Universidad ORT Uruguay

Facultad de Ingeniería

Producción recombinante de la proteasa RgpB de *Porphyromonas gingivalis* y búsqueda de inhibidores

Entregado como requisito para la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

Nicole Gebelin – 211237

Tutores: Martín Fló y Bruno Manta

2025

Declaración de Autoría

Yo, Nicole Gebelin, declaro que el trabajo que se presenta en esa obra es de mi propia mano. Puedo asegurar que:

- La obra fue producida en su totalidad mientras realizaba el Trabajo Final de Carrera de Ingeniería en Biotecnología;
- Cuando he consultado el trabajo publicado por otros, lo he atribuido con claridad;
- Cuando he citado obras de otros, he indicado las fuentes. Con excepción de estas citas, la obra es enteramente mía;
- En la obra, he acusado recibo de las ayudas recibidas;
- Cuando la obra se basa en trabajo realizado conjuntamente con otros, he explicado claramente qué fue contribuido por otros, y qué fue contribuido por mí;
- Ninguna parte de este trabajo ha sido publicada previamente a su entrega, excepto donde se han realizado las aclaraciones correspondientes.

Nicole Gebelin

7 de marzo de 2025

Agradecimientos

Agradezco en primer lugar a mis tutores, Bruno Manta y Martín Fló, por todo su apoyo y orientación a lo largo de este trabajo. Les agradezco por siempre priorizar mi formación y aprendizaje, dándome independencia para llevar adelante este proyecto por mí misma, sin dejar de ayudarme siempre que lo necesité. Gracias por su amabilidad, confianza y paciencia.

A Marcelo Comini, por su buena disposición en todo momento y sus aportes para explorar caminos alternativos, que hicieron de este trabajo más enriquecedor. Le agradezco por facilitar la quimioteca del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos para la búsqueda de compuestos.

A todos los integrantes del Laboratorio de Inmunovirología, especialmente a Federico Carrión, Natalia Olivero e Ignacio García, por involucrarse en el proyecto, brindándome su ayuda y orientación en la expresión en células S2. Agradezco a Mariana Salinas por su apoyo y compañía desde el primer día.

A todos los integrantes del Laboratorio de Genómica Microbiana, en especial a Marisabel Charlo, por compartir su conocimiento y estar siempre dispuesta a responder mis dudas sobre *P. gingivalis*. Agradezco a Valeria Flórez y Belén Márquez, por ayudarme, aconsejarme y acompañarme en mi día a día.

Al Institut Pasteur de Montevideo por financiar el proyecto y abrirme sus puertas para realizar mi Trabajo Final de Carrera en el marco de este. A sus integrantes, por su generosidad y amabilidad.

A mis compañeros y amigos de la carrera, especialmente a Agus, Lea y Facu, por recorrer este camino conmigo, apoyarme y aconsejarme siempre. A mis amigos, por animarme y brindarme su amistad incondicional, estando cerca o lejos.

A mi familia, por su cariño y contención en los momentos difíciles. Especialmente a mis padres, por todas las oportunidades que me han dado a lo largo de mi vida y creer en mí. Gracias por estar siempre a mi lado, alentándome en cada paso de este camino.

Este trabajo no hubiera sido posible sin todos ustedes.

Resumen

La bacteria *Porphyromonas gingivalis* es uno de los patógenos claves asociados al desarrollo y progresión de la periodontitis, una forma avanzada de enfermedad periodontal. Se caracteriza por ser una enfermedad inflamatoria, inmunológica y crónica, que trae como consecuencia la destrucción progresiva e irreversible de los tejidos de soporte dental.

Las gingipaínas son un conjunto de proteasas de cisteína con especificidad por arginina (RgpA y RgpB) o lisina (Kgp), responsables de la mayor parte de la actividad proteolítica en la superficie extracelular de *P. gingivalis*. Son importantes factores de virulencia, estando involucradas en la degradación de proteínas y tejidos del hospedero, la adherencia y colonización de células epiteliales, la hemaglutinación y hemólisis de glóbulos rojos, y la evasión de la respuesta inmune. Recientemente se han relacionado, junto con la periodontitis, con otras afecciones sistémicas, como las enfermedades cardiovasculares, la enfermedad de Alzheimer, la artritis reumatoide y los resultados adversos del embarazo. En los últimos años, ha habido un interés creciente por el desarrollo de inhibidores específicos de gingipaínas, como blancos para el tratamiento de la periodontitis y las enfermedades asociadas.

El presente Trabajo Final de Carrera tiene como objetivo la producción recombinante de la proteasa de cisteína RgpB, como modelo de gingipaína, con el fin de estudiar una farmacopea de alta diversidad química, en busca de potenciales inhibidores.

Se expresó el zimógeno de la RgpB de forma heteróloga en *Escherichia coli*, implementando diferentes estrategias de expresión y purificación para obtenerla de forma soluble y activa, con un rendimiento de 0,92 mg por litro de cultivo. Este es el primer reporte de expresión exitosa de una gingipaína soluble y activa en *E. coli*. A su vez, se alcanzó la expresión recombinante del zimógeno de la RgpB en la línea celular S2, siendo el primer reporte de su expresión en células de insecto.

Se puso a punto un ensayo de actividad de la RgpB utilizando un sustrato fluorogénico, que permitirá la futura caracterización bioquímica de la enzima junto con la evaluación de potenciales inhibidores *in vitro*.

Se realizó una primera búsqueda de inhibidores *in silico*, encontrando tres compuestos candidatos, pertenecientes a un espacio químico diferente a moléculas patentadas. Este trabajo sienta las bases para la futura búsqueda y caracterización de moléculas inhibidoras de RgpB con potencial farmacológico.

Palabras Clave

Porphyromonas gingivalis, gingipaína, RgpB, inhibidor, proteasa, proteína recombinante.

Abreviaturas

μg	microgramo(s)
μL	microlitro(s)
μM	micromolar(es)
°C	grado(s) Celsius
2YT	medio 2x extracto de levadura triptona, del inglés 2x *yeast extract tryptone*
Ac	acetilo
AC	cromatografía de afinidad, del inglés *affinity chromatography*
ADN	ácido desoxirribonucleico
ARN	ácido ribonucleico
Bis-Tris	bis(2-hidroxietil)amino-tris(hidroximetil)metano
Boc	tert-butiloxicarbonilo
BSA	albúmina de suero bovina, del inglés *bovine serum albumin*
CelD	endoglucanasa D, del inglés *endoglucanase D*
CTD	dominio C-terminal, del inglés *C-terminal domain*
CV	volumen(es) de columna, del inglés *column volume(s)*
Da	dalton(s)
DMSO	dimetilsulfóxido
DNAsa	desoxirribonucleasa
DsbC	disulfuro isomerasa C, del inglés *disulfide bond isomerase C*
DTT	ditiotreitol

FPLC	cromatografía líquida de proteínas a alta velocidad, del inglés *fast protein liquid chromatography*
g	gramo(s)
g	unidad de fuerza gravitatoria
GST	glutatión S-transferasa
h	hora(s)
HRP	peroxidasa de rábano, del inglés *horseradish peroxidase*
IEX	cromatografía de intercambio iónico, del inglés *ion exchange chromatography*
IMAC	cromatografía de afinidad por metales inmovilizados, del inglés *immobilized metal ion affinity chromatography*
IMZ	imidazol
IPTG	isopropil-β-D-tiogalactopiranósido
k_{cat}	constante catalítica
kDa	kilodalton(s)
Kgp	gingipaína lisina-específica, del inglés *lysine-specific gingipain*
K_i	constante de inhibición
K_M	constante de Michaelis-Menten
L	litro(s)
LB	caldo de lisogenia, del inglés *lysogeny broth*
M	molar(es)
mA	miliampere(s)
MBP	proteína de unión a maltosa, del inglés *maltose binding protein*

mg	miligramo(s)
min	minuto(s)
mL	mililitro(s)
mM	milimolar(es)
MPM	marcador de peso molecular
ng	nanogramo(s)
nm	nanómetro(s)
nM	nanomolar(es)
OD_{600}	densidad óptica a 600nm, del inglés *optical density*
ON	durante la noche, del inglés *over night*
PBS	amortiguador fosfato salino, del inglés *phosphate-buffered saline*
pH	potencial de hidrógeno
pI	punto isoeléctrico
PMSF	fluoruro de fenilmetilsulfonilo, del inglés *phenylmethylsulfonyl fluoride*
RFU	unidades de fluorescencia relativas, del inglés *relative fluorescence units*
RgpA	gingipaína arginina-específica A, del inglés *arginine-specific gingipain A*
RgpB	gingipaína arginina-específica B, del inglés *arginine-specific gingipain B*
rpm	revoluciones por minuto
s	segundo(s)
SDS	dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate*
SDS-PAGE	electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, del inglés *sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SEC	cromatografía de exclusión molecular, del inglés *size exclusion chromatography*
SUMO	pequeña proteína modificadora similar a ubiquitina, del inglés *small ubiquitin-like modifier protein*
T9SS	sistema de secreción tipo IX, del inglés *type IX secretion system*
TB	caldo *terrific*, del inglés *terrific broth*
TEMED	tetrametiletilendiamina
TEVp	proteasa del virus del mosaico del tabaco, del inglés *tobacco etch virus protease*
Tris	tris(hidroximetil)aminometano
Trx	tiorredoxina
UI	unidad(es) internacional(es)
Z	carboxibencilo

Tabla de contenido

1. Introducción 14

1.1. Periodontitis 14

1.2. *Porphyromonas gingivalis* 16

1.3. Gingipaínas 18

1.4. RgpB 21

1.5. Inhibidores de gingipaínas 22

1.6. Producción de recombinante de RgpB 25

2. Objetivos 28

2.1. Objetivo general 28

2.2. Objetivos específicos 28

3. Metodología 29

3.1. Materiales 29

3.1.1. Plásmidos 29

3.1.2. Cepas y línea celular 29

3.1.3. Medios de cultivo 29

3.1.4. Soluciones 30

3.2. Reactivos generales 31

3.3. Procedimientos generales 31

3.3.1. Construcción de vectores de expresión 31

3.3.2. Preparación de *E. coli* quimiocompetentes 34

3.3.3. Transformación de *E. coli* por choque térmico 34

3.3.4. Obtención de vectores de expresión 35

3.3.5. Expresión de RgpB recombinante en *E. coli* 35

3.3.5.1. Expresión en medio TB 36

3.3.5.2. Expresión por autoinducción 36

3.3.6. Lisis bacteriana 36

3.3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida 37

3.3.8. Purificación del zimógeno de RgpB por IMAC 37

3.3.8.1. Purificación por IMAC en *batch* 37

3.3.8.2. Purificación por IMAC en FPLC 38

3.3.9. Purificación del zimógeno de RgpB por IEX 38

3.3.10. Expresión y purificación de la proteasa TEV 38

3.3.11. Activación de RgpB por digestión con TEVp y posterior purificación 39

3.3.12. Purificación de RgpB por cromatografía de afinidad a benzamidina 40

3.3.13. Cultivo de células S2 40

3.3.14. Expresión de RgpB recombinante en S2 41

3.3.15. *Western blot* 41

3.3.16. Cuantificación de RgpB 42

3.3.17. Determinación de la actividad 43

3.3.18. Cribado de compuestos inhibidores 43

4. Resultados y discusión 44

4.1. Expresión de RgpB recombinante 44

4.1.1. Expresión de Pro-RgpB en *E. coli* 44

4.1.2. Expresión de Pro-RgpB en S2 48

4.2. Purificación de RgpB expresada en *E. coli* 50

4.2.1. Purificación por dos IMAC 50

4.2.2. Alternativas de purificación por dos IMAC 54

4.2.3. Purificación de RgpB por afinidad a benzamidina 57

4.2.4. Purificación de Pro-RgpB por intercambio iónico 60

4.3. Cuantificación de la RgpB purificada 63

4.4. Puesta a punto del ensayo de actividad 66

4.5. Cribado de inhibidores 74

5. Conclusiones 78

6. Referencias bibliográficas 80

7. Anexos 96

7.1. Anexo 1 96

7.2. Anexo 2 97

1. Introducción

1.1. Periodontitis

La periodontitis es una enfermedad inflamatoria, inmunológica y crónica, caracterizada por la destrucción progresiva e irreversible de los tejidos de soporte dental, como la encía, el ligamento periodontal y el hueso alveolar, conocidos colectivamente como periodonto (1, 2). Resulta de la pérdida de la homeostasis entre la microbiota comensal residente en el espacio subgingival y el hospedero, debido a alteraciones en la abundancia o influencia de especies individuales dentro de la comunidad microbiana, en relación con su abundancia o influencia en salud (3, 4).

El desarrollo de la periodontitis se ve influenciado por factores de riesgo modificables como la higiene bucal, la dieta, el tabaquismo y el estrés, así como también por factores genéticos y condiciones adquiridas como enfermedades sistémicas, especialmente de carácter inflamatorio (4, 5). Los sujetos susceptibles se ven afectados por la acción de la comunidad microbiana disbiótica, que exhibe un efecto sinérgico de sus factores de virulencia. Esto no solo potencia la respuesta inflamatoria del hospedero, sino que también promueve su propia supervivencia mediante la alimentación cruzada de los productos obtenidos por la degradación de los tejidos (6, 7).

La respuesta inflamatoria es una reacción fisiológica que protege al organismo evitando que las infecciones bacterianas se propaguen a tejidos más profundos, como los huesos (8). Sin embargo, cuando la inflamación se desregula y persiste, como parte de una respuesta inmune descontrolada, puede generar un ciclo patogénico que se autoperpetúa, en el que la disbiosis y la inflamación se refuerzan mutuamente formando un ciclo de retroalimentación positiva (1). Con el tiempo, este ciclo puede provocar la destrucción irreversible de los tejidos de soporte dental, lo que resulta en la periodontitis y sus consecuencias sintomáticas, como las bolsas periodontales, la pérdida de inserción, las recesiones gingivales, la movilidad y migración dental, y finalmente la pérdida de dientes (8).

Las interacciones complejas entre las múltiples especies presentes en la microbiota oral que dan lugar a la periodontitis, se describen por primera vez en el modelo propuesto por Socransky y colaboradores (9), quienes identifican a *Porphyromonas gingivalis*, *Tannerella*

forsythia y *Treponema denticola* como especies que aparecen juntas con mayor frecuencia a medida que aumenta la gravedad de la enfermedad periodontal, denominando al grupo "el complejo rojo".

Los modelos actuales incorporan el concepto de patogenicidad comunitaria o nososimbiosis, donde el potencial patogénico colectivo depende tanto del resultado de las interacciones entre especies, como de la susceptibilidad del hospedero (4, 10). Los microorganismos interactúan física y metabólicamente a través de la coadhesión y el intercambio de moléculas de señalización difusibles y metabolitos. Estas interacciones pueden mejorar o suprimir la colonización y patogenicidad de la comunidad, y junto a su interacción con el hospedero, determinan los resultados homeostáticos o disbióticos (Figura 1.1) (11). Las propiedades de los microorganismos presentes y su especialización funcional en la comunidad dan lugar a varias categorías recientemente reconocidas dentro del espectro comensal-patógeno, como comensales homeostáticos, patógenos accesorios, patobiontes y patógenos clave (12). Estos últimos, como *P. gingivalis*, ejercen su influencia en baja abundancia modulando tanto la composición como los niveles de los microorganismos de la comunidad, y manipulando las respuestas del hospedero. De esta manera, pueden promover la formación y estabilización de comunidades microbianas disbióticas, que provocan el desarrollo de la enfermedad (11, 12).

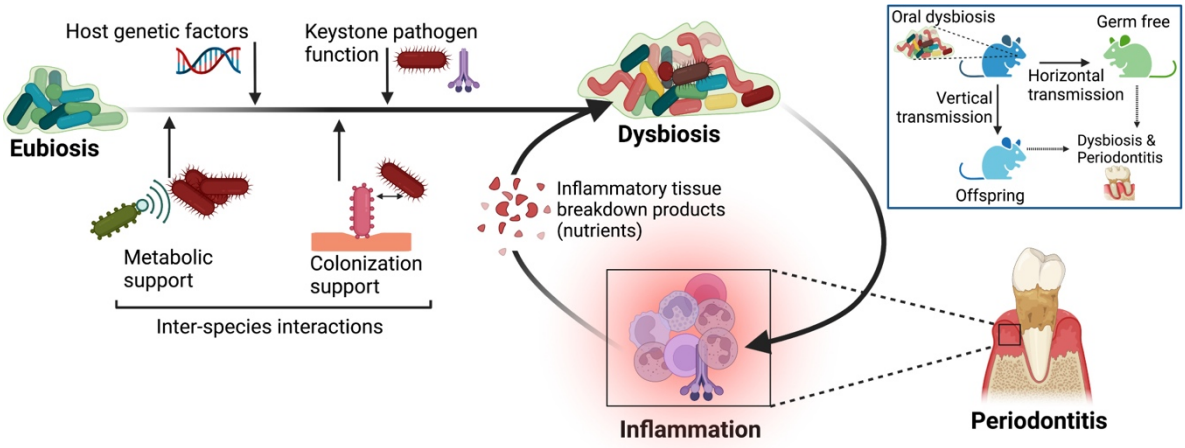

Figura 1.1. La interconexión de la disbiosis y la inflamación como impulsoras de la periodontitis. Se ilustra el rol de los factores genéticos, la función de los patógenos clave y las interacciones entre las especies de la microbiota, en el desarrollo de la disbiosis. Junto con la inflamación, se refuerzan mutuamente formando un ciclo patogénico que se autoperpetúa. Esquema extraído de (11).

En la actualidad, la periodontitis afecta al 19% de la población adulta a nivel mundial, y su prevalencia se encuentra en aumento, registrándose un incremento en los casos de casi 540 millones entre 1990 y 2019 (13).

