles de expresión de NF- $\kappa$ B con respecto a los controles así como también lo hacen los complejos PGRP-PGN respecto a los controles de células tratadas con PGN, lo que sugeriría la existencia de un receptor celular que al interactuar con las PGRPs comunicaría la presencia de bacterias o fragmentos de PGN bacterianos. Sin embargo todos los intentos de coprecipitar este posible receptor no fueron exitosos.

En principio se observó que PGRP-S de origen murino y humano poseía acción bacteriostática mientras que la de origen bovino era bactericida, pero posteriormente, se demostró que si estaban glicosiladas podían actuar como bactericidas sobre ciertas especies bacterianas. Si bien observamos que las PGRPs aumentaban el daño en las membranas de las bacterias, no detectamos efectos bactericidas ni bacteriostáticos, sin embargo, la interacción de las PGRPs con la superficie de los monocitos/macrófagos genera en estos un aumento de la capacidad fagocítica, tanto para *S. aureus* como para sus PGNs, y determinan también, el desarrollo de un perfil proinflamatorio en monocitos/macrófagos al inducirse en ellos un aumento de la proliferación, en la expresión de marcadores de activación CD14, CD80, CD86 y CD11, y en la secreción de las citoquinas TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-12, IL-1 $\beta$  e IL-6 cuando se incuban con PGRPs en presencia o ausencia de PGNs. Además, observamos que las PGRPs disminuyen la acción de los PGNs en los

procesos de apoptosis temprana y en el daño que estos causan sobre las membranas de estas células, al tiempo que aumentan su actividad metabólica.

Basándonos en lo descrito podemos concluir que PGRP-S humana sería un dímero natural que es expresado en PMN como una proteína de 45 kDa, la cual es secretada al medio cuando el PMN degranula, y que su presencia puede ser detectada en suero. Por otro lado, los resultados obtenidos sugieren que las PGRPs serían reconocidas por moléculas presentes en la superficie celular de los monocitos favoreciendo la fagocitosis de bacterias como el *S. aureus*, y el daño en las membranas de las mismas. Por último, las PGRPs aumentarían la activación así como también la proliferación celular y la secreción de CKs proinflamatorias aumentando de esta manera, la respuesta inflamatoria, y por otra parte, estas tendrían un efecto protector sobre los monocitos/macrófagos, bloqueando la acción de los PGNs sobre los mismos.

# Bibliografía

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. 2012. Inunología celular y molecular. 7ª Edición. Editorial Elsevier.
- Araki Y, Nakatani T, Nakayama K, Ito E. Occurrence of N-nonsubstituted glucosamine residues in peptidoglycan of lysozyme-resistant cell walls from *Bacillus cereus*. *J Biol Chem* 1972; **247**:6312-22.
- Bischoff V, Vignal C, Duvic B, Boneca IG, Hoffmann JA, Royet J. Downregulation of the *Drosophila* immune response by peptidoglycan-recognition proteins SC1 and SC2. *PLoS Pathog.* 2:14, 2006.
- Blanco GA, Malchiodi EL, De Marzi MC. Cellular clot formation in a sipunculan worm: entrapment of foreign particles, cell death and identification of a peptidoglycan recognition protein antigen. *J Invertebr Pathol* 2008; **99**:156-65.
- Bosco-Drayon V, Poidevin M, Boneca IG, Narbonne-Reveau K, Royet J, Charroux B. Peptidoglycan sensing by the receptor PGRP-LE in the *Drosophila* gut induces immune response to infectious bacteria and tolerance to microbiota. *Cell Host Microbe* 2012; **12**:153-65.
- Bu H, Wang X, Tang Y, Koti V, Tan X. Toll-Like receptor 2-mediated peptidoglycan uptake by immature intestinal epithelial cells from apical side and exosome-associated transcellular transcytosis. *J Cell Physiol* 2010; **222**:658-68.
- Chau TA, McCully ML, Brintnell W, An G, Kasper KJ, Vinés ED, Kubes P, Haeryfar SM, McCormick JK, Cairns E, Heinrichs DE, Madrenas J. Toll-like receptor 2 ligands on the staphylococcal cell wall downregulate superantigen-induced T cell activation and prevent toxic shock syndrome *Nat Med.* **2009** Jun;15(6):641-8.
- Cheng X, Zhang X, Pflugrath JW, Studier FW. The structure of bacteriophage T7 lysozyme, a zinc amidase and an inhibitor of T7 RNA polymerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:4034-8, 1994.
- Cho JH, Fraser IP, Fukase K, Kusumoto S, Fujimoto Y, Stahl GL, Ezekowitz RA. Human peptidoglycan recognition protein S is an effector of neutrophil-mediated innate immunity. *Blood* 2005; **106**:2551-8.
- Cho S, Wang Q, Swaminathan CP, Heseck D, Lee M, Boons GJ, Mobashery S, Mariuzza RA. Structural insights into the bactericidal mechanism of human peptidoglycan recognition proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007; **104**:8761-6.