El tratamiento de esta enfermedad se centra en eliminar el biofilm bacteriano supra y subgingival, con el objetivo de reducir la inflamación, detener la progresión y restaurar la salud periodontal (14). El tratamiento inicial consiste en la remoción mecánica del biofilm de forma no quirúrgica, pudiendo estar acompañada de la administración de antisépticos o antibióticos de amplio espectro. Usualmente se administran conjuntamente amoxicilina y metronidazol, pudiendo administrarse ácido clavulánico, azitromicina, ciprofloxacino, tetraciclina o doxiciclina (15, 16). Dado que el biofilm está formado por un consorcio heterogéneo de múltiples especies, envuelto en una matriz de exopolisacáridos protectora, dificulta la difusión de antibióticos y antisépticos, disminuyendo su eficacia (16). A su vez, la resistencia a antibióticos es una creciente preocupación, no solo en la periodontitis sino en la medicina general, existiendo reportes de resistencia a amoxicilina, metronidazol, clindamicina, azitromicina, penicilina y tetraciclina en bacterias subgingivales cultivables (17–19). Considerando que alrededor del 25% de los pacientes no resuelven totalmente su cuadro de periodontitis con este tratamiento y requieren intervenciones quirúrgicas, el desarrollo de tratamientos no quirúrgicos alternativos resulta de alta importancia (20, 21). En este sentido, la búsqueda de compuestos capaces de actuar de forma específica sobre los patógenos clave, como *P. gingivalis*, representa una estrategia prometedora para controlar la disbiosis y así mejorar los resultados terapéuticos (22).

1.2. *Porphyromonas gingivalis*

La bacteria *Porphyromonas gingivalis* es un bacilo gramnegativo, anaerobio estricto, no móvil, no esporulante, que forma parte de la microbiota bucal subgingival. Está presente naturalmente en la cavidad bucal, encontrándose en niveles detectables solo en un 25% de las personas sanas (23). Sin embargo, *P. gingivalis* puede detectarse en un 80 a 85% de los sujetos con bolsas periodontales profundas, sitio inflamatorio que se forma por debajo de la encía como producto de la separación con el diente, clínicamente asociado a la periodontitis (23, 24).

Se encuentra principalmente en lesiones periodontales sangrantes en las bolsas profundas. Allí, los niveles oxígeno bajos permiten su crecimiento, y la hemoglobina resultante de la hemólisis de glóbulos rojos constituye una fuente de hemo abundante, para el cual *P. gingivalis* es auxótrofa (25). A diferencia de otros miembros del género *Porphyromonas*, capaces de crecer a partir de carbohidratos complejos, *P. gingivalis* es asacarolítica y depende de sustratos nitrogenados como proteínas o péptidos para nutrirse y obtener energía metabólica (26).

Se considera uno de los patógenos clave en el desarrollo y progresión de la periodontitis, siendo capaz de colonizar la cavidad bucal e inducir la enfermedad en modelos murinos. Sin embargo, no es capaz de inducir por sí sola el desarrollo de la periodontitis en ratones libres de gérmenes, sugiriendo que requiere de la asociación con una comunidad polimicrobiana (27, 28). En particular, *P. gingivalis* requiere de microorganismos como *Streptococcus gordonii* y *Fusobacterium nucleatum*, para crear condiciones ambientales que le permitan establecerse. Estos facilitan su colonización al proveer sitios de fijación para la adherencia. Además, suministran metabolitos y reducen de la tensión de oxígeno a niveles lo suficientemente bajos para el crecimiento y la supervivencia de este anaerobio (26, 29).

Incluso en una baja abundancia relativa en la microbiota bucal, *P. gingivalis* contribuye desproporcionadamente a la patogenicidad comunitaria, al manipular la respuesta inmune e inflamatoria del hospedero (4, 10). Desregula principalmente la inmunidad innata, promoviendo la activación de los neutrófilos y, simultáneamente, inhibiendo sus mecanismos bactericidas, lo que resulta en la inflamación por la acumulación de estas células en las bolsas periodontales (30, 31). Como parte de sus estrategias de supervivencia, *P. gingivalis* invade activamente las células epiteliales gingivales, donde puede replicarse y posteriormente diseminarse a otras células, a través del citoesqueleto, evadiendo así la vigilancia inmunológica (32). A su vez, puede internalizarse activamente en los macrófagos, siendo capaz de inhibir los procesos de destrucción bacteriana (33). Estos mecanismos, junto con la capacidad de *P. gingivalis* de desregular el sistema del complemento y degradar péptidos antimicrobianos, facilitan la evasión de la respuesta inmune (34). Al provocar la desregulación de la inmunidad innata, puede inhabilitar la inmunidad adaptativa, evitando la

activación de las células T citotóxicas por los macrófagos, lo que inhibe la eliminación de las células infectadas por la bacteria (35, 36).

Su capacidad de invadir las células epiteliales y el tejido circundante, logrando ingresar a la circulación sanguínea para alcanzar sistemas orgánicos distantes, resulta en la reciente asociación de *P. gingivalis* con el desarrollo de enfermedades sistémicas (37, 38). En particular, se relaciona con el desarrollo de enfermedades cardiovasculares al provocar disfunción endotelial arterial, lo que favorece la hipertensión arterial y la aterosclerosis (39, 40). Además, la capacidad de *P. gingivalis* de citrulinar proteínas propias y del hospedero, se asocia a la formación de anticuerpos antipéptidos citrulinados, estrechamente involucrados en el desarrollo de la artritis reumatoide (41–43). También, puede atravesar la barrera hematoencefálica, encontrándose ADN y factores de virulencia, como gingipaínas y lipopolisacárido bacteriano, en tejido cerebral post-mortem de personas con enfermedad de Alzheimer, así como también la presencia de su ADN en el líquido cefalorraquídeo de pacientes diagnosticados con deterioro cognitivo leve a moderado, y probable enfermedad de Alzheimer (44). A su vez, es capaz de atravesar la barrera placentaria, donde logra invadir trofoblastos, reportándose también la presencia de ADN y antígenos de *P. gingivalis* dentro de la placenta, el cordón umbilical y el líquido amniótico (45–47). Estos hallazgos, se asocian con resultados adversos del embarazo, como la preeclampsia, diabetes gestacional o trabajo de parto prematuro, y sugieren que esta bacteria invade y daña directamente los tejidos placentarios del útero (6).

La patogenicidad y estrategias de supervivencia de *P. gingivalis* dependen de una variedad de factores de virulencia que le permiten colonizar y persistir dentro de la cavidad bucal, así como invadir el tejido circundante y modular la respuesta inmune del hospedero. Algunos de los factores de virulencia más importantes son las fimbrias, el lipopolisacárido, la cápsula, las vesículas de membrana externa, las hemaglutininas, la peptidilarginina deiminasa, y un conjunto de proteasas denominadas gingipaínas (24, 35).

1.3. Gingipaínas

Las gingipaínas son proteasas de cisteína exclusivas de *P. gingivalis*, siendo responsables del 85% de la actividad proteolítica total de la bacteria (48). Son endopeptidasas pertenecientes

a la familia C25, presentando similitudes estructurales con otras proteasas dentro de la superfamilia CD, como las legumaínas, las clostripaínas y las caspasas (49). Las gingipaínas se consideran proteasas similares a la tripsina, por catalizar la hidrólisis de proteínas y péptidos con especificidad de corte en secuencias con arginina o lisina en posición P1 (48).

Existen tres gingipaínas, las arginina específicas RgpA y RgpB, y la lisina específica Kgp. Están codificadas por genes individuales (*rgpA*, *rgpB* y *kgp*), que se encuentran conservados en las cepas clínicas y de laboratorio de *P. gingivalis* (35, 50). Cada una se sintetiza como una única cadena polipeptídica, estando compuestas estructuralmente por varios motivos compartidos (Figura 1.2). La proteína codificada por *rgpB* se compone por un péptido señal N-terminal (S), un propéptido, un dominio catalítico y un dominio C-terminal (CTD). En los productos de traducción de *rgpA* y *kgp* se encuentran, adicionalmente, una serie de dominios de hemaglutinina/adhesina (HA), entre el dominio catalítico y el CTD. Para la RgpB, la proteína madura consiste solamente de su dominio catalítico, mientras que la RgpA y Kgp maduras están conformadas por el dominio catalítico asociado a los dominios HA (51, 52).

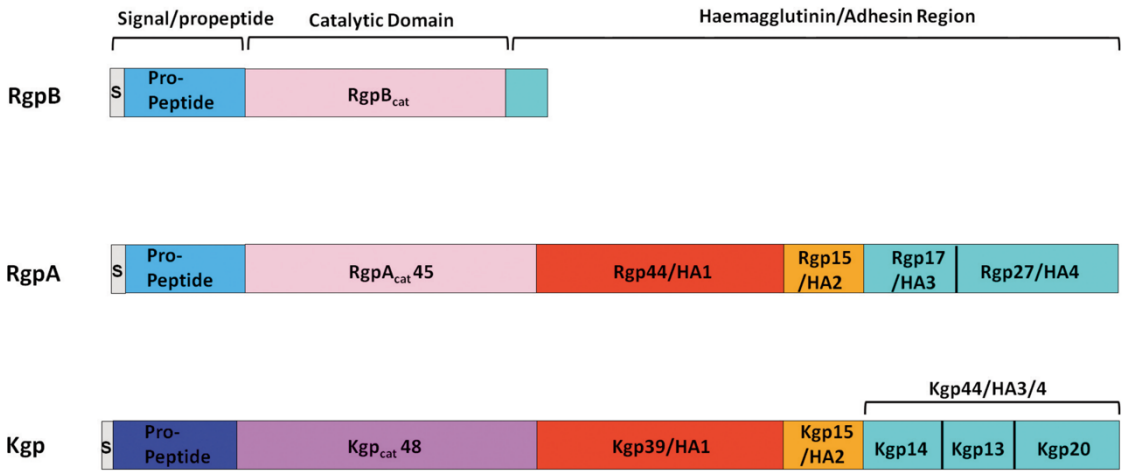

Figura 1.2. Esquema de los dominios que componen las gingipaínas. Los colores semejantes indican secuencias altamente similares. Extraído de (52).

El péptido señal permite el transporte de las gingipaínas a través de la membrana interna de *P. gingivalis*, por el sistema Sec. En cambio, el propéptido actúa como inhibidor del dominio catalítico durante el transporte del zimógeno, desde el periplasma hacia el medio extracelular, a través del sistema de secreción tipo IX (T9SS), por el reconocimiento del CTD (51). En este sistema ocurre la maduración de estas proteasas, en donde se cliva y elimina el

propéptido. Además, se escinden los dominios HA en RgpA y Kgp, para formar un complejo no covalente junto con el dominio catalítico (52, 53). El procesamiento de las gingipaínas finaliza con el clivado del CTD, pudiendo identificarse tres mecanismos de secreción distintos, asociados a diferentes cepas de *P. gingivalis*. En cepas como la HG66, las gingipaínas se secretan de forma libre al medio extracelular, mientras que en otras como la W83, quedan ancladas en la membrana externa por la unión de A-lipopolisacárido (53, 54). Otro mecanismo descrito para la liberación de estas proteasas al medio es a través de la producción de vesículas de membrana externa. Estas son nanoestructuras de vesículas lipídicas liberadas de la membrana externa de *P. gingivalis*, que transportan varios factores de virulencia, como gingipaínas ancladas en su superficie (55).

El rol principal de las gingipaínas es la degradación de proteínas del hospedero u otros microorganismos, que constituyen la principal fuente de carbono y energía para esta bacteria (56). Las gingipaínas funcionan no solo como proteasas, sino que también como transpeptidasas, existiendo reportes de su capacidad de catalizar la transpeptidación de sustratos proteicos, utilizando péptidos pequeños como moléculas aceptoras (57, 58).

Se consideran factores de virulencia importantes para el potencial patogénico de *P. gingivalis*, al estar involucradas en la colonización y la manipulación de la respuesta inmune del hospedero. En particular, la RgpA y Kgp participan de la adhesión y co-agregación con otras bacterias presentes en el biofilm, así como también de la aglutinación de glóbulos rojos debido a sus dominios hemaglutinina/adhesina (59, 60). Además, las gingipaínas contribuyen al sangrado y permeabilidad vascular, al activar la calicreína plasmática, degradar el fibrinógeno, y aumentar los niveles de trombina y protrombina, incrementando así la disponibilidad del hemo necesario para el crecimiento bacteriano (61).

Las gingipaínas están involucradas en la manipulación del sistema inmune del hospedero, al tener la capacidad de degradar péptidos antimicrobianos como α y β-defensinas y catelicidina LL-37 (62). A su vez, pueden hidrolizar C3, C4 y C5 del sistema del complemento, impidiendo la activación C5b y por ende la formación del complejo de ataque a la membrana (63). Finalmente, desregulan la red de citoquinas al degradar e inactivar las interleuquinas IL-1β, IL-4, IL-6, IL-8 e IL-12, así como también los receptores de IL-6, de IFN-α, de TNF-

α, CD4, CD8, CD14 y CD54 (52). Estas funciones explican por qué las gingipaínas son esenciales para la supervivencia bacteriana y el desenlace patológico de la periodontitis.

1.4. RgpB

La gingipaína arginina-específica B se caracteriza por ser la más sencilla de estas proteasas. Consiste en única cadena polipeptídica de 736 aminoácidos compuesta por un péptido señal de 25 aminoácidos, un propéptido de 204 aminoácidos, un dominio catalítico de 435 aminoácidos, y un CTD de 72 aminoácidos (Figura 1.3) (64).

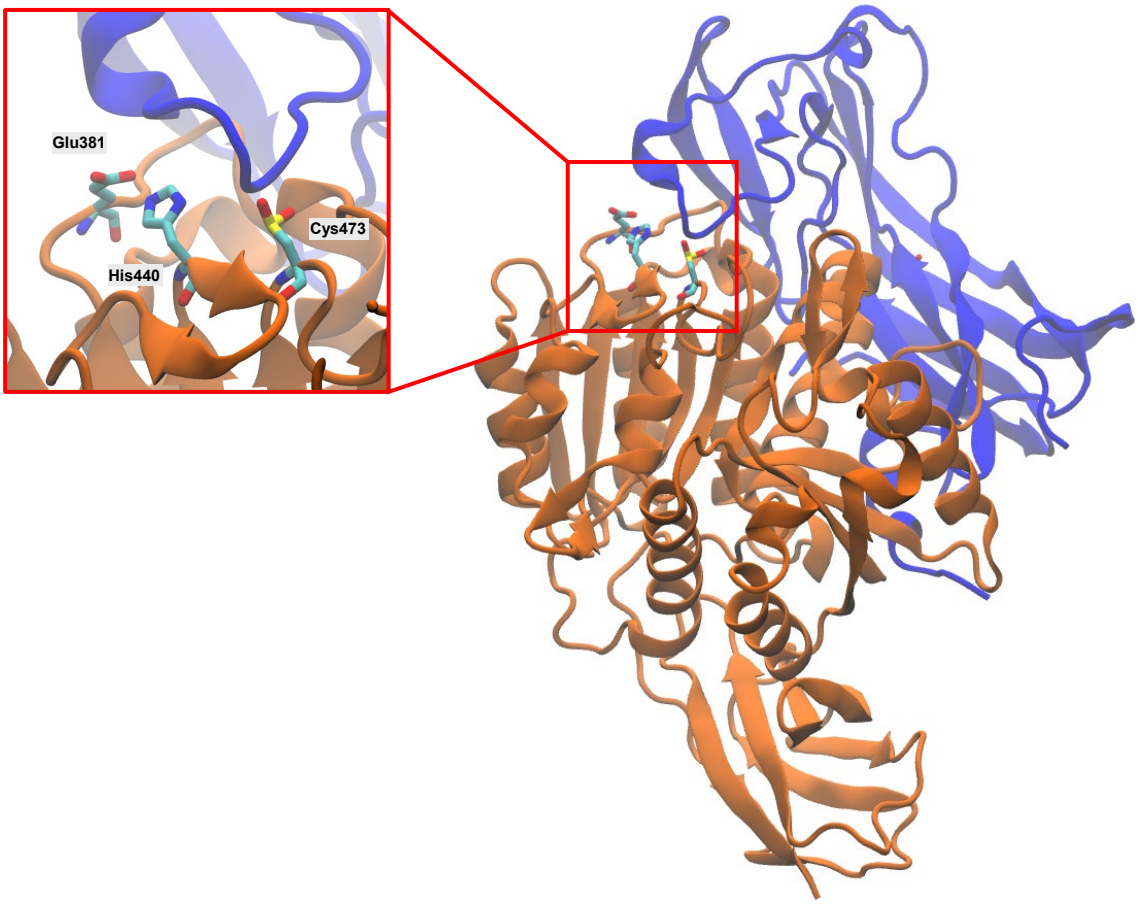

Figura 1.3. Estructura tridimensional de la RgpB, formando un complejo con su propéptido. Se representa en naranja el dominio catalítico, y en azul el propéptido. Se amplía el sitio activo, donde el residuo catalítico Cys473 se representa oxidado como 3-sulfinoalanina. Adaptado de (64).

La enzima madura, presenta solamente el dominio catalítico, el cual puede encontrarse anclado a la membrana o en forma soluble. Su actividad hidrolítica se basa un ataque nucleofílico al residuo de arginina del sustrato, mediado por la tríada catalítica Cys473,

His440 y Asp381. El sustrato interactúa con el sitio de unión S1 de la RgpB, una cavidad profunda y con carga negativa, crucial para el reconocimiento del sustrato, ya que crea fuertes interacciones iónicas con el grupo guanidilo del residuo de arginina en el sustrato, cargado positivamente (42). Adicionalmente, en la RgpB madura puede identificarse un subdominio de la superfamilia inmunoglobulina (IgSF), involucrado en procesos de reconocimiento, unión y adhesión de las células (65).

Por otro lado, la RgpB madura posee seis cisteínas en su estructura además de la Cys473 catalítica. Si bien dos de ellas se encuentran expuestas en la estructura, la Cys414 y Cys528, ninguna cisteína forma puentes disulfuro (65). Esto constituye una rareza respecto a toxinas y otros factores de virulencia secretados por bacterias gramnegativas patógenas, cuyo plegamiento ocurre en el periplasma para permitir la formación de puentes disulfuro (66–68).

Si bien las tres gingipaínas están involucradas en la obtención de nutrientes, la destrucción de los tejidos del periodonto y la manipulación de la respuesta inmune del hospedero, la RgpB destaca por su rol en la fisiología de la bacteria, siendo crucial para el procesamiento de proteínas propias. En particular, está involucrada en la polimerización de FimA, proteína principal de las fimbrias mayores de *P. gingivalis*, importantes factores de virulencia para la adhesión de la bacteria (69).

Tanto la RgpB como la RgpA, contribuyen a la acción de la peptidilarginina deiminasa de *P. gingivalis*, ya que esta presenta una alta preferencia por citrulinar los residuos de arginina C-terminales resultantes de la proteólisis por RgpA y RgpB (43). Este mecanismo único de citrulinación de péptidos puede ser la base de la generación de neoepítopes a los que aún no se ha desarrollado tolerancia inmunitaria, lo que contribuye a desencadenar una respuesta autoinmune (70). Cabe destacar que esta enzima también citrulina argininas que forman parte de las proteínas propias, de otros microorganismos y del hospedero. Existen reportes de que actúa sobre los residuos de arginina expuestos de RgpA y RgpB, lo que previene su posible autoproteólisis y resulta en una actividad aumentada (41, 55).

1.5. Inhibidores de gingipaínas

En los últimos años, ha crecido el interés por las gingipaínas como blanco para el tratamiento de la periodontitis y las enfermedades asociadas, llevando al desarrollo de numerosas

estrategias para la inhibición de estos factores de virulencia. Estas estrategias incluyen desde la ingenierización de propéptidos de las gingipaínas como inhibidores (71), compuestos sintéticos análogos a péptidos (48, 72, 73), polifenoles (74–76), antibióticos y sus derivados (77–79), y anticuerpos (80, 81).

Dentro de los inhibidores análogos a péptidos, destacan los compuestos KYT-1 y KYT-36 desarrollados por Kadowaki y colaboradores (72). Estos inhiben selectivamente a Rgp y Kgp, respectivamente, con una constante de inhibición (K_i) del orden de los nanomolares, y una mínima reactividad cruzada con proteasas de mamíferos. Siguiendo esta línea de investigación, Kataoka y colaboradores (73) desarrollan el inhibidor KYT-41, con actividad dual contra las tres gingipaínas y alta afinidad, demostrando capacidad para suprimir la permeabilidad vascular y la inflamación gingival en modelos animales de periodontitis (Figura 1.4). No existen reportes de que estos inhibidores hayan avanzado a estudios clínicos.

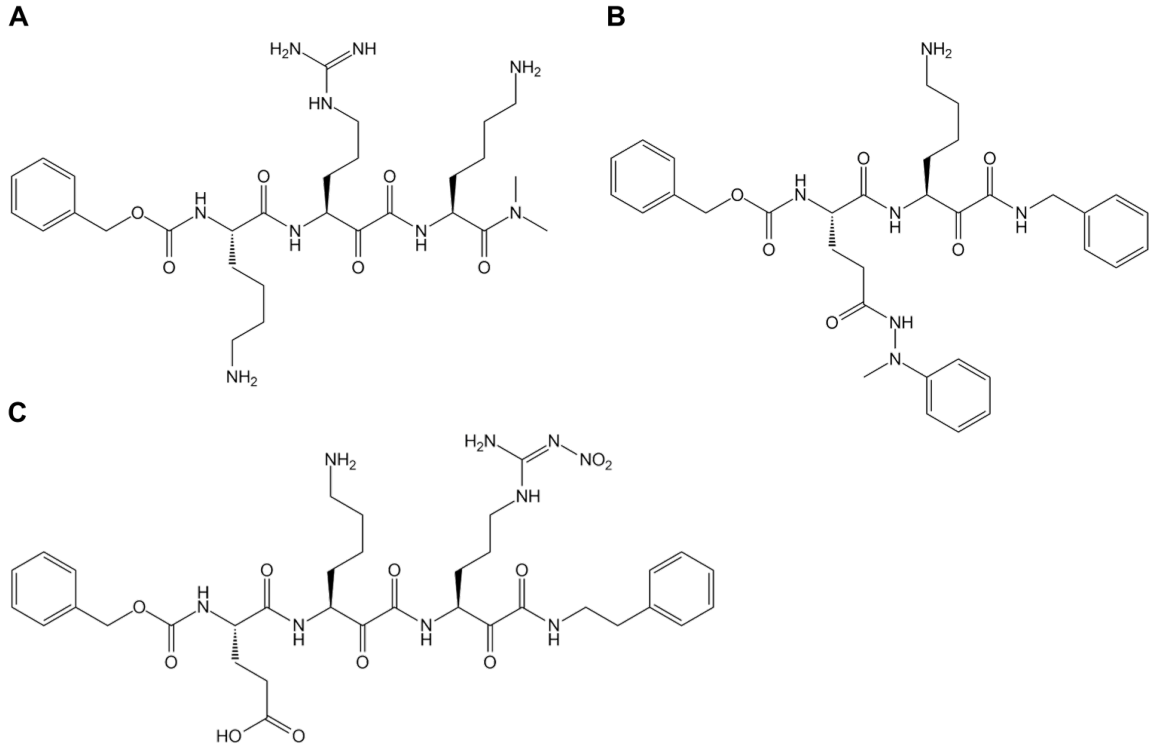

Figura 1.4. Estructura de KYTs, inhibidores de Kgp análogos a péptidos. A. KYT-1. **B.** KYT-36. **C.** KYT-41.

Resulta de particular relevancia el trabajo de Dominy y colaboradores (44), al ser el mayor progreso alcanzado en esta línea de investigación, logrando desarrollar cuatro familias de

inhibidores de gingipaínas para el potencial tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Dos de estas familias de compuestos, son inhibidores de RgpA y RgpB: una de ellas corresponde a derivados de aminopiridinas, protegidas por la patente US11059786B2 (82), mientras que la otra está conformada por amidas derivadas de arginina, descritas en la patente US20220204457A1 (83).

Las siguientes dos familias, consisten en moléculas inhibidoras de Kgp. En particular, la patente US20210017167A1 protege amidas derivadas de lisina (84). El último conjunto de inhibidores de Kgp se denominan CORs y se encuentran protegidos por la patente US10730826B2 (85). Uno de ellos, COR388, se caracteriza por ser un inhibidor ser selectivo y de alta afinidad, con una K_i del orden de los picomolares, demostrando capacidad de penetrar el sistema nervioso central. Avanzó a los estudios de fases clínicas bajo el nombre de Atuzaginstat (Figura 1.5) para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer, siendo retirado en Fase II/III por problemas de toxicidad hepática (86, 87).

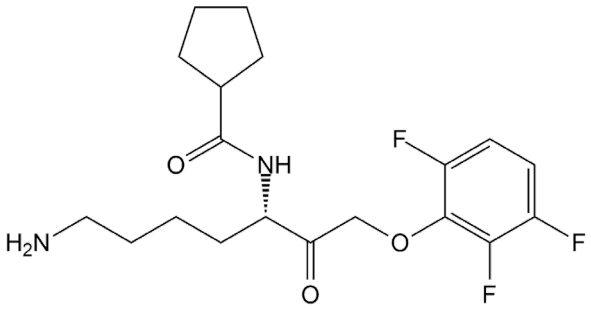

Figura 1.5. Estructura de Atuzaginstat, inhibidor de Kgp estudiado en ensayo clínico.

Un inhibidor de segunda generación, COR588 (también conocido como LHP588), se encontraba con un ensayo de Fase I en curso al momento de la suspensión de COR388, publicándose sus resultados en 2022 (88, 89). Actualmente no hay estudios clínicos registrados en curso sobre COR588, si bien hay cuatro estudios en curso o que comenzarán próximamente, con el objetivo de investigar posibles vínculos entre la enfermedad de Alzheimer y la periodontitis y/o *P. gingivalis* (90–93). Sin embargo, no hay estudios clínicos en curso orientados a reducir la colonización de *P. gingivalis* o a la inhibición de sus proteasas secretadas. Por estas razones, se considera interesante la búsqueda de inhibidores de gingipaínas que pertenezcan a un espacio químico diferente a los patentados, que logren

disminuir o eliminar la patogenicidad de la bacteria, sin exhibir un efecto toxico para el paciente.

1.6. Producción de recombinante de RgpB

El estudio y caracterización de gingipaínas *in vitro* se ve posibilitado por la obtención de estas proteasas a partir de distintas cepas de *P. gingivalis*. En particular, la RgpB puede obtenerse del cultivo de la cepa HG66, utilizando el protocolo desarrollado por Potempa y Nguyen (54). Esta cepa se caracteriza por secretar la totalidad de las gingipaínas expresadas de forma libre, permitiendo la purificación de la proteína desde el sobrenadante del cultivo. Este proceso es laborioso, implicando la concentración de proteínas por precipitación con acetona, seguida de cromatografías de exclusión molecular (SEC), de intercambio iónico (IEX) y de afinidad por arginina. Estos pasos son necesarios no solo para separarla del resto de las proteínas presentes, sino para eliminar los pigmentos derivados de hemina producidos por la bacteria, presentes en el sobrenadante. El rendimiento de la expresión y purificación de RgpB con este protocolo es de 0,5 mg por litro de cultivo.

Por otra parte, se puede obtener la RgpB a partir de cepas ingenierizadas de *P. gingivalis*. El protocolo desarrollado por Veillard y colaboradores (94), se basa en la modificación genética de la cepa W83-Δ*rgpA* por mutagénesis sitio dirigida, para la inserción de una etiqueta de afinidad 6xHis previo al sitio de corte del CTD de la RgpB. De esta forma, se expresa fusionada a una etiqueta de afinidad 6xHis, la cual impide el anclaje a la membrana externa, por lo que la gingipaína se secreta de forma libre al sobrenadante del cultivo. La RgpB-6xHis se purifica por precipitación con acetona, seguida de cromatografías de intercambio iónico y de afinidad por metales inmovilizados (IMAC), manteniendo la etiqueta de afinidad unida a la proteína al final del proceso. El rendimiento de esta expresión y purificación es de 2,4 mg/L.

La expresión de gingipaínas en cepas de *P. gingivalis* tiene desventajas asociadas a la necesidad del cultivo en condiciones anaeróbicas estrictas, el requerimiento de sangre para el cultivo en placa, y a los laboriosos procesos de purificación. Adicionalmente, la purificación desde condiciones nativas resulta en la presencia de pigmentos derivados de hemina en concentraciones variables al final de la purificación, con ambos protocolos (54,

94). Por estas razones, la expresión heteróloga en sistemas constituye una alternativa atractiva para la obtención de gingipaínas.

En la actualidad, la producción de proteínas recombinantes es una herramienta biotecnológica indispensable para el estudio de proteínas en el campo de la investigación, así como para aplicaciones biomédicas e industriales. En este sentido, *Escherichia coli* es el organismo más ampliamente utilizado para producir proteínas recombinantes (95). Esto se debe a la fácil implementación, los tiempos cortos, el bajo coste, los altos niveles de expresión y la amplia variedad de herramientas genéticas disponibles en *E. coli* (96). A pesar de los avances en el campo de las proteínas recombinantes, no todas logran expresarse de forma soluble y homogénea en este sistema, lo que requiere la evaluación de parámetros como la fusión a diferentes proteínas potenciadoras de la solubilidad, la traslocación de la proteína al espacio periplásmico, el uso de diversos promotores y cepas de *E. coli* (97).

La expresión recombinante de gingipaínas presenta grandes desafíos, debido a su actividad proteolítica, su plegamiento y su complejo proceso de maduración. Por estas razones, se considera que la expresión heteróloga en un sistema sencillo como *E. coli* podría no ser viable (98). Esto se ve reflejado en el único intento reportado de expresión recombinante en *E. coli* por Margetts y colaboradores (99), en el que se proponen expresar solamente el dominio catalítico de RgpA. Si bien logran su expresión recombinante, la proteína resulta ser insoluble en el extracto bacteriano. Luego de los intentos de solubilización, la pobre actividad catalítica de la RgpA recombinante contribuyó a considerar la expresión de estas proteasas en *E. coli* como una alternativa poco conveniente respecto a su expresión en cepas ingenierizadas de *P. gingivalis*. Esto se ve reflejado en la amplia literatura que utiliza los dos protocolos descritos anteriormente para el estudio de las gingipaínas, y de RgpB específicamente (44, 69, 71, 100–102).

Tomando en consideración los desafíos reportados de la expresión de gingipaínas en *E. coli y,* especialmente, la potencial toxicidad como una limitante, Mikolajczyk y colaboradores (103) exploran la posibilidad de producir la RgpB en un sistema de expresión eucariota. Utilizan *Saccharomyces cerevisiae* YG227 para expresar distintas versiones de RgpB fusionadas a FLAG-tag, logrando la expresión recombinante del zimógeno de RgpB, con su propéptido y dominio C-terminal, con un rendimiento de entre 10 y 20 μg/L. Sin embargo,

no se obtiene la totalidad de la RgpB en su forma madura al final de la purificación, estando presentes varios intermediarios del zimógeno parcialmente procesados. A su vez, el bajo rendimiento obtenido respecto a la expresión en *P. gingivalis*, lleva a considerar esta estrategia de expresión en *S. cerevisiae* como una alternativa poco conveniente.

Existen múltiples sistemas de expresión eucariotas, como las levaduras, las células de insecto y las líneas celulares de mamífero. Estos sistemas se caracterizan por su capacidad de realizar múltiples puentes disulfuro y, especialmente, por realizar modificaciones postraduccionales en las proteínas (95). Estas son especialmente relevantes cuando se trata de la producción de proteínas humanas para aplicaciones biomédicas, donde sus modificaciones postraduccionales como glicosilaciones, pueden impactar directamente en su actividad e inmunogenicidad, imponiendo restricciones en la selección del sistema de expresión (104).

La línea celular Schneider 2 (S2) es una línea celular de insecto derivada de un cultivo primario de embriones en fase tardía de *Drosophila melanogaster* (105). Constituye una alternativa a la expresión de proteínas en células de mamífero, presentando ventajas como un mayor rendimiento, y la capacidad de alcanzar altas densidades celulares sin requerimientos de CO_2 ni suero fetal bovino para el crecimiento (106). Este sistema permite la expresión inducible de proteínas, con la posibilidad de secretarlas al exterior celular. Esto permite reducir la potencial toxicidad por la acumulación de la proteína recombinante, y facilitar el posterior proceso de purificación, ya que las S2 expresan pocas proteínas hacia el espacio extracelular, reduciendo la cantidad de proteínas contaminantes en la fracción obtenida (107). El Laboratorio de Inmunovirología del Institut Pasteur de Montevideo (IPMon) presenta una amplia experiencia en la producción de proteínas recombinantes en este sistema (108–110). Resulta de particular relevancia la experiencia expresando una proteasa viral en S2 (Fló y colaboradores, no publicado), ya que la actividad catalítica y las consecuencias biológicas del clivado de enlaces peptídicos, hace que las proteasas sean proteínas desafiantes para la expresión heteróloga. La producción de proteasas exógenas en *E. coli*, especialmente no reguladas por mecanismos inhibitorios como la expresión de su forma zimogénica, representa un estrés crítico para la bacteria que a menudo resulta en la formación de cuerpos de inclusión, la toxicidad celular o la ausencia de expresión (111). Por lo que, resulta interesante explorar sistemas de expresión alternativos para la obtención de una proteasa soluble y activa.

2. Objetivos

2.1. Objetivo general

Lograr la expresión recombinante de la proteasa de cisteína RgpB de *P. gingivalis*, para identificar inhibidores que potencialmente atenúen o eliminen la patogenicidad de la bacteria.

2.2. Objetivos específicos

1. Producir RgpB de forma recombinante en *E. coli* y en la línea celular S2.
2. Purificar RgpB de forma soluble.
3. Evaluar la actividad de RgpB *in vitro* poniendo a punto un ensayo de actividad con un sustrato fluorogénico.
4. Seleccionar *in silico* compuestos potencialmente inhibidores de RgpB.

3. Metodología

3.1. Materiales

3.1.1. Plásmidos

Los plásmidos Pro-RgpB_tev_T7Trx y Pro-RgpB_tev_pDroExt-PRW, en adelante referidos como pRgpB_Ec y pRgpB_S2, respectivamente, se obtienen de GenScript (EE. UU.). El plásmido pCoPuro se obtiene de Thermo Fisher Scientific (EE. UU.). El plásmido p7_TEVdt diseñado por Dalla Rizza y colaboradores (112) se obtiene del Laboratorio de Inmunovirología del IPMon.

3.1.2. Cepas y línea celular

La cepa de clonado *E. coli* XL1-Blue, en adelante referida como XL1, se obtiene de Agilent (EE. UU.), mientras que la cepa de expresión *E. coli* Rosetta(DE3)pLysS, en adelante referida como Rosetta, se obtiene de Merck (Alemania).

La línea celular *Drosophila* Schneider 2 (S2), derivada de un cultivo primario de células embrionarias de *D. melanogaster*, se obtiene de Thermo Fisher Scientific.

3.1.3. Medios de cultivo

Medio LB: 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7,2. El medio LB Agar se suplementa con 1,5% de agar bacteriológico.

Medio 2YT: 1,6% triptona, 1% extracto de levadura, 0,5% NaCl, pH 7.

Medio TB: 1,2% triptona, 2,4% extracto de levadura, 0,4% glicerol, 17 mM KH_2PO_4, 72 mM K_2HPO_4, pH 7,2.

Medio de Autoinducción ZYM-5052: 1% triptona, 0,5% extracto de levadura, 0,5% glicerol, 0,2% lactosa, 0,05% glucosa, 25 mM Na_2HPO_4, 25 mM KH_2PO_4, 50 mM NH_4Cl, 5 mM Na_2SO_4, 2 mM $MgSO_4$, pH 7.

Medio Insect-XPRESS™: medio de cultivo de células de insectos libre de proteínas y libre de suero, de Lonza (Suiza).

3.1.4. Soluciones

Ampicilina 100 mg/mL: 1 g de ampicilina en 10 mL de agua ultrapura, filtrada en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm *Minisart® NML Standard Syringe Filter, Surfactant-free Cellulose Acetate* de Sartorius (Alemania).