- Choe KM, Werner T, Stoven S, Hultmark D, Anderson KV. Requirement for a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in Relish activation and antibacterial immune responses in *Drosophila*. *Science* 2002; **296**:359-62.
- Christophides GK, Zdobnov E, Barillas-Mury C, Birney E, Blandin S, Blass C, Brey PT, Collins FH, Danielli A, Dimopoulos G, Hetru C, Hoa NT, Hoffmann JA, Kanzok SM, Letunic I, Levashina EA, Loukeris TG, Lycett G, Meister S, Michel K, Moita LF, Müller HM, Osta MA, Paskewitz SM, Reichhart JM, Rzhetsky A, Troxler L, Vernick KD, Vlachou D, Volz J, von Mering C, Xu J, Zheng L, Bork P, Kafatos FC. Immunity-related genes and gene families in *Anopheles gambiae*. *Science*. 4:29:159-65, 2002.
- Doyle, R.J. and Dziarski, R. Peptidoglycan. In *Molecular Medical Microbiology* (Sussman, M., ed.), Academic Press, pp. 137-153, 2001.
- Duerr CU, Salzman NH, Dupont A, Szabo A, Normark BH, Locksley RM, Mellroth P, Hornef MW. Control of intestinal Nod2-mediated peptidoglycan recognition by epithelium-associated lymphocytes. *Mucosal Immunol* 2011; **4**:325-34.
- Dukhanina EA, Kabanova OD, Lukyanova TI, Shatalov YV, Yashin DV, Romanova EA, Gnuchev NV, Galkin AV, Georgiev GP, Sashchenko LP. Opposite roles of metastasin (S100A4) in two potentially tumoricidal mechanisms involving human lymphocyte protein Tag7 and Hsp70. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009; **106**:13963-7.
- Dukhanina EA, Yashin DV, Galkin AV, Sashchenko LP. Unexpected deeds of familiar proteins: Interplay of Hsp70, PGRP-S/Tag7 and S100A4/Mts1 in host vs. cancer combat. *Cell Cycle* 2010; **9**:676-82.
- Dziarski, R., Ulmer, A. J., Gupta, D. Interactions of CD14 with components of gram-positive bacteria. *Chem. Immunol* 2000; **74**:83–107. Review.
- Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Mol Immunol* 2004; **40**:877-86. Review.
- Dziarski R, Gupta D. Mammalian PGRPs: novel antibacterial proteins. *Cell Microbiol* 2006 (a); **8**:1059-69. Review.
- Dziarski R, Gupta D. Staphylococcus aureus peptidoglycan is a toll-like receptor 2 activator: a reevaluation. *Infect Immun* 2005; **73**:5212-6.
- Dziarski R, Gupta D. The peptidoglycan recognition proteins (PGRPs). *Genome Biol.* 2006 (b); **7**:232. Review.