Carbenicilina 100 mg/mL: 1 g de carbenicilina en 10 mL de agua ultrapura, filtrada en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm.

Cloranfenicol 34 mg/mL: 0,34 g de cloranfenicol en 10 mL de etanol 95%, filtrado en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm.

IPTG 1 M: 2,38 g de IPTG en 10 mL de agua ultrapura, filtrado en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm.

DNAsa 5 UI/µL: 7 mg DNAsa 2866 UI/mg en 4 mL de agua ultrapura. Para su uso en la transfección de células S2, se filtra en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm.

DTT 1 M: 1,54 g de DTT en 10 mL de agua destilada, filtrado utilizando un filtro de 0,22 µm.

β-mercaptoetanol 1 M: 0,7 mL de β-mercaptoetanol en 9,3 mL de agua destilada, filtrado utilizando un filtro de 0,22 µm.

Cisteína 0,5 M: 0,61 g de cisteína en 10 mL de agua destilada, filtrada utilizando un filtro de 0,22 µm.

Tinción de Coomassie: 45% etanol, 10% ácido acético, 2,5% azul de Coomassie R-250.

Solución de desteñido 1: 40% etanol, 7% ácido acético.

Solución de desteñido 2: 7% ácido acético, 5% etanol.

Azul de tripán 0,5%: 0,25 g de azul de Tripán en 50 mL de PBS 1X.

$CdCl_2$ 10 mM: 18,3 mg de $CdCl_2$ en 10 mL de agua destilada, filtrado en esterilidad utilizando un filtro de 0,22 µm.

Las soluciones amortiguadoras utilizadas se detallan en las secciones correspondientes.

3.2. Reactivos generales

Todos los reactivos detallados a continuación son de grado analítico. Los solventes ácido acético glacial y etanol 95% se obtienen de Droguería Industrial Uruguaya Emilio Benzo S.A. (Uruguay). El 2-propanol y glicerol se obtienen de Carlo Erba Reagents (Francia).

Las siguientes sales, componentes para medios de cultivo y otros reactivos se obtienen de Sigma-Merck (Alemania): β-mercaptoetanol, acrilamida/bisacrilamida 29:1, acetato de sodio, azul de bromofenol, azul de Coomassie R-250, azul de tripán, Bis-Tris, cisteína, cloruro de amonio, cloruro de cadmio, cloruro de calcio, cloruro de potasio, cloruro de sodio, DTT, EDTA, extracto de levadura, fosfato de potasio monobásico, fosfato de sodio dibásico, glicina, glucosa, imidazol, IPTG, lactosa, persulfato de amonio, PBS 10X, PMSF, SDS, sulfato de magnesio, sulfato de sodio, TEMED, triptona, Tris y Tween 20.

Los antibióticos ampicilina, carbenicilina y cloranfenicol se obtienen de Sigma-Merck. Las soluciones de Pen-Strep (penicilina 10000 UI/mL y estreptomicina 10000 μg/mL) y de puromicina (10 mg/mL) para cultivo celular se adquieren de Thermo Fisher Scientific. Las enzimas DNAsa, lisozima y tripsina liofilizadas, y la BSA se adquieren de Sigma-Merck.

Los reactivos de biología molecular, soluciones comerciales, sustratos enzimáticos, columnas, resinas y filtros utilizados se detallan en las secciones correspondientes.

3.3. Procedimientos generales

3.3.1. Construcción de vectores de expresión

Se diseñan dos vectores para la expresión recombinante de RgpB, uno para *E. coli* y otro para línea celular de insecto S2. Con el fin de limitar potenciales problemas de toxicidad asociados a la expresión de una proteasa activa, se opta por expresar el zimógeno de RgpB (Pro-RgpB), que comprende el propéptido y dominio catalítico de la gingipaína, y tiene una actividad proteolítica limitada.

La secuencia del propéptido y dominio catalítico de la RgpB, que comprende de Gln25 a Ser664, se obtiene de Uniprot bajo el *accession number* P95493, y proviene de la cepa de *P.*

gingivalis W83 (ATCC BAA-308). Para evitar su auto-maduración, se sustituye el sitio de hidrólisis nativo (NYEATR) por el sitio de corte de la proteasa TEV (ENLYFQS) (Figura 3.1).

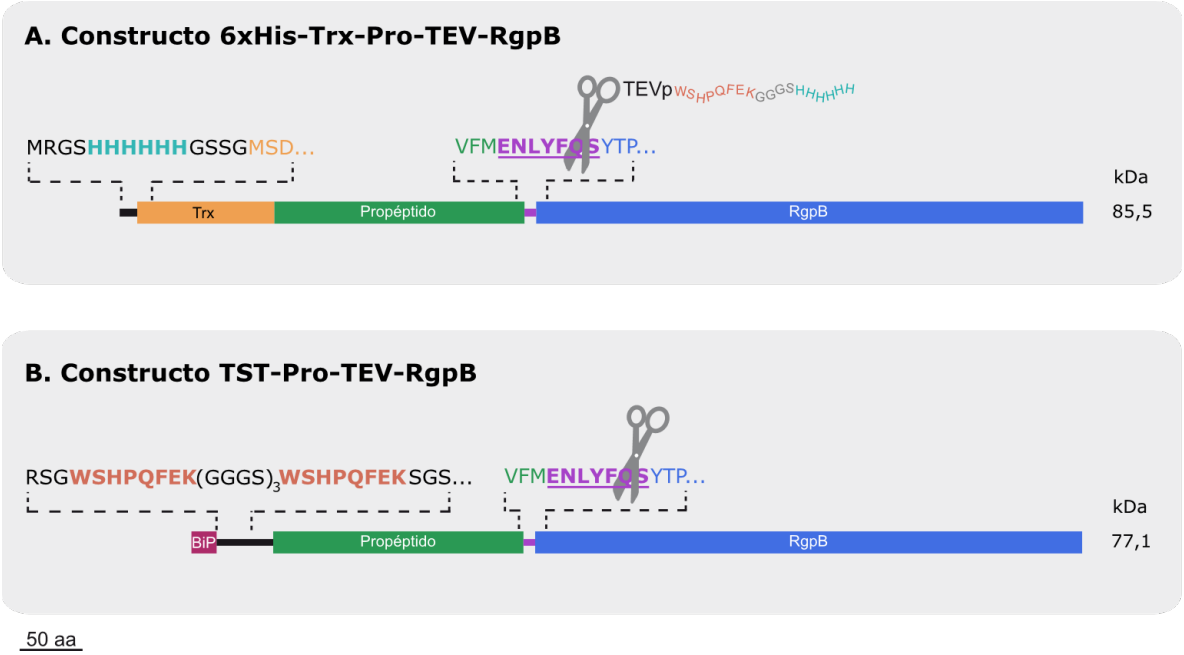

Figura 3.1. Representación de las construcciones para la expresión de RgpB. A. Constructo para *E. coli*. El dominio catalítico de la RgpB (en azul) se expresa junto con su propéptido (en verde), unidos por el sitio de corte de la proteasa TEV, indicado subrayado en violeta. La TEVp se representa como tijera y posee un StrepTagII® seguido de una etiqueta 6xHis (112). En el extremo N-terminal se representa en negro el *linker* que posee la etiqueta de 6xHis (en celeste), seguido de la Trx (en amarillo). **B.** Constructo para S2. En el extremo N-terminal se indica en magenta la señal de exportación BiP, seguida de un *linker* (en negro) que posee un Twin-Strep-tag® representado en naranja.

Para la expresión en *E. coli*, se incluye una etiqueta de polihistidinas (6xHis) en el extremo N-terminal, para facilitar su purificación por IMAC, seguido de la proteína de fusión tiorredoxina de *E. coli* (Trx) (Figura 3.1 A), de forma de incrementar la solubilidad de la proteína recombinante. Este constructo se realiza sobre un vector pET-32a modificado por Correa y colaboradores (113), el cual confiere resistencia a antibióticos β-lactámicos y contiene el promotor T7, derivado del bacteriófago T7, con el operador lac incorporado para la expresión de la proteína por la ARN polimerasa T7 (Figura 3.2 A). El represor lac se une al operador e inhibe la transcripción, que puede ser revertida por el agregado de lactosa o IPTG, induciendo la expresión de la proteína recombinante.

Para la expresión en S2, se agrega una etiqueta Twin-Strep-tag® en el extremo N-terminal, permitiendo la purificación por cromatografía de afinidad por Strep-tactin® (Figura 3.1 B). El constructo se realiza sobre el vector pMT/BiP/V5-his modificado por Ortega y colaboradores (96), que confiere resistencia a antibióticos β-lactámicos para el clonado en *E. coli*, y contiene el promotor de metalotioneína de *Drosophila* para la expresión inducible por cationes metálicos divalentes como Cu^{2+} o Cd^{2+}, seguido de la señal de exportación BiP para la traslocación de la proteína recombinante hacia el retículo endoplasmático e ingreso por la vía secretoria (Figura 3.2 B).

Para ambas proteínas expresadas, el corte con la TEVp permite separar el propéptido y las etiquetas de purificación, del dominio catalítico de la RgpB, permitiendo obtenerla en su forma activa al final de la purificación.

El constructo se optimiza para el uso de codones de *D. melanogaster* y los plásmidos se obtienen por síntesis de GenScript.

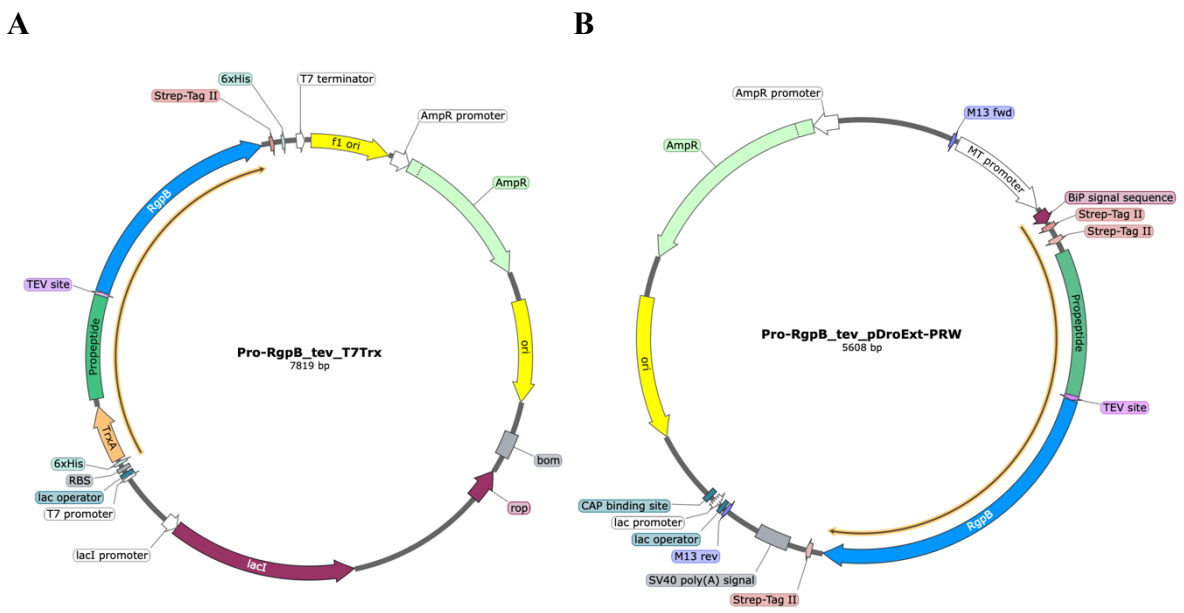

Figura 3.2. Representación de los plásmidos para la expresión de RgpB. A. Plásmido pRgpB_Ec para la expresión en *E. coli.* **B.** Plásmido pRgpB_S2 para la expresión en la línea celular S2.

3.3.2. Preparación de *E. coli* quimiocompetentes

Se preparan células quimiocompetentes en condiciones de esterilidad, partiendo de un criotubo de *E. coli* XL1 o Rosetta almacenado a -80°C. Se realiza un repique en una placa de LB Agar y se incuba ON a 37°C. A partir de una colonia aislada, se realiza un precultivo de 50 mL de medio LB en un matraz de 250 mL, y se incuba ON a 37°C en un agitador orbital a 220 rpm.

Luego, se inoculan 250 mL de medio 2YT en un matraz de 1 L con 5 mL del precultivo crecido y se incuba a 37°C y 220 rpm. Pasada una hora y en intervalos de 30 min se toma una muestra del cultivo y se mide la OD_{600} usando el espectrofotómetro OD600 DiluPhotometer™ de Implen (Alemania) hasta alcanzar un valor de aproximadamente 0,7.

Se vierte el cultivo crecido en tubos cónicos de 50 mL y se centrifuga a 2500 *g* y 4°C por 10 min. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular en 25 mL de $CaCl_2$ 0,1 M estéril a 4°C, incubando la suspensión celular en hielo por 30 min. Se centrifuga nuevamente a 2500 *g* y 4°C por 8 min, y se descarta el sobrenadante. El *pellet* celular se resuspende en 1 mL de $CaCl_2$ 0,1 M estéril a 4°C y se agregan 125 µL de glicerol 50% estéril a 4°C. Se alícuota la suspensión de células de a 50 µL en tubos de microcentrífuga y se almacenan a -80°C hasta su uso.

3.3.3. Transformación de *E. coli* por choque térmico

Para transformar las células quimiocompetentes de *E. coli* XL1 o Rosetta, se parte de plásmidos a una concentración de 100 ng/µL. Se agregan 2 µL del plásmido correspondiente a 50 µL de células en condiciones de esterilidad, y se incuban en hielo por 30 min. Se realiza el choque térmico a 42°C por 2 min en el termobloque ThermoMixer® C de Eppendorf (Alemania) y se incuban en hielo por 2 min. Para recuperar las células, se agregan 450 µL de medio LB y se incuban a 37°C y 650 rpm por 1 h. Se plaquean 200 µL de células en medio LB Agar suplementado con ampicilina 100 µg/mL para seleccionar las células que hayan introducido el plásmido de interés. En el caso de los plásmidos transformados en *E. coli* Rosetta, se suplementa también con cloranfenicol 34 µg/mL para seleccionar las células que tengan a su vez el plásmido pRARE. Las placas se incuban ON a 37°C.

3.3.4. Obtención de vectores de expresión

Los plásmidos pRgpB_Ec y pRgpB_S2 liofilizados se reconstituyen en agua ultrapura, para una concentración de 100 ng/µL. Se procede a transformar *E. coli* XL1 quimiocompetentes por choque térmico, y a partir de una colonia transformada se realizan cultivos de 50 y 200 mL de medio LB suplementado con ampicilina para los plásmidos pRgpB_Ec y pRgpB_S2, respectivamente, y se incuban ON a 37°C y 220 rpm.

Se purifica el plásmido pRgpB_Ec a partir de 10 mL del cultivo crecido utilizando el *kit* de minipreparación *Monarch® Plasmid Miniprep Kit* (#T1010) de New England Biolabs (EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante y eluyendo el ADN en 50 µL de agua ultrapura. Mientras que el plásmido pRgpB_S2 se purifica a partir de los 200 mL de cultivo crecido empleando el *kit* de maxipreparación *PureLink™ HiPure Plasmid Filter Maxiprep Kit* (Thermo Fisher Scientific, #K210017) siguiendo las instrucciones del fabricante y resuspendiendo el ADN en 200 µL de agua ultrapura.

Finalmente, se determina la concentración de ADN plasmídico mediante la medida de absorbancia a 260 nm, en el espectrofotómetro DS-11 FX+ de DeNovix (EE. UU.). Se evalúa la pureza mediante los cocientes 260/230 y 260/280.

3.3.5. Expresión de RgpB recombinante en *E. coli*

Para la expresión recombinante de la Pro-RgpB en *E. coli*, se transforma la cepa de expresión *E. coli* Rosetta quimiocompetentes por choque térmico con el plásmido pRgpB_Ec purificado. Se seleccionan al azar cinco colonias transformadas de la placa para inocular 5 mL de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol en un tubo de cultivo, y se incuba ON a 37°C y 220 rpm. Se realiza una criopreservación de la cepa transformada en esterilidad, agregando 250 µL de glicerol 50% estéril y 750 µL del cultivo crecido a criotubos. Se almacenan a -80°C hasta su uso.

A partir de un criotubo de la cepa transformada y en condiciones de esterilidad, se realiza un precultivo inoculando 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, y se incuba ON a 37°C y 220 rpm.

3.3.5.1. Expresión en medio TB

Se inoculan 500 mL de medio TB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, con 10 mL del precultivo crecido en un matraz de 3 L. Se incuba a 37°C y 220 rpm. Pasadas tres horas y en intervalos de 30 min se toma una muestra del cultivo y se mide la OD_{600} hasta la fase logarítmica tardía del crecimiento bacteriano, con un valor de entre 1,8 y 2. Al alcanzar la densidad óptica deseada, se induce la expresión con 0,1 mM de IPTG y se estudia el efecto de la temperatura en la expresión de la gingipaína incubando por 5 h a 37°C y 220 rpm, y ON a 20°C y 220 rpm. Para estudiar el efecto de la concentración de inductor, se expresa RgpB con 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 y 1 mM de IPTG, y se incuba ON a 20°C y 220 rpm.

3.3.5.2. Expresión por autoinducción

Se utiliza el medio de autoinducción ZYM-5052 desarrollado por Studier (114), que contiene glucosa, glicerol y lactosa como fuentes de carbono. Se realiza un cultivo de 50 mL de medio ZYM-5052 suplementado con carbenicilina 100 μg/mL y cloranfenicol 34 μg/mL en un matraz de 250 mL, inoculando con 1 mL del precultivo crecido. Se incuba a 25°C y 220 rpm por 48 h.

3.3.6. Lisis bacteriana

Pasado el tiempo de incubación de cada cultivo, se recuperan las células por centrifugación a 4000 *g* y 4°C por 30 min. Se resuspende el *pellet* celular en amortiguador A1 (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 20 mM imidazol) utilizando 5-10 mL por cada gramo de *pellet*, y se congela a -20°C hasta el inicio de la purificación.