- Dziarski R, Gupta D, Royet J. Peptidoglycan recognition proteins : modulators of the microbiome and inflammation. *Nature* 2011; **11**:837-851. Review.
- Dziarski R, Platt KA, Gelius E, Steiner H, Gupta D. Defect in neutrophil killing and increased susceptibility to infection with non-pathogenic Gram-positive bacteria in peptidoglycan recognition protein-S (PGRP-S)-deficient mice. *Blood* 2003; **102**:689–97.
- Fernández MM, Cho S, De Marzi MC, Kerzic MC, Robinson H, Mariuzza RA, Malchiodi EL. Crystal structure of staphylococcal enterotoxin G (SEG) in complex with a mouse T-cell receptor {beta} chain. *J Biol Chem* 2011; **286**:1189-95.
- Fernández MM, De Marzi MC, Berguer P, Burzyn D, Langley RJ, Piazzon I, Mariuzza RA, Malchiodi EL. Binding of natural variants of staphylococcal superantigens SEG and SEI to TCR and MHC class II molecule. *Mol Immunol.* 2006; **43**:927-38.
- Garver LS, Wu J, Wu LP. The peptidoglycan recognition protein PGRP-SC1a is essential for Toll signaling and phagocytosis of *Staphylococcus aureus* in *Drosophila*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006; **103**:660-5.
- Gelius E, Persson C, Karlsson J, Steiner H. A mammalian peptidoglycan recognition protein with N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 306, 988-94, 2003.
- Gottar M, Gobert V, Michel T, Belvin M, Duyk G, Hoffmann JA, Ferrandon D, Royet J. The *Drosophila* immune response against Gram-negative bacteria is mediated by a peptidoglycan recognition protein. *Nature* 416, 640-4, 2002.
- Gobert V, Gottar M, Matskevich AA, Rutschmann S, Royet J, Belvin M, Hoffmann JA, Ferrandon D. Dual activation of the *Drosophila* toll pathway by two pattern recognition receptors. *Science* 2003; **302**:2126-30.
- Guan R, Malchiodi EL, Wang Q, Schuck P, Mariuzza RA. Crystal structure of the C-terminal peptidoglycan-binding domain of human peptidoglycan recognition protein Ia. *J Biol Chem* 2004 (a); **279**:31873-82.
- Guan R, Mariuzza RA. Peptidoglycan recognition proteins of the innate immune system. *Trends Microbiol* 2007; **15**:127-34. Review.
- Guan R, Roychowdury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ, Mariuzza RA. Crystal structure of a peptidoglycan recognition protein (PGRP) in complex with a muramyl tripeptide from Gram-positive bacteria. *J Endotoxin Res* 2005 (a); **11**:41-6.

- Guan R, Roychowdhury A, Ember B, Kumar S, Boons GJ, Mariuzza RA. Structural basis for peptidoglycan binding by peptidoglycan recognition proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004 (b); **101**:17168-73.
- Guan R, Wang Q, Sundberg EJ, Mariuzza RA. Crystal structure of human peptidoglycan recognition protein S (PGRP-S) at 1.70 Å resolution. *J Mol Biol* 2005 (b); **347**:683-91.
- Gupta D, Kirkland TN, Viriyakosol S, Dziarski R. CD14 is a cell-activating receptor for bacterial peptidoglycan. *J Biol Chem*. 271(38):23310-6, 1996.
- Hoffmann JA. The immune response of *Drosophila*. *Nature* 2003; **426**:33-8. Review.
- Hultmark D. *Drosophila* immunity: paths and patterns. *Curr Opin Immunol* 2003; **15**:12-9. Review.
- Jönsson U, Fägerstam L, Ivarsson B, Johnsson B, Karlsson R, Lundh K, Löfas S, Persson B, Roos H, Rönnerberg I. 1991. Real-time biospecific interaction analysis using surface Plasmon resonance and sensor chip technology. *Biotechniques*. 11:620-627.
- Kaneko T, Goldman WE, Mellroth P, Steiner H, Fukase K, Kusumoto S, Harley W, Fox A, Golenbock D, Silverman N. Monomeric and polymeric gram-negative peptidoglycan but not purified LPS stimulate the *Drosophila* IMD pathway. *Immunity* 20, 637-49, 2004.
- Kang D, Liu G, Lundstrom A, Gelius E, Steiner H. A peptidoglycan recognition protein in innate immunity conserved from insects to mammals. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; **95**:10078–82.
- Kashyap DR, Rompca A, Gaballa A. Peptidoglycan recognition protein kill bacteria by inducing oxidative, thiol, and metal stress. *Plus Pathog* 2014, **10** :1004280.
- Kim, M.-S., Byun, M., Oh, B.-H. Crystal structure of peptidoglycan recognition protein LB from *Drosophila melanogaster*. *Nature Immunol* 2003; **4**:787–93.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227(5259): 680-685.
- Leulier F, Parquet C, Pili-Floury S, Ryu JH, Caroff M, Lee WJ, Mengin-Lecreulx D, Lemaitre B. The *Drosophila* immune system detects bacteria through specific peptidoglycan recognition. *Nat Immunol*. 4, 478-84, 2003.
- Liu, C., Gelius, E., Liu, G., Steiner, H., Dziarski, R. Mammalian peptidoglycan recognition protein binds peptidoglycan with high affinity, is expressed in neutrophils, and inhibits bacterial growth. *J Biol Chem* 2000; **275**:24490–9.



- Liu C, Xu Z, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: a novel family of four human innate immunity pattern recognition molecules. *J Biol Chem* 2001; **276**:34686–94.
- Lu X, Wang M, Qi J, Wang H, Li X, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins are a new class of human bactericidal proteins. *J Biol Chem* 2006; **281**:5895-907.
- Ma P, Wang Z, Pflugfelder SC, D. Toll-like receptors mediate induction of peptidoglycan recognition proteins in human corneal epithelial cells. *Experimental Eye Research* 2010; **90**:130–6.
- Margni, R. A. 1996 Inmunología e inmunoquímica. Fundamentos, Buenos Aires, 5ª Edición. Editorial *Panamericana*.
- Mathur P, Murray B, Crowell T, Gardner H, Allaire N, Hsu YM, Thill G, Carulli JP. Murine peptidoglycan recognition proteins PglyrpIalpha and PglyrpIbeta are encoded in the epidermal differentiation complex and are expressed in epidermal and hematopoietic tissues. *Genomics.*; 83(6):1151-63, 2004.
- Medzhitov, R, Janeway, Ca Jr. Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296, 298-300, 2002.
- Mellroth P, Karlsson J, Steiner H. A scavenger function for a *Drosophila* peptidoglycan recognition protein. *J Biol Chem* 2003; **278**:7059–64.
- Michel T, Reichhart JM, Hoffmann JA, Royet J. *Drosophila* Toll is activated by Gram-positive bacteria through a circulating peptidoglycan recognition protein. *Nature* 414, 756-9, 2001.
- Murphy K. 2009. Inmunología de Janeway. 7ª Edición. Editorial *MCGRAW-HILL*
- Nguyen HA, Grellet J, Paillard D, Dubois V, Quentin C, Saux MC. . Factors influencing the intracellular activity of fluoroquinolones: a study using levofloxacin in a *Staphylococcus aureus* THP-1 monocyte model. *J Antimicrob Chemother.* 57:883-90, 2006.
- Onoe H, Matsumoto A, Hashimoto K, Yamano Y, Morishima I. Peptidoglycan recognition protein (PGRP) from eri-silkworm, *Samia cynthia ricini*; protein purification and induction of the gene expression. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2007; **147**(3):512-9.
- Osanai A, Sashinami H, Asano K, Li S, Hu D, Nakane A. Mouse Peptidoglycan Recognition Protein PGLYRP-1 Plays a Role in the Host Innate Immune Response against *Listeria monocytogenes* Infection. *Infect Immun* 2011; **79**:858–66.