Se descongela la suspensión celular y se añaden de 2,5 UI/mL de DNAsa y 10 mM de $MgSO_4$, incubando 15 min. Luego, se realiza una lisis bacteriana por sonicación, en hielo, aplicando pulsos de 5 s con una amplitud de 40%, seguidos de intervalos de 10 s entre cada pulso, hasta completar 10 min totales de pulso encendido. El extracto obtenido se centrifuga a 30000 *g* y 4°C por 30 min, para separar las proteínas solubles de las insolubles. La fracción soluble se utiliza posteriormente para purificar la RgpB.

Se analizan las proteínas presentes en el extracto, fracción soluble e insoluble de cada estrategia de expresión evaluada por SDS-PAGE.

3.3.7. Electroforesis en gel de poliacrilamida

Para analizar la composición proteica de las muestras, se realiza una electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante con SDS, utilizando acrilamida al 10%. Se estima la concentración de proteínas totales de las muestras por absorbancia a 280 nm y se preparan en amortiguador de carga 5X (500 mM DTT, 310 mM Tris pH 6,8, 50% glicerol, 10% SDS, 0,05% azul de bromofenol), para una concentración de proteína de 1 µg/µL. Se desnaturalizan las proteínas incubando las muestras a 95°C por 10 min y se siembran 10µL de cada muestra en el gel, utilizando el marcador de peso molecular *PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder, 10 to 250 kDa* (Thermo Fisher Scientific, #26619). Se realiza la corrida a una corriente constante de 20 mA por gel, en amortiguador de corrida (192 mM glicina, 25 mM Tris, 0,1% SDS).

Una vez finalizada la corrida, se tiñe el gel con solución de Coomassie por 45 min en agitación. Se destiñe con solución de desteñido 1 por 30 min, y luego con solución de desteñido 2 por 1 h, para visualizar las proteínas presentes.

3.3.8. Purificación del zimógeno de RgpB por IMAC

Para la purificación de la Pro-RgpB producida en *E. coli* se filtra la fracción de proteínas solubles utilizando un filtro de 0,45 µm *Minisart® NML Standard Syringe Filter, Surfactant-free Cellulose Acetate* (Sartorius) y se evalúan dos sistemas de purificación por IMAC.

3.3.8.1. Purificación por IMAC en *batch*

Se agrega 1 mL de resina de afinidad *Ni Sepharose ™ HP* (#17526801) de Cytiva (EE. UU.) por cada 80 mL de la fracción soluble, y se incuba en agitación suave por 1 h a temperatura ambiente. Se vierte la fracción en una columna de purificación abierta y se bombea la fracción no unida (o percolado) con una bomba peristáltica a un flujo de 3 mL/min. Se realiza un lavado con 15 mL de amortiguador A1, y se eluye la proteína en 10 mL de amortiguador B1 (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 500 mM imidazol) bombeando a un flujo de 1 mL/min. Como alternativa, se agrega un paso adicional de lavado previo a la elución con 15 mL de amortiguador W (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 50 mM imidazol).

3.3.8.2. Purificación por IMAC en FPLC

Se carga la fracción filtrada en una columna pre-empacada *HiTrap™ IMAC HP* de 5 mL (Cytiva, #17092005), previamente equilibrada con amortiguador A1, utilizando una bomba peristáltica a un flujo de 2 mL/min. Se recoge el percolado y se conecta a un sistema de cromatografía AKTA Pure™ 25 (Cytiva) y se purifica realizando una FPLC. Se realiza un primer lavado con 3 CV de amortiguador A1, seguido de un segundo lavado con 3 CV de 6,3% de amortiguador B1 para una concentración de 50 mM de imidazol, ambos a un flujo de 1 mL/min. Se eluye en un gradiente de 15 CV desde 6,3 a 100% de amortiguador B1, a un flujo de 1 mL/min.

3.3.9. Purificación del zimógeno de RgpB por IEX

Previo a la digestión con TEVp, se realiza un cambio de amortiguador del eluido de la primera IMAC con una columna *HiPrep™ 26/10 Desalting* (Cytiva, #17508701) al amortiguador de unión (50 mM Tris pH 8, 10 mM NaCl). Se inyecta la muestra en un sistema de cromatografía AKTA Pure 25 y se purifica utilizando una columna *MonoQ™ 5/50 GL* (Cytiva, #17516601). Se colecta el percolado y se realiza una primera elución en un gradiente de 0 a 50% de amortiguador de elución (50 mM Tris pH 8, 1 M NaCl), y finalmente a 100%. Se analizan las fracciones obtenidas de la purificación por SDS-PAGE.

3.3.10. Expresión y purificación de la proteasa TEV

Se transforman *E. coli* Rosetta quimiocompetentes por choque térmico con el plásmido p7_TEVdt, para la expresión de la TEVp fusionada a las etiquetas 6xHis y StrepTagII®. Se seleccionan al azar cinco colonias transformadas para inocular 50 mL de medio LB suplementado con ampicilina y cloranfenicol, y se incuba ON a 37°C y 220 rpm. Se realizan cultivos de 1 L de medio 2YT suplementado con ampicilina y cloranfenicol en matraces de 5 L, inoculando con 20 mL del precultivo crecido, y se incuban a 37°C y 220 rpm. Al alcanzar una OD_{600} de entre 0,8 y 1, se induce la expresión con 1 mM de IPTG y se incuba ON a 20°C y 220 rpm. Se recuperan las células por centrifugación a 4000 *g* y 4°C por 30 min. Se resuspende el *pellet* celular en amortiguador de lisis (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,5 mg/mL lisozima), utilizando 10 mL por cada gramo de *pellet*, y se congela a -80°C hasta el inicio de la purificación.

Se descongela la suspensión celular y se agregan 2,5 UI/mL de DNAsa y 10 mM de $MgSO_4$, incubando 15 min. Se lisan por sonicación y se centrifuga a 30000 *g* y 4°C por 30 min. Se filtra la fracción soluble utilizando un filtro de 0,45 µm (Sartorius) y se carga en una columna pre-empacada *HiTrap ™IMAC HP* de 5 mL previamente equilibrada en amortiguador A2 (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 20 mM imidazol) con un flujo de 2 mL/min. Se realiza un lavado con 5 CV de amortiguador A2 y se eluye en un gradiente de 15 CV desde 0 a 100% de amortiguador B2 (50 mM Tris pH 8, 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Finalmente, la proteína eluida se dializa contra un amortiguador de diálisis 2 (50 mM Tris pH 8, 150 mM NaCl, 2 mM DTT), se analiza la pureza por SDS-PAGE y se alícuota de a 500 µL en tubos de microcentrífuga. Se almacenan a -80°C hasta su uso.

3.3.11. Activación de RgpB por digestión con TEVp y posterior purificación

Se realiza la digestión de la Pro-RgpB purificada con la TEVp, agregando 1 mg de la proteasa por cada 10 mg de proteínas totales presentes la fracción, estimando la concentración de proteínas por absorbancia a 280 nm. Se agregan 2 mM de DTT y se incuba durante 30 min a temperatura ambiente. Luego, se dializa utilizando una membrana de 3,5 kDa *SnakeSkin ™ 3.5K MWCO* (Thermo Fisher Scientific), contra un amortiguador de diálisis 1 (50 mM Tris pH 8, 300 mM NaCl, 5 mM $CaCl_2$, 2 mM DTT), incubando ON, en agitación a 4°C.

Se recupera la fracción dializada y se realiza una segunda purificación por IMAC, agregando 1 mL de resina de afinidad *Ni Sepharose ™ HP* y se incuba por 30 min a temperatura ambiente. Se vierte la fracción en una columna de purificación abierta y se recoge el percolado, donde se encuentra la RgpB activada, bombeando a un flujo de 2 mL/min. Se eluye el propéptido y la TEVp en 10 mL de amortiguador B1, bombeando a un flujo de 2 mL/min.

Las fracciones obtenidas de cada estrategia de purificación evaluada se analizan por SDS-PAGE, se recortan las bandas con el peso molecular correspondiente a la RgpB recombinante y se confirma su identidad por espectrometría de masas en un espectrómetro Orbitrap Exploris™ 240 Mass Spectrometer asociado a un nano-HPLC Ultimate 3000 (Thermo Fisher Scientific), operado por personal de la Unidad de Bioquímica y Proteómica Analítica del IPMon.

3.3.12. Purificación de RgpB por cromatografía de afinidad a benzamidina

Se realiza una cromatografía de afinidad a benzamidina de la RgpB purificada por dos IMAC. Para ello, se diluye el percolado de la segunda IMAC en amortiguador de unión para reducir la fuerza iónica a 100 mM de NaCl. Se agregan 500 µL de resina de afinidad *Benzamidine Sepharose™ 4 Fast Flow (High Sub)* (Cytiva, #17512310) a la fracción y se incuban por 30 min a temperatura ambiente. Se vierte la fracción en una columna de purificación abierta y se deja eluir por gravedad, realizando luego un lavado con 5 mL de amortiguador Tris (50 mM Tris pH 8, 5 mM $CaCl_2$).

Se realizan dos eluciones agregando, en cada una, 1 mL de amortiguador Bis-Tris (50 mM Bis-Tris pH 6, 5 mM $CaCl_2$). Se repiten las eluciones con amortiguador acetato (50 mM acetato de sodio pH 4,25, 5 mM $CaCl_2$) y luego con amortiguador glicina (50 mM glicina pH 3, 5 mM $CaCl_2$). Se concentran las fracciones obtenidas por ultrafiltración utilizando columnas *Amicon® Ultra – 0.5 mL Ultracel 3K* (Merck) y se analizan por SDS-PAGE.

3.3.13. Cultivo de células S2

Se descongela un vial de células S2 previamente adaptadas al crecimiento sin suero fetal bovino por el Laboratorio de Inmunovirología del IPMon. En condiciones de esterilidad, se colocan en 10 mL de medio Insect-XPRESS suplementado con penicilina 50 UI/mL y estreptomicina 50 µg/mL, y se centrifugan a 200 *g* por 5 min a temperatura ambiente, para retirar el DMSO utilizado en el congelado. Se descarta el sobrenadante y se resuspende el *pellet* celular en 1 mL del medio cultivo. Se realiza un recuento en cámara de Neubauer, utilizando azul de Tripán 0,05% para determinar la cantidad y viabilidad celular. Se agregan 4 mL del medio de cultivo, para una densidad celular de $4x10^6$ células/mL y se colocan en una botella de cultivo T25. Se incuba a 28°C por 72 h.

Se realizan pasajes para mantener una densidad celular de entre 5 y $7x10^6$ células/mL, utilizando parte del medio condicionado además de medio fresco, primero a una botella T75 y finalmente a una T150. Al alcanzar 20 mL de cultivo con dicha densidad celular, se realiza un pasaje a un matraz de 100 mL y se incuba a 28°C y 100 rpm por 72 h.

3.3.14. Expresión de RgpB recombinante en S2

Para la obtención de una línea celular productora de Pro-RgpB, se realiza una transfección estable. Para ello, se cultivan células S2 a una densidad de $5x10^6$ células/mL en medio Insect-XPRESS suplementado con penicilina y estreptomicina, y se incuba a 28°C y 100 rpm por 24 h.

Se centrifugan las células a 200 *g* por 5 min a temperatura ambiente y se resuspenden en 400 µL de *MaxCyte® electroporation buffer* (Cytiva) para una densidad de $1x10^8$ células/mL. Se realiza una co-transfección de los plásmidos pRgpB_S2 y pCoPuro en una relación 2:1, agregando 160 y 80 µg, respectivamente, y se electroporan siguiendo el protocolo del fabricante en un electroporador ExPERT STx™ de MaxCyte (EE. UU.). Se realiza una co-transfección control con el plásmido pCTRL, que codifica para una proteína previamente expresada en S2 y pCoPuro en una relación 2:1.

Posteriormente, se agregan 20 µL de DNAsa 5 UI/µL y 400 µL del medio de cultivo a las células transfectadas y se transfieren a matraces, incubando por 40 min a 28°C. Se agregan 17 mL del medio de cultivo y se incuban durante 1 h a 28°C. Se transfieren 2 mL de cultivo a una placa de 6 pocillos para un posterior control de viabilidad celular y se incuban junto a los matraces a 28°C y 100 rpm por 72 h.

Luego, se inicia el proceso de selección en los matraces con medio Insect-XPRESS suplementado con penicilina 50 UI/mL, estreptomicina 50 µg/mL y puromicina 6 µg/mL, incubando a 28°C y 100 rpm por 72 h. Finalmente, se induce la expresión a una densidad de $5x10^6$ células/mL con 5 µM $CdCl_2$. Se toman muestras del sobrenadante a 24, 48 y 96 h post-inducción y se analiza la expresión de la Pro-RgpB por *Western blot*.

3.3.15. *Western blot*

Se realiza una SDS-PAGE desnaturalizante utilizando acrilamida al 12%, del sobrenadante obtenido del cultivo inducido, utilizando como control positivo el cultivo transfectado con el plásmido control, y como control negativo uno sin transfectar. Luego, se realiza una transferencia húmeda de proteínas a una membrana de nitrocelulosa *Amersham Protran Premium 0.45 µm NC* (Cytiva) a una corriente constante de 50 mA, ON a 4°C.

Se bloquea la membrana durante 2 h a 37ºC con amortiguador de bloqueo (3% BSA, 0,05% Tween 20, en PBS 1X). Se realizan tres lavados con PBS-T (0,1% Tween en PBS 1X) por 5 minutos a 200 rpm, y se agregan 20 mL de PBS-T con 20 µL de *BioLock Biotin blocking solution* de IBA Lifesciences (Alemania), y se incuba por 10 min a 100 rpm. Esta solución contiene avidina, que se une a biotina o a proteínas biotiniladas presentes en las muestras, permitiendo evitar señales inespecíficas al ser reconocidas por el conjugado *Strep-Tactin® HRP* (IBA Lifesciences).

Se añaden 20 mL de PBS-T con 20 µL de *Strep-Tactin® HRP* 10 µg/mL en amortiguador de enzima (0,2% BSA, 0,1% Tween en PBS 1X), para una concentración final del conjugado de 10 ng/mL. Se incuba la membrana por 1 h y se realizan dos lavados con PBS-T por 1 min a 200 rpm, seguidos de dos lavados con PBS en las mismas condiciones. Se realiza el revelado con el *kit SuperSignal™ West Pico PLUS Chemiluminescent Substrate* (Thermo Scientific, #34577) y se visualiza en el fotodocumentador AMERSHAM ImageQuant 800 (Cytiva).

3.3.16. Cuantificación de RgpB

Para la cuantificación de la RgpB se utilizan el método de Bradford y la medida de la absorbancia a 280 nm. El método de Bradford se basa en la tinción de proteínas de una muestra por el Azul de Coomassie G-250, revelando a 595 nm (115). En una placa de 96 pocillos, se agregan 250 µL de *Bradford Protein Assay Reagent* (Thermo Fischer Scientific) y 5 µL de muestra. Se incuban por 5 min a temperatura ambiente y se mide la absorbancia a 595 nm. Se realiza una curva de calibración utilizando *Albumin Standard* (Thermo Fischer Scientific).

La cuantificación por la medida de absorbancia a 280 nm se realiza en un espectrofotómetro *Cary Eclipse Fluorescence Spectrometer* (Agilent), utilizando el coeficiente de extinción molar de la RgpB de 49850 $M^{-1}cm^{-1}$ calculado por la herramienta ProtParam (116) a partir de la secuencia aminoacídica.

Se determina la proporción de RgpB presente en la muestra por densitometría de las proteínas presentes en la SDS-PAGE utilizando el *software* ImageJ, siguiendo el protocolo de análisis de geles en una dimensión (117).

3.3.17. Determinación de la actividad

Se determina la actividad de la RgpB producida mediante un ensayo fluorométrico, basado en la hidrólisis del sustrato peptídico carboxibencil-glicil-glicil-L-arginil-7-amido-4-metilcumarina (Z-Gly-Gly-Arg-AMC) de Bachem (Suiza). Para ello, se adaptan los ensayos de actividad descritos por Potempa y Nguyen (54), y Veillard y colaboradores (71).

En una placa negra de 96 pocillos (Thermo Fisher Scientific), se agregan 100 μL de amortiguador de actividad 2X (200 mM Tris, 150 mM NaCl, pH 7,5) suplementado con 2 de DTT o β-mercaptoetanol, o 20 mM de L-cisteína, para evaluar el efecto de diferentes agentes reductores, y 5 mM de $CaCl_2$. Se agregan 50 μL RgpB 4X para concentraciones finales de 1, 5, 10, 20 y 50 nM. Como control positivo, se agregan 50 μL de tripsina 4X para una concentración final de 0,6 nM, y 100 μL de amortiguador de unión. Como blanco se utilizan 150 μL de amortiguador de actividad.

Se incuba la placa 10 min a 37°C y se agregan 50 μL de sustrato 4X para una concentración final 5 μM en el pocillo. Se registran las unidades de fluorescencia relativas (RFU) de AMC a 460 nm, generadas por la hidrólisis del sustrato por RgpB durante 1 h a 37°C, con una longitud de onda de excitación de 380 nm. Las mediciones se realizan en el lector de microplacas multimodo Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

3.3.18. Cribado de compuestos inhibidores

Se realiza una búsqueda de potenciales compuestos inhibidores utilizando el *software* Chemfinder, a partir de subestructuras identificadas en inhibidores patentados para RgpA, RgpB y Kgp (82, 83). La búsqueda de compuestos que presenten las subestructuras seleccionadas, se realiza en la quimioteca del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos, determinando un porcentaje de similitud del 90%, indicando que los fragmentos ingresados pueden superponerse como parte de estructuras más complejas, y que pueden estar presentes fragmentos adicionales en la molécula.