- Paillard D, Grellet J, Dubois V, Saux MC, Quentin C. Discrepancy between uptake and intracellular activity of moxifloxacin in a *Staphylococcus aureus*-human THP-1 monocytic cell model. *Antimicrob Agents Chemother.*46:288-93, 2002.
- Pennimpede EFF, Gómez CM, Stanchi NO. 2003 Introducción a la inmunología 1ª. Edición. Editorial *Edulp*.
- Ramet M, Manfrulli P, Pearson A, Mathey-Prevot B, Ezekowitz RA. Functional genomic analysis of phagocytosis and identification of *Drosophila* receptor for *E. coli*. *Nature* 2002; **416**:644-8.
- Reiser JB, Teyton L, Wilson IA. Crystal structure of the *Drosophila* peptidoglycan recognition protein (PGRP)-SA at 1.56 Å resolution. *J Mol Biol* 2004; **340**:909-17.
- Romasanta PN, Curto LM, Urtasun N, Sarratea MB, Chiappini S, Miranda MV, Delfino JM, Mariuzza RA, Fernández MM, Malchiodi EL. A positive cooperativity binding model between Ly49 natural killer cell receptors and the viral immunoevasin m157: kinetic and thermodynamic studies. *J Biol Chem* 2014; **289**:5083-96.
- Saha S, Jing X, Park SY, Wang S, Li X, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins protect mice from experimental colitis by promoting normal gut flora and preventing induction of interferon-gamma. *Cell Host Microbe*. 2010 Aug 19;8(2):147-62.
- Salinovich O, Montelaro RC. 1986. Reversible staining and peptide mapping of proteins transferred to nitrocellulose after separation by sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Anal. Biochem.* 156 (2): 341-347.
- Sambrook J, Russell D 2001. *Molecular Cloning, A laboratory Manual*, Volumen 1, capítulo 1, Volumen 2, capítulo 8. 3ª Edición.
- Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separations of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem.*166: 368-379.
- Schleifer KH, Kandler O. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol Rev.*36:407-77, 1972 .Review
- Sharma P, Yamini S, Dube D, Singh A, Sinha A, Dey S, Mitra DK, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Structural studies on molecular interactions between camel Peptidoglycan Recognition Protein, CPGRP-S, and peptidoglycan moieties N-acetylglucosamine and N-acetylmuramic acid. *J Biol Chem* 2012; **287**:22153–64.

- Sharma P, Dube D, Sinha M, Yadav S, Kaur P, Sharma S, Singh TP. Structural insights into the dual strategy of recognition by Peptidoglycan Recognition Protein, PGRP-S: structure of the ternary complex of PGRP-S with lipopolysaccharide and stearic acid. *PLoS One* 2013 (a); **8**:53756.
- Sharma P, Yamini S, Dube D, Singh A, Mal G, Pandey N, Sinha A, Singh AK, Dey S, Kaur P, Mitra DK, Sharma S, Singh TP. Structural basis of the binding of fatty acids to Peptidoglycan Recognition Protein, PGRP-S through second binding site. *Arch Biochem Biophys* 2013 (b); **529**:1–10.
- Takehana A, Yano T, Mita S, Kotani A, Oshima Y, Kurata S. Peptidoglycan recognition protein (PGRP)-LE and PGRP-LC act synergistically in *Drosophila* immunity. *EMBO J.* 24;23(23):4690-700, 2004.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 76 (9): 4350-4354.
- Travassos LH, Girardin SE, Philpott DJ, Blanot D, Nahori MA, Werts C, Boneca IG. Toll-like receptor 2-dependent bacterial sensing does not occur via peptidoglycan recognition. *EMBO*; 5(10):1000-6, 2004
- Tydell CC, Yount N, Tran D, Yuan J, Selsted ME. Isolation, characterization, and antimicrobial properties of bovine oligosaccharide-binding protein. A microbicidal granule protein of eosinophils and neutrophils. *J Biol Chem.* 277:19658-64, 2002.
- Tydell CC, Yuan J, Tran P, Selsted ME. Bovine peptidoglycan recognition protein-S: antimicrobial activity, localization, secretion, and binding properties. *J Immunol.* 176(2):1154-62, 2006.
- Uversky VN. 1993. Use of fast protein size-exclusion liquid chromatography to study the unfolding of proteins which denature through the molten globule. *Biochemistry.*32(48): 13288-13298.
- Voller A, Bartlett A, Bidwell DE. 1978. Enzyme immunoassays with special reference to ELISA techniques. *J Clin Pathol.* 31(6): 507-520.
- Wang JE, Jørgensen PF, Almlöf M, Thiemermann C, Foster SJ, Aasen AO, Solberg R. Peptidoglycan and lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus* induce tumor necrosis