4. Resultados y discusión

4.1. Expresión de RgpB recombinante

4.1.1. Expresión de Pro-RgpB en *E. coli*

En el presente trabajo, se expresó la RgpB recombinante en la cepa de *E. coli* Rosetta como parte de una construcción inactiva, diseñada para activarse luego del tratamiento con la proteasa TEV, de forma de evitar posibles problemas de toxicidad asociados a su actividad proteolítica. A su vez, se expresó fusionada a Trx con el objetivo de aumentar la solubilidad de la gingipaína.

La elección de la cepa *E. coli* Rosetta para la expresión de la RgpB se basa en la experiencia positiva del Laboratorio de Inmunovirología en la expresión de proteasas recombinantes utilizando esta cepa. Se caracteriza por ser una derivada de la cepa BL21, diseñada para mejorar la expresión de proteínas eucariotas que contienen codones que rara vez se utilizan en *E. coli*. Los codones están codificados en el plásmido pRARE, que confiere resistencia a cloranfenicol. Por esta razón, no se optimiza el constructo para el uso de codones de *E. coli*.

Al expresar la Pro-RgpB en medio TB, se obtuvieron aproximadamente 8 g de *pellet* bacteriano húmedo en 500 mL de cultivo (16 g/L), mientras que la expresión en medio de autoinducción alcanzó un rendimiento de 1,2 g de *pellet* húmedo en 50 mL de medio (24 g/L). Para evaluar la expresión de la gingipaína, se lisó el *pellet* bacteriano y se analizaron por SDS-PAGE las fracciones de proteínas totales, insolubles y solubles de los extractos obtenidos al expresar la RgpB recombinante en medio TB por 4 h a 37°C y ON a 20°C, inducidos con 0,1 mM de IPTG (Figura 4.1).

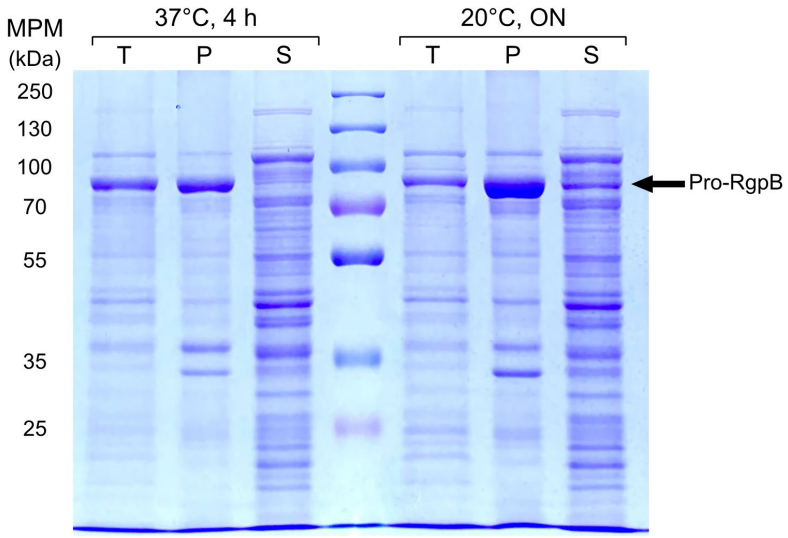

Figura 4.1. Evaluación del efecto de la temperatura en la expresión de RgpB por SDS-PAGE. T, proteínas totales; P, proteínas insolubles o pellet; S, proteínas solubles. MPM, marcador de peso molecular.

Se observa una banda intensa de aproximadamente 85 kDa en la fracción de proteínas totales de ambas condiciones evaluadas, correspondiente al peso molecular de la Pro-RgpB. Para la proteína expresada a 37°C, se visualiza la presencia de dicha banda en la fracción insoluble, estando ausente en la fracción soluble. Sin embargo, al expresar la gingipaína a 20°C, se observa la banda de 85 kDa en la fracción soluble, si bien la mayor parte de la proteína parecería estar presente en la fracción insoluble.

Este resultado indica que la temperatura de inducción elegida para la expresión de la RgpB afecta la solubilidad de la proteína. Esto es consistente con las características de la producción de proteínas recombinantes en *E. coli*, donde la reducción de la temperatura de expresión de 37°C a temperaturas entre 15 y 25°C tiende a mejorar la solubilidad de las proteínas recombinantes (118). A temperaturas más bajas, los procesos celulares se ralentizan, lo que conduce a una disminución en las tasas de transcripción, traducción y división celular, favoreciendo una reducción en la agregación de proteínas (119, 120). Además, al disminuir la temperatura, la velocidad de reacción de las enzimas disminuye (121). Se ha observado que el zimógeno de RgpB tiene una actividad catalítica nula o baja, con una k_{cat}/K_M 80 veces menor que la proteína madura (51, 103). La disminución de la temperatura podría reducir la

actividad catalítica residual de la gingipaína expresada, causando una menor agregación de la proteína como respuesta a una menor toxicidad para la bacteria.

A partir de este resultado, se optó por continuar expresando la RgpB a 20°C, y evaluar el efecto de la concentración de inductor en la expresión. En la Figura 4.2, se presenta una SDS-PAGE comparando las fracciones de proteínas totales, insolubles y solubles de los extractos obtenidos al inducir la expresión con 0,1; 0,2; 0,3; 0,5 y 1 mM de IPTG o en el medio de Autoinducción.

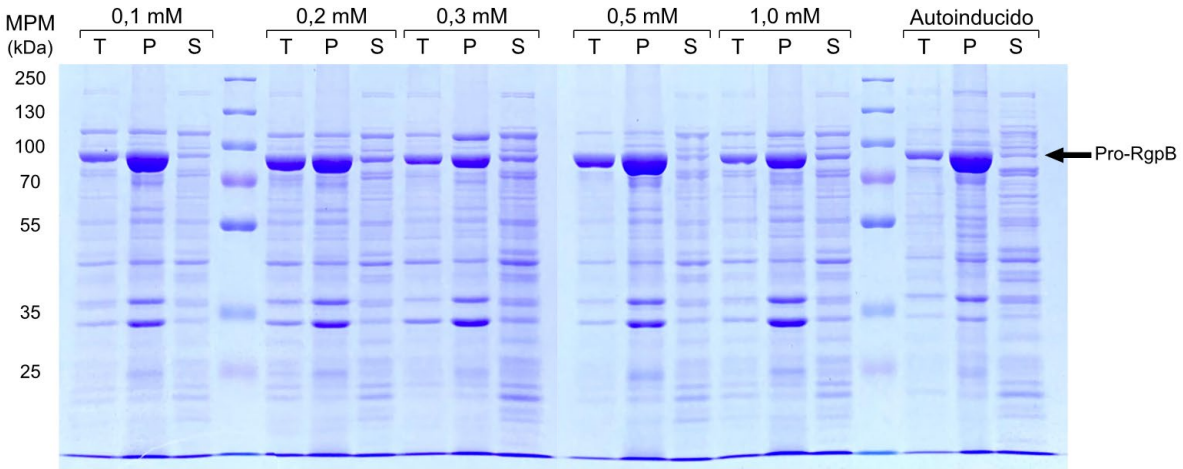

Figura 4.2. Evaluación del efecto de la concentración de inductor en la expresión de RgpB por SDS-PAGE. T, proteínas totales; P, proteínas insolubles o pellet; S, proteínas solubles. MPM, marcador de peso molecular.

La banda de 85 kDa concordante con el peso molecular de la Pro-RgpB se observa en todas las fracciones, para las seis condiciones evaluadas. Destaca como la proteína se encuentra mayoritariamente en la fracción insoluble para todas las condiciones, pudiendo observarse la mayor proporción en la fracción soluble cuando se indujo con 0,2 y 0,3 mM de IPTG.

La concentración de inductor utilizada para la expresión, puede impactar en la cantidad de proteína producida y de proteína soluble recuperada (122). Si bien la cantidad de proteína expresada puede aumentar a mayor concentración de IPTG, este efecto no es regulable en cepas de *E. coli* como Rosetta, por el transporte activo del inductor hacia el interior celular, a través del transportador de lactosa LacY. El promotor T7 solamente puede ser regulado por la concentración de IPTG en cepas como la Tuner™ (DE3), la cual deriva de la cepa de

expresión BL21 (DE3) y contiene una mutación en el gen *lacY*, para permitir la captación del inductor únicamente por difusión pasiva. Esto permite ajustar con precisión el nivel de inducción y promover, en algunos casos, la producción de proteína soluble (123). Esto explicaría por qué no se obtiene una clara tendencia en la cantidad de Pro-RgpB expresada, a medida que aumenta la concentración del inductor.

La concentración de IPTG suele ser un parámetro que requiere ponerse a punto para la expresión de una proteína recombinante. Si bien se suelen utilizar concentraciones de inductor altas, como 1 mM, para que se encuentre en exceso respecto a la cantidad de células en el medio de cultivo, existen proteínas que alcanzan mejores rendimientos de proteína soluble al reducir la concentración de IPTG entre 0,1 y 0,5 mM (124–126). Considerando el resultado obtenido al inducir la expresión con 0,1 mM de IPTG, se evaluaron diferentes concentraciones del inductor, con el objetivo de obtener un rango que permita alcanzar un buen rendimiento de la Pro-RgpB soluble. Al inducir con 0,2 y 0,3 mM de IPTG, se logra aumentar la proporción de proteína soluble obtenida, respecto a la inducción inicial con 0,1 mM.

Cuando se utilizó la estrategia de autoinducción con el medio desarrollado por Studier (114), se observa una banda de 85 kDa muy estrecha en la fracción de proteínas solubles, estando presente mayoritariamente en la fracción insoluble. Esta estrategia se basa en la metabolización diferencial de los azúcares presentes en el medio ZYM-5052 para inducir la expresión. La glucosa se metaboliza preferentemente en la proliferación celular, permitiendo alcanzar una alta densidad celular y evitando la absorción de lactosa hasta su agotamiento, generalmente en la fase logarítmica media o tardía del crecimiento. Cuando comienza a absorberse la lactosa, la enzima β-galactosidasa la convierte en el inductor alolactosa, que provoca la liberación del represor lac e induce la expresión de la ARN polimerasa T7 a partir del promotor lacUV5, y desbloquea el promotor T7lac, lo que permite la expresión de RgpB. Dado que la lactosa no es una fuente de carbono eficiente para la producción continua de proteína luego de la autoinducción, el medio incluye glicerol, que favorece un crecimiento a alta densidad sin interferir con la expresión.

La expresión de proteínas recombinantes en un medio de autoinducción puede beneficiar la solubilidad, ya que esta estrategia parecería tener un menor impacto en la agregación de las

proteínas mal plegadas respecto a la inducción con IPTG (122). Sin embargo, al expresar la Pro-RgpB en ZYM-5052 se obtuvo una menor proporción de proteína soluble que al inducir con IPTG. Esto podría deberse a la reportada toxicidad de las gingipaínas para *E. coli*. El aumento del tiempo de incubación de 16 a 48 h, podría haber promovido la agregación de la proteína expresada, formando cuerpos de inclusión para reducir la toxicidad a la célula huésped. A su vez, el medio ZYM-5052 puede ser un buen punto de partida para la expresión de proteínas por autoinducción, pero las concentraciones de glucosa, lactosa y glicerol requieren de optimización para obtener la mayor cantidad de proteína soluble (122, 127).

En base a estos resultados, se selecciona la expresión a 20°C en medio TB inducido con 0,2 mM de IPTG como la condición que otorgó la mayor proporción de proteína expresada en la fracción soluble.

La expresión soluble de la Pro-RgpB es un punto que podría continuar optimizándose, ya que al observar la Figura 4.2, la mayor proporción de proteína expresada se encuentra en la fracción insoluble, para todas las condiciones evaluadas. Una posible alternativa para mejorar la solubilidad podría ser evaluar la fusión a distintas proteínas solubilizadoras, utilizando la batería de vectores para *E. coli* desarrollada por Ortega y colaboradores (96), que permite evaluar de forma sencilla la expresión de una proteína recombinante con cinco proteínas que mejoran la solubilidad (SUMO, DsbC, MBP, CelD o GST) además de la fusión a Trx ya evaluada.

4.1.2. Expresión de Pro-RgpB en S2

Tomando en consideración los desafíos reportados de la expresión de gingipaínas en *E. coli*, especialmente la potencial toxicidad como una limitante, se exploró la posibilidad de producir la RgpB en la línea celular S2, un sistema de expresión eucariota proveniente de *Drosophila melanogaster*, capaz de secretar la proteína recombinante. Para ello, se expresó la gingipaína como parte de una construcción inactiva, diseñada para activarse luego del corte con la proteasa TEV. Se incluye en el extremo N-terminal, la señal de exportación BiP para la expresión extracelular de la proteína, para facilitar su posterior purificación del sobrenadante del cultivo y limitar potenciales problemas de toxicidad por acumulación en el interior celular.

En la Figura 4.3 se presenta un *Western blot* evaluando la expresión de la Pro-RgpB a las 24, 48 y 96 h de la inducción del cultivo, utilizando el conjugado *Strep-Tactin® HRP* el cual consiste en una estreptavidina ingenierizada para la unión específica a los péptidos StrepTagII® y Twin-Strep-tag®, conjugada a la peroxidasa de rábano. Esta etiqueta de afinidad permite la detección de proteínas que poseen estas etiquetas, como la Pro-RgpB y la proteína utilizada como control de la expresión.

Se observa la presencia de una banda de aproximadamente 90 kDa en los sobrenadantes obtenidos del cultivo luego de 24, 48 y 96 h de inducida la expresión, pudiendo apreciarse un aumento en la cantidad de proteína con el paso de los días. En el sobrenadante de células transfectadas con el pCTRL, que expresan el dominio de unión al receptor de la proteína Env del virus de la leucemia bovina de 21 kDa, se distingue la presencia de tres bandas de entre 15 y 25 kDa. No se observan bandas en el carril correspondiente al sobrenadante de células sin transfectar.

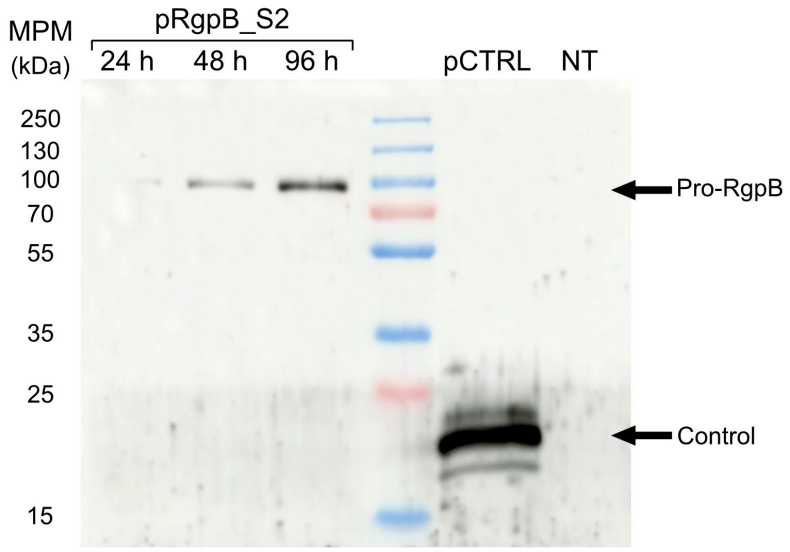

Figura 4.3. Evaluación de la expresión de RgpB en S2 mediante *Western blot*. pRgpB_S2, sobrenadante de células transfectadas con el plásmido pRgpB_S2 pasadas 24, 48 y 96 h de la inducción. pCTRL, sobrenadante de células transfectadas con plásmido control, 48 h post-inducción. NT, sobrenadante de células no transfectadas. MPM, marcador de peso molecular.

La Pro-RgpB expresada parecería tener un peso molecular mayor al esperado, de aproximadamente 90 en lugar de 77 kDa. Esto podría explicarse por la glicosilación de la proteína expresada, ya que las S2 son capaces de realizar tanto N-glicosilación en residuos

de arginina, como O-glicosilación en residuos de serina y treonina. La glicosilación disminuye la migración de las glicoproteínas en una SDS-PAGE, por la pobre interacción de los glicanos con el SDS, lo que resulta en un mayor peso molecular aparente (128). Para confirmar esto, se podría desglicosilar la proteína y analizar si su peso molecular disminuye en un *Western blot*.

Durante la expresión de la Pro-RgpB, se observa un aumento progresivo en la intensidad de la banda con el paso de los días, lo que sugiere que extender el tiempo de incubación hasta una semana podría incrementar la cantidad de proteína producida, contribuyendo a mejorar el rendimiento de la expresión en este sistema. De hecho, el tiempo de expresión de una proteína recombinante en células S2 es un parámetro a optimizar. Se ha observado que algunas proteínas producidas en este sistema, como la proteína control, alcanzan altos niveles de expresión ya a las 48 h post-inducción (109). Sin embargo, otras requieren períodos más prolongados, siendo necesario incubar los cultivos por hasta una semana para obtener cantidades adecuadas para su uso posterior (108, 110).

De todas formas, se debería confirmar que la proteína expresada corresponde efectivamente la Pro-RgpB y si es activa. Para ello, se podría realizar una identificación por espectrometría de masas. Posteriormente, se debería purificar a partir del sobrenadante para evaluar el rendimiento final del proceso, y evaluar la actividad catalítica de la RgpB obtenida.

4.2. Purificación de RgpB expresada en *E. coli*

4.2.1. Purificación por dos IMAC

Para la purificación de la RgpB producida en *E. coli*, se diseñó una estrategia inicial a partir de la fracción de proteínas solubles obtenida (Figura 4.4).

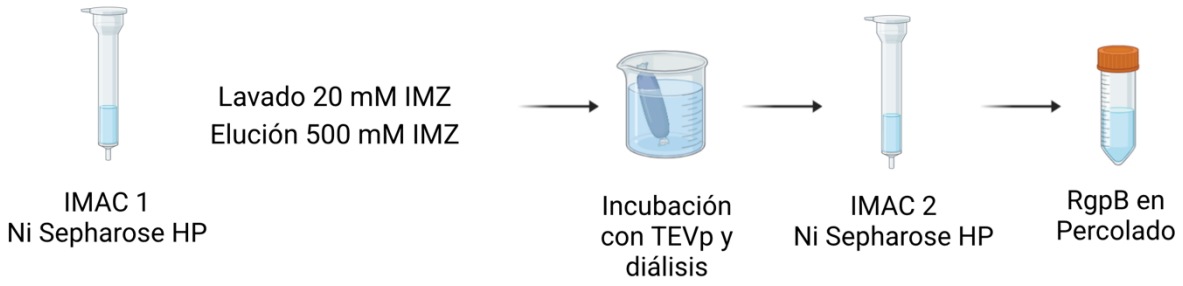

Figura 4.4. Esquema de la estrategia de purificación inicial por dos IMAC. Representación realizada con BioRender.

Se realizó un primer paso de purificación por IMAC, la cual se basa en la interacción específica de una cadena de polihistidinas y cationes metálicos como el níquel. Los iones metálicos están unidos a ligandos quelantes, que a su vez se encuentran unidos covalentemente a una matriz polimérica insoluble. Este método permite separar proteínas con una etiqueta de afinidad de histidinas (6xHis), como el incorporado en la construcción de la Pro-RgpB, debido a la interacción de los residuos de histidina con los cationes de níquel inmovilizados, mientras que otras proteínas sin la etiqueta o con baja afinidad por el níquel, fluyen a través de la columna. Un paso de lavado posterior ayuda a eliminar las proteínas unidas de forma no específica, y el agregado de un amortiguador con alta concentración de imidazol, que actúa como un agente de desplazamiento compitiendo con los residuos de histidina por la interacción con el níquel, permite eluir la proteína de interés.

La obtención de la RgpB recombinante activa requiere un corte proteolítico utilizando la proteasa TEV, con el fin de separar el propéptido y la proteína de fusión, del dominio catalítico. Para ello, se expresó y purificó una TEVp que contiene un StrepTagII® seguido de una etiqueta 6xHis, de acuerdo con el trabajo de Dalla Rizza y colaboradores (112). Se realizó la digestión de la Pro-RgpB agregando 1 mg de TEVp por cada 10 mg de proteínas totales en el eluido de la primera IMAC, incubando primero a temperatura ambiente y luego a 4°C durante una diálisis para disminuir la concentración de imidazol a menos de 10 mM. Finalmente, se realizó un segundo paso de purificación por IMAC esperando retener el propéptido y la TEVp en la columna, y obtener la RgpB en el percolado. En la Figura 4.5 se presenta una SDS-PAGE evaluando la purificación de la RgpB por dos IMAC.

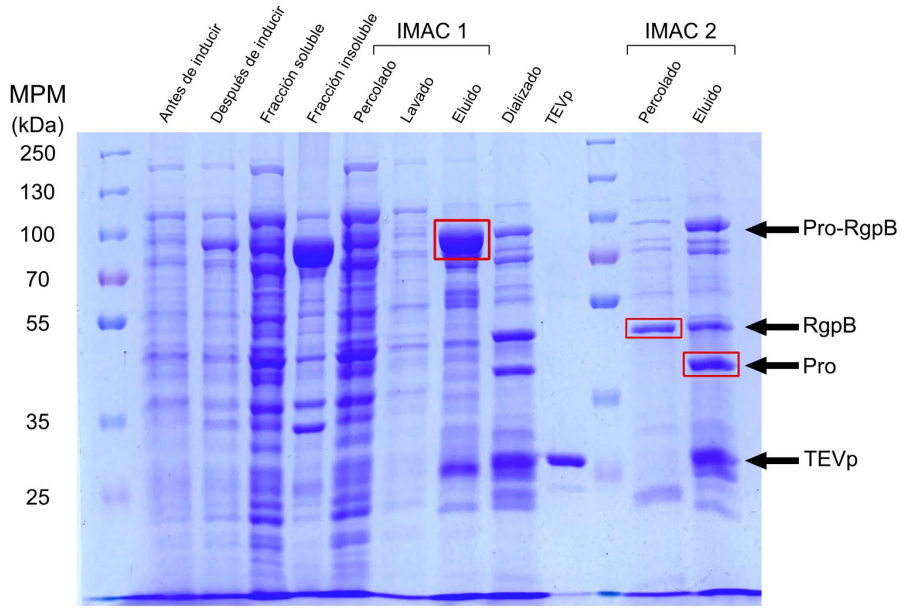

Figura 4.5. Evaluación de la primera estrategia de purificación por SDS-PAGE. Se muestran las fracciones antes y después de inducir la expresión de la Pro-RgpB, las fracciones soluble e insoluble obtenidas luego de la lisis bacteriana, las fracciones de la IMAC 1 (percolado, lavado y eluido), la fracción dializada, la TEVp, y las fracciones de la IMAC 2 (percolado y eluido). Se indican en rojo las bandas analizadas por espectrometría de masas. MPM, marcador de peso molecular.

En el eluido de la primera IMAC destaca una banda de aproximadamente 85 kDa, concordante con el peso molecular de la Pro-RgpB (85,5 kDa). Se observa como en la fracción dializada luego del agregado de la TEVp, se reduce la intensidad de la banda, y aparecen dos bandas de aproximadamente 50 y 40 kDa, consistentes con los tamaños de la RgpB (48 kDa) y el propéptido (37,5 kDa), respectivamente. En el percolado de la segunda IMAC no se observa la banda de 40 kDa, la cual sí está presente en el eluido. Mientras que la banda de 50 kDa, se encuentra tanto en el percolado como en el eluido de la segunda cromatografía.

Para corroborar la correcta expresión y purificación de la Pro-RgpB en el eluido de la primera IMAC, así como también confirmar que la proteasa TEV cortó en el sitio previsto, permitiendo separar la RgpB del resto de la construcción, se realizó un análisis mediante espectrometría de masa de las bandas indicadas en la Figura 4.5. Se obtuvo una cobertura de 87% para la Pro-RgpB, de 59% para la RgpB y de 79% para la fusión Pro (Figura 4.6). Se observa como la cobertura del propéptido termina en la Gln343 y la cobertura de RgpB comienza en la S344, exactamente en el sitio de corte de la TEVp. En base a estos resultados,

se confirma la expresión de la RgpB en *E. coli* y su obtención en el percolado de la segunda IMAC al final de la purificación.

Sin embargo, se evidencia a la RgpB en el eluido de la IMAC 2. No se esperaba que la RgpB interaccione con la resina de afinidad en la segunda IMAC, como la etiqueta 6xHis se encuentra fusionado únicamente al propéptido. Por lo que, la presencia de la gingipaína en el eluido de la IMAC 2 podría explicarse por la interacción entre la RgpB y el propéptido, aún después del corte con la TEVp. Se ha reportado que la K_i del par enzima-propéptido es de 6,2 nM, con un 16% de la superficie total del propéptido involucrada en la interacción entre estos dominios. Se han identificado 82 interacciones individuales entre la RgpB y su propéptido incluyendo tres puentes salinos, una interacción proteína-metal, veintiún puentes de hidrógeno e interacciones hidrofóbicas entre once residuos del propéptido y trece del dominio catalítico (64). Por lo tanto, la fuerte interacción entre los dominios podría ser suficiente para provocar que la RgpB quede retenida en la columna, por su interacción indirecta con la matriz, mediada por el propéptido.

A

```
>Pro-RgpB | 779 bp | Coverage: 676/779 = 0.87
MRGSHHHHHHGSSGMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEI 060
ADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDA 120
NLAGSGSGSENLYGPLGSQPAERGRNPQVRLLSAEQSMSKVQFRMDNLQFTGVQTSKGVA 180
QVPTFTEGVNISEKGTPILPILSRSLAVSETRAMKVEVVSSKFIEKKDVLIAPSKGVISR 240
AENPDQIPYVYGQSYNEDKFFPGEIATLSDPFILRDVRGQVVNFAPLQYNPVTKTLRIYT 300
EIVVAVSETAEAGQNTISLVKNSTFTGFEDIYKSVFMENLYFQSYTPVEEKENGRMIVIV 360
AKKYEGDIKDFVDWKNQRGLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFVKQEYEKEGNDLTYVLLV 420
GDHKDIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKEDLKTQIDRTIHYERNIT 480
TEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGYTKIIKCYDPGVTPKNII 540
DAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFIFDVACVNGDFLFSMPCF 600
AEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTIDQYWAPPMRGQDEMNEILCEKHPNNIKRTFGGVTMN 660
GMFAMVEKYKKDGENMLDTWTVFGDPSLLVRTLVPTEMQVTAPANISASAQTFEVACDYN 720
GAIATLSDDGDMVGTAIVKDGKAIIKLNESIADETNLTLTVVGYNKVTVIKDVKVEGTS
```

B

```
>RgpB | 436 bp | Coverage: 258/436 = 0.59
SYTPVEEKENGRMIVIVAKKYEGDIKDFVDWKNQRGLRTEVKVAEDIASPVTANAIQQFV 060
KQEYEKEGNDLTYVLLVGDHKDIPAKITPGIKSDQVYGQIVGNDHYNEVFIGRFSCESKE 120
DLKTQIDRTIHYERNITTEDKWLGQALCIASAEGGPSADNGESDIQHENVIANLLTQYGY 180
TKIIKCYDPGVTPKNIIDAFNGGISLVNYTGHGSETAWGTSHFGTTHVKQLTNSNQLPFI 240
FDVACVNGDFLFSMPCFAEALMRAQKDGKPTGTVAIIASTIDQYWAPPMRGQDEMNEILC 300
EKHPNNIKRTFGGVTMNGMFAMVEKYKKDGENMLDTWTVFGDPSLLVRTLVPTEMQVTAP 360
ANISASAQTFEVACDYNGAIATLSDDGDMVGTAIVKDGKAIIKLNESIADETNLTLTVVG 420
YNKVTVIKDVKVEGTS
```

C

```
>Pro | 343 bp | Coverage: 271/343 = 0.79
MRGSHHHHHHGSSGMSDKIIHLTDDSFDTDVLKADGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEI 060
ADEYQGKLTVAKLNIDQNPGTAPKYGIRGIPTLLLFKNGEVAATKVGALSKGQLKEFLDA 120
NLAGSGSGSENLYGPLGSQPAERGRNPQVRLLSAEQSMSKVQFRMDNLQFTGVQTSKGVA 180
QVPTFTEGVNISEKGTPILPILSRSLAVSETRAMKVEVVSSKFIEKKDVLIAPSKGVISR 240
AENPDQIPYVYGQSYNEDKFFPGEIATLSDPFILRDVRGQVVNFAPLQYNPVTKTLRIYT 300
EIVVAVSETAEAGQNTISLVKNSTFTGFEDIYKSVFMENLYFQ
```

Figura 4.6. Identificación de proteínas por espectrometría de masas. Los péptidos identificados se señalan en azul. Se indica subrayado el sitio de corte de la TEVp **A.** Pro-RgpB. **B.** RgpB. **C.** Pro.

4.2.2. Alternativas de purificación por dos IMAC

Si bien se obtuvo la RgpB al final de la purificación inicial, la presencia de varias proteínas contaminantes en la muestra llevó a modificar la estrategia de purificación, con el objetivo de incrementar la pureza de la RgpB obtenida. En la Figura 4.7 se esquematizan las dos modificaciones evaluadas en la purificación por dos IMAC.

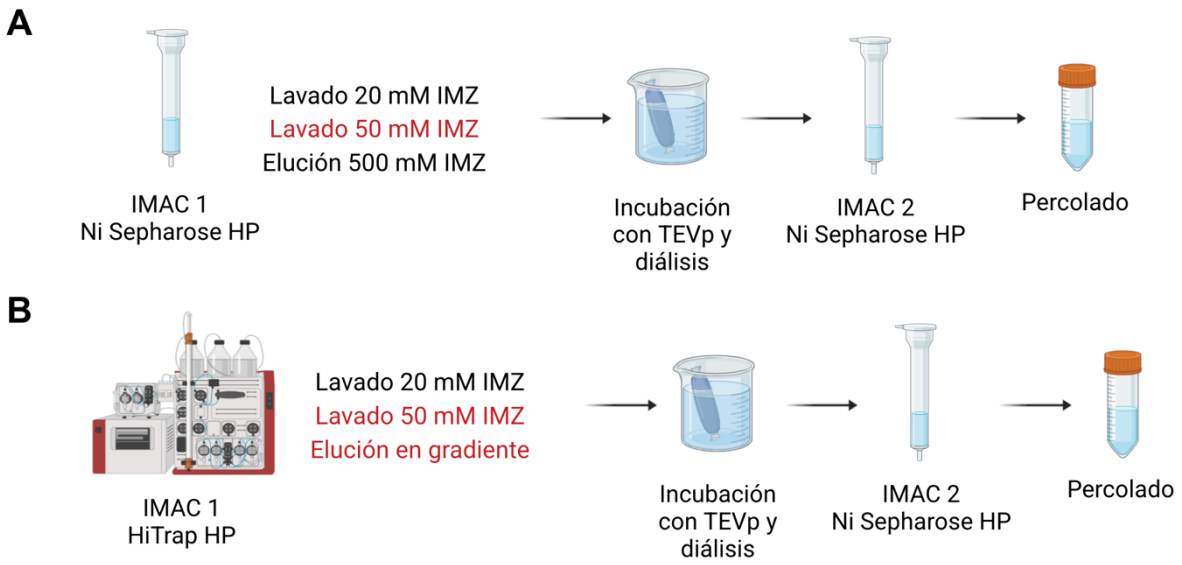

Figura 4.7. Esquema de las estrategias alternativas de purificación por dos IMAC. Se evidencian en rojo las modificaciones a la estrategia inicial. **A.** Purificación con lavado adicional en IMAC 1, en *batch*. **B.** Purificación con lavado adicional y elución en gradiente en IMAC 1, en sistema FPLC. Representación realizada con BioRender.

Por un lado, se incluyó un lavado adicional con 50 mM de imidazol a la purificación en *batch*. Mientras que, por otro lado, se sustituyó la resina de afinidad de la IMAC 1, por una columna pre-empacada *HiTrap ™ IMAC HP*. Con esta columna se realizó la purificación en un equipo de FPLC AKTA pure 25, con un flujo de 1 mL/min y detección en línea a 280 nm. Se incorpora el lavado con 50 mM de imidazol y se eluye en un gradiente hasta alcanzar 500 mM.

En la Figura 4.8 se presenta el cromatograma obtenido de la purificación en FPLC. Se observa un único pico estrecho con una absorbancia a 280 nm máxima de aproximadamente 5500 mAU, en la elución realizada en gradiente. Se recolectó este pico y se continuó la purificación, incubando con la TEVp y dializando para realizar posteriormente una segunda IMAC y obtener la RgpB en el percolado.

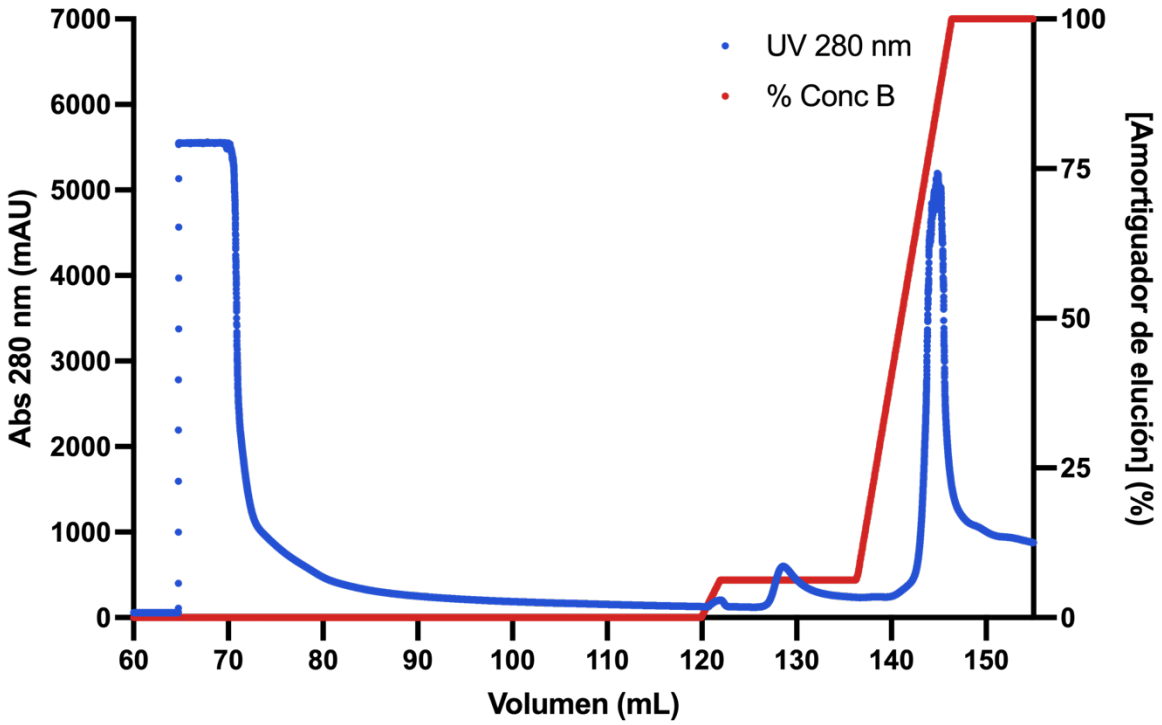

Figura 4.8. Cromatograma obtenido de la purificación de la Pro-RgpB por IMAC en FPLC. Se recolecta el pico eluido entre 142 y 148 mL.

En la Figura 4.9 se presenta una SDS-PAGE comparando la RgpB obtenida al final de las purificaciones en *batch* y por FPLC. Se observa la banda correspondiente a la RgpB al final de ambas estrategias de purificación evaluadas. Si bien están presentes numerosas bandas de pesos moleculares distintos a la gingipaína en ambas muestras, destaca como la RgpB obtenida al purificar por IMAC en *batch* presenta una menor cantidad de proteínas contaminantes respecto a la primera purificación realizada (Figura 4.5). Al agregar un segundo lavado, con una mayor concentración de imidazol, se aumenta la competencia por la interacción con el níquel en la columna, logrando eluir aún más proteínas unidas de forma inespecífica, y obtener una mayor pureza al final de la purificación.

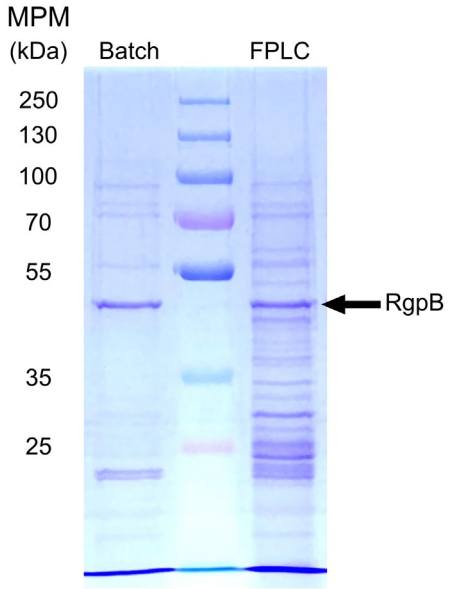

Figura 4.9. Comparación de RgpB obtenida en estrategias adicionales de purificación por dos IMAC, mediante SDS-PAGE. *Batch*, purificación por IMAC con resina de afinidad en *batch*. FPLC, purificación por IMAC en sistema FPLC. MPM, marcador de peso molecular.

La purificación en un sistema FPLC presenta ventajas, como la posibilidad de eluir en un gradiente de concentración del amortiguador de elución, permitiendo remover proteínas que interaccionan con la matriz de forma inespecífica y recolectar la proteína de interés en base a los picos obtenidos en un cromatograma. Sin embargo, al realizar la primera IMAC con este sistema, se obtuvieron más proteínas contaminantes respecto a la purificación en *batch*. Esto podría explicarse por la cantidad de resina utilizada, ya que la columna pre-empacada era de 5 mL y de resina de afinidad en *batch* solo se utilizó 1 mL. Al utilizar más cantidad de resina, hay más superficie de interacción, pudiendo ocurrir más interacciones inespecíficas.

Por esta razón, se mantiene el uso de la resina de afinidad en la primera IMAC, y se incorpora el lavado con 50 mM de imidazol, que permitió remover algunas proteínas contaminantes, pero no fue suficiente para obtener la proteína pura.

4.2.3. Purificación de RgpB por afinidad a benzamidina

La persistencia de proteínas contaminantes llevó a evaluar una cuarta estrategia de purificación de la RgpB, agregando un paso final de cromatografía de afinidad a benzamidina (Figura 4.10).

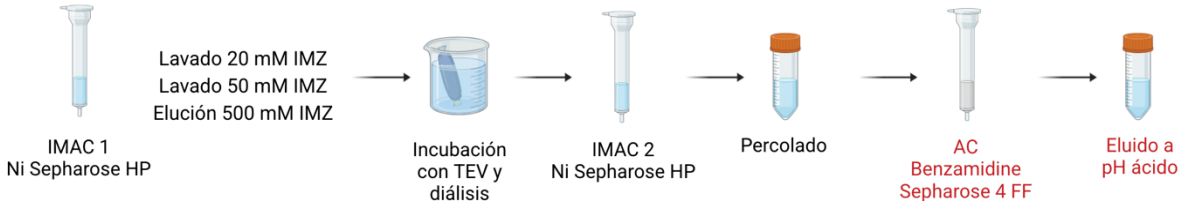

Figura 4.10. Esquema de la estrategia de purificación con una cromatografía de afinidad a benzamidina. Se evidencian en rojo las modificaciones a la segunda estrategia. Representación realizada con BioRender.

La benzamidina es un inhibidor específico de proteasas como la tripsina, trombina y factor Xa, y se caracteriza por su fuerte interacción con el sitio activo. En esta técnica, se utiliza como ligando p-aminobenzamidina inmovilizada en una matriz polimérica insoluble. Al pasar una muestra que contiene proteasas con afinidad por benzamidina, se unen al ligando inmovilizado, permitiendo separarlas del resto de las proteínas presentes en la muestra. Tras un paso de lavado para eliminar proteínas unidas de forma inespecífica, se eluye la proteasa de interés usando un amortiguador con alta concentración de un competidor, como benzamidina libre, o modificando el pH (129).

Dada la reportada afinidad de las gingipaínas por la benzamidina, se incluyó esta cromatografía como paso final de purificación, para lograr separarla de las proteínas contaminantes (54). Se optó por eluir acidificando el pH, utilizando amortiguadores con pH 6; 4,25 y 3; al tener en cuenta que el punto isoeléctrico teórico de la RgpB expresada es 5,15.

En la Figura 4.11 se presenta una SDS-PAGE evaluando la purificación de la RgpB por cromatografía de afinidad a benzamidina, luego de dos purificaciones por IMAC. Se observa la presencia de la RgpB en los eluidos 3 a 6, eluyendo a pH 4,25 y 3. Si bien en la fracción no unida a la resina se visualizan varias proteínas, en las últimas cuatro fracciones no solamente eluyó la RgpB, sino que se observan numerosas proteínas contaminantes, destacando como algunas se concentran respecto a la muestra de partida.

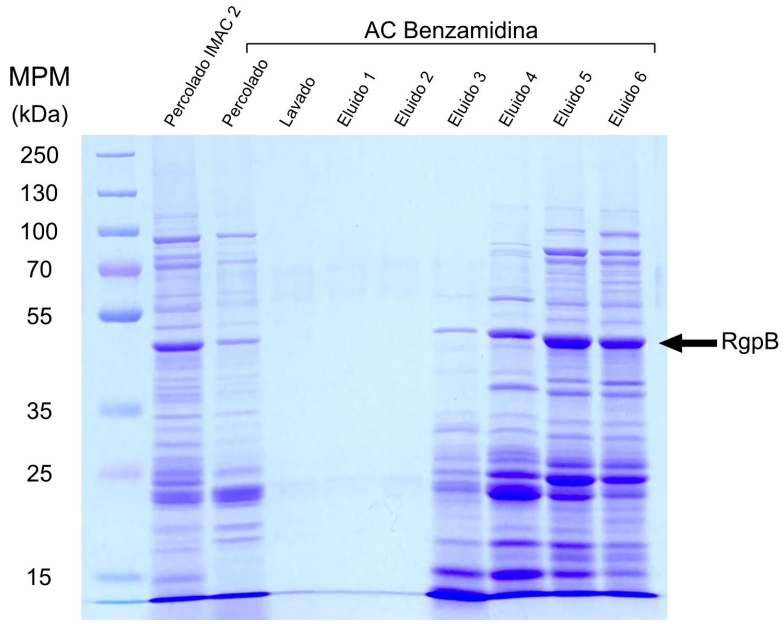

Figura 4.11. Evaluación de la purificación por cromatografía de afinidad a benzamidina mediante SDS-PAGE. Eluidos 1 y 2, en amortiguador Bis-Tris (pH 6). Eluidos 3 y 4, en amortiguador acetato (pH 4,25). Eluidos 5 y 6, en amortiguador glicina (pH 3). MPM, marcador de peso molecular.

La interacción inesperada de las proteínas contaminantes con la resina de afinidad podría explicarse por la baja fuerza iónica de las soluciones amortiguadoras utilizadas, dando lugar a interacciones inespecíficas. A su vez, podría deberse a la posible interacción de estas proteínas con la RgpB, por ejemplo, en el subdominio tipo inmunoglobulina. Esto permitiría su permanencia en la columna, al estar unidas a la RgpB, que interacciona con la benzamidina inmovilizada.

A partir del resultado obtenido, se considera que la incorporación de una cromatografía de afinidad a benzamidina fue ineficaz para reducir la cantidad de proteínas contaminantes, y aumentar así la pureza de la RgpB. Sin embargo, dado que la enzima interacciona con la columna, se podría poner a punto la purificación, por ejemplo evaluando soluciones amortiguadoras de distintos pH y fuerza iónica.

4.2.4. Purificación de Pro-RgpB por intercambio iónico

Se evaluó una última estrategia de purificación para incrementar la pureza de la gingipaína, agregando un paso de purificación intermedio por cromatografía de intercambio iónico, luego de la primera IMAC (Figura 4.12).

Figura 4.12. Esquema de la estrategia de purificación con una cromatografía de intercambio iónico. Se evidencian en rojo las modificaciones a la segunda estrategia. Representación realizada con BioRender.

La cromatografía de intercambio iónico permite separar proteínas en función de las diferencias en su carga neta superficial. En una cromatografía de intercambio aniónico, las proteínas cargadas negativamente se unen a la resina cargada positivamente, mientras que aquellas con carga positiva o neutra no se retienen. Al aplicar una gradiente de sal, los aniones compiten por los sitios de unión, lo que permite eluir las proteínas según su carga, liberando primero las que tienen menor carga negativa y, posteriormente, las de mayor carga.

En la presente purificación, se realizó un cambio de amortiguador del eluido obtenido de la primera IMAC para disminuir fuerza iónica y permitir que las proteínas interaccionen con la matriz cargada positivamente. La Pro-RgpB presenta una carga neta negativa a pH 8, dado que su pI teórico es de 5,19; pudiendo interaccionar con una matriz cargada positivamente. Se inyectó la muestra en una columna *MonoQ 5/50 GL* y se eluyó primero en un gradiente de 10 a 500 mM de NaCl, y finalmente a 1000 mM.

En la Figura 4.13 se presentan los cromatogramas obtenidos, mientras que la composición de los picos se evalúa por SDS-PAGE en la Figura 4.14.

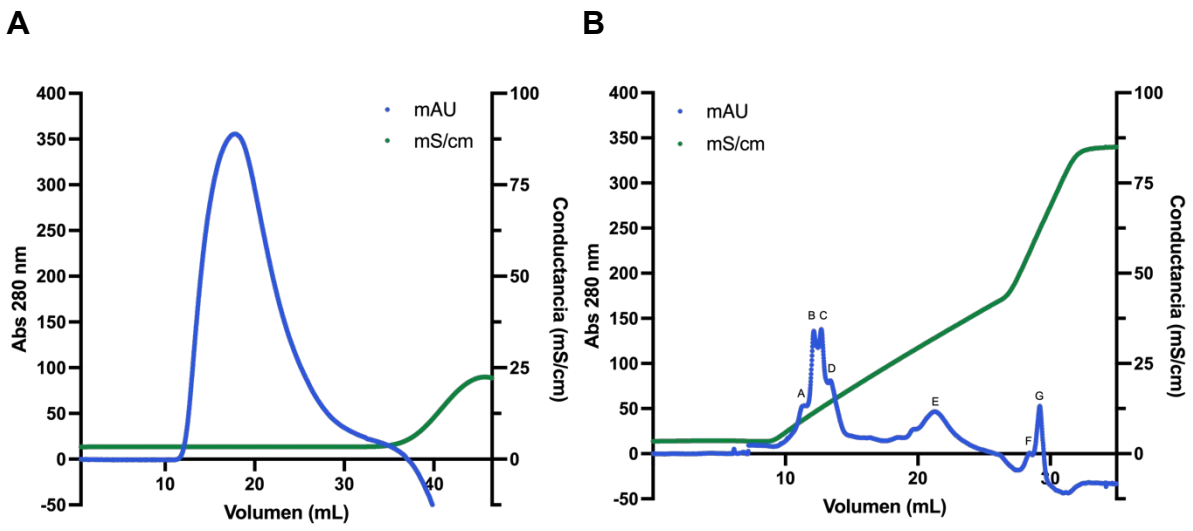

Figura 4.13. Cromatogramas obtenidos de la purificación de la Pro-RgpB por IEX. A. Cromatograma resultante del cambio de amortiguador. **B.** Cromatograma resultante de la IEX. Se identifica cada pico obtenido en el eluido con una letra.

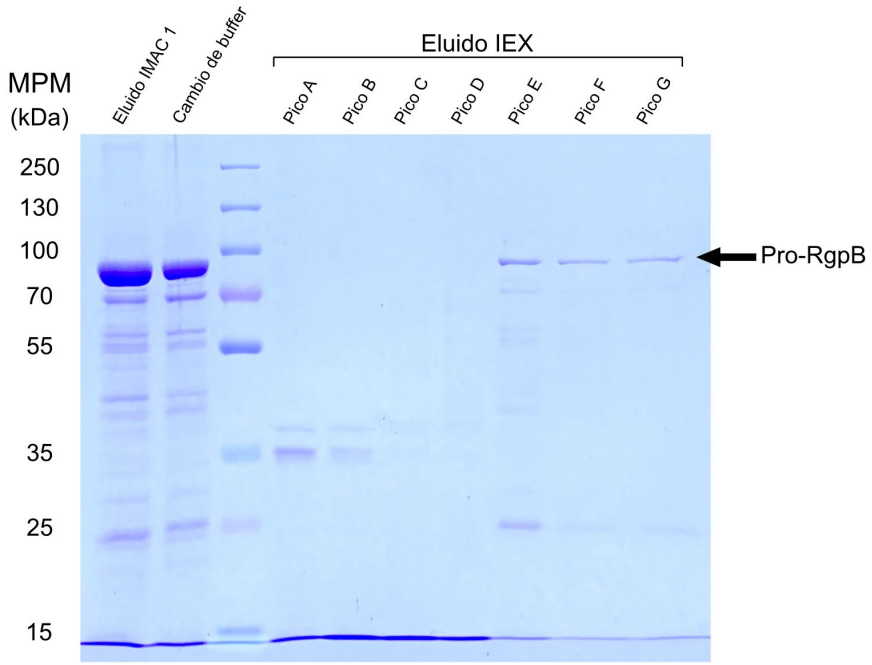

Figura 4.14. Evaluación de la purificación de la Pro-RgpB por IEX mediante SDS-PAGE. Se muestra la fracción recuperada del cambio de amortiguador y los siete picos obtenidos en la elución. MPM, marcador de peso molecular.

En el cromatograma destaca como la absorbancia correspondiente al pico recolectado en el cambio de amortiguador, es mayor que la suma de la absorbancia de todos los picos obtenidos

en la purificación por IEX. Esto se ve reflejado en la SDS-PAGE, donde se observan bandas tenues en todos los picos del eluido, pudiendo distinguirse la Pro-RgpB en las fracciones correspondientes a los picos E, F y G.

La IEX se caracteriza por ser una técnica cromatográfica que permite concentrar la proteína de interés, ya que al eluir en un gradiente de NaCl, las proteínas con diferente carga se liberan en momentos distintos, lo que facilita la recolección de la proteína en una fracción más concentrada. Sin embargo, al considerar ambos resultados, parecerían haberse perdido parte de las proteínas presentes en la muestra. Esto podría deberse a una posible autoproteólisis de la RgpB, como resultado del cambio de amortiguador. La baja concentración de sales y la ausencia de $CaCl_2$, podrían haber desestabilizado la gingipaína en solución y provocar que esta se autodigiera. Para comprobar esta hipótesis, debería continuar estudiándose la estabilidad de la RgpB en solución, especialmente concentrada, en presencia y ausencia de calcio, y a distinta fuerza iónica.

En definitiva, se logró purificar la RgpB producida de forma recombinante en *E. coli*, con una pureza moderada. Tras evaluar cinco estrategias, se considera que la estrategia de purificación por dos IMAC, en *batch*, realizando lavados con 20 y 50 mM de imidazol fue la más efectiva. Esta permitió obtener la mayor cantidad de proteína soluble con una pureza suficiente para el estudio de su actividad enzimática.

Se realizó una purificación final siguiendo la estrategia seleccionada, para posteriormente evaluar la actividad de la RgpB (Figura 4.15).

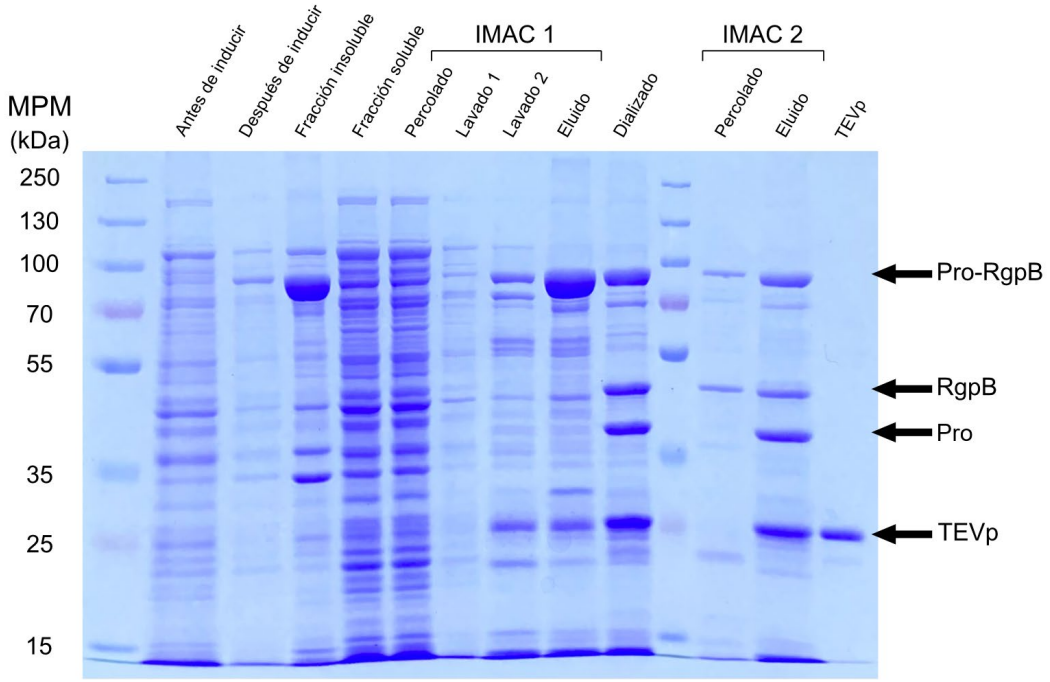

Figura 4.15. Evaluación de la purificación final de RgpB por SDS-PAGE. MPM, marcador de peso molecular.

Se podrían continuar evaluando estrategias para obtener la gingipaína pura, por ejemplo, incorporando una SEC como paso de purificación intermedio entre la primera