- factor alpha, interleukin 6 (IL-6), and IL-10 production in both T cells and monocytes in a human whole blood model. *Infect Immun* 2000 (a); **68**:3965-70.
- Wang M, Liu L, Wang S, Li X, Lu X, Gupta D, Dziarski R. Human Peptidoglycan Recognition Proteins Require Zinc to Kill Both Gram-Positive and Gram-Negative Bacteria and Are Synergistic with Antibacterial Peptides. *J Immunol* 2007; **178**: 3116–25.
- Wang ZM, Li X, Cocklin RR, Wang M, Wang M, Fukase K, Inamura S, Kusumoto S, Gupta D, Dziarski R. Human peptidoglycan recognition protein-L (PGRP-L) is an *N*-acetylmuramoyl- l-alanine amidase. *J Biol Chem* 2003; **278**:49044-52.
- Wang ZM, Liu C, Dziarski R. Chemokines are the main proinflammatory mediators in human monocytes activated by *Staphylococcus aureus*, peptidoglycan, and endotoxin. *J Biol Chem* 2000 (b); **275**(27):20260-7.
- Weidemann B, Schletter J, Dziarski R, Kusumoto S, Stelter F, Rietschel ET, Flad HD, Ulmer A. Specific binding of soluble peptidoglycan and muramyl dipeptide to CD14 on human monocytes. *J Infect Immun* 1997; **65**:858–64.
- Wenzel M, Chiriac AI, Otto A, Zweytick D, May C, Schumacher C, Gust R, Albada HB, Penkova M, Krämer U, Erdmann R, Metzler-Nolte N, Straus SK, Bremer E, Becher D, Brötz-Oesterhelt H, Sahl HG, Bandow JE. Small cationic antimicrobial peptides delocalize peripheral membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; **111**:E1409-18.
- Werner T, Liu G, Kang D, Ekengren S, Steiner H, Hultmark D. A family of peptidoglycan recognition proteins in the fruit fly *Drosophila melanogaster*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; **97**:13772–77.
- Wullaert A., van Loo G., Heyninck K. y Beyaert R.. Hepatic tumor necrosis factor signaling and nuclear factor- $\kappa$ B: effects on liver homeostasis and beyond. Endocrine reviews 2007; **28**(4), 365-386.
- Xu M, Wang Z, Locksley RM. Innate immune responses in peptidoglycan recognition protein L-deficient mice. *Mol Cell Biol* 2004; **24**:7949-57.
- Yano T, Kurata S. Intracellular recognition of pathogen and autophagy as an innate immune host defence. *J Biochem* 2011; **150**:143-9.
- Yashin DV, Dukhanina EA, Kabanova OD, Romanova EA, Lukyanova TI, Tonevitskii AG, Raynes DA, Gnuchev NV, Guerriero V, Georgiev GP, Sashchenko LP. The heat shock-

- binding protein (HspBP1) protects cells against the cytotoxic action of the Tag7-Hsp70 complex. *J Biol Chem* 2011; **286**:10258-64.
- Yoshida, H., Kinoshita, K., Ashida, M. Purification of peptidoglycan recognition protein from hemolymph of the silkworm, *Bombyx mori*. *J Biol Chem* 1996; **271**:13854–60
- Yoshimura, A., Lien, E., Ingalls, R. R., Tuomanen, E., Dziarski, R., Golenbock, D. Cutting edge: recognition of Gram-positive bacteria cell wall components by the innate immune system occurs via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 1999; **163**:1–5.
- Zhang Y, van der Fits L, Voerman JS, Melief MJ, Laman JD, Wang M, Wang H, Wang M, Li X, Walls CD, Gupta D, Dziarski R. Identification of serum N-acetylmuramoyl-l-alanine amidase as liver peptidoglycan recognition protein 2. *Biochim Biophys Acta* 2005; **1752**:34-46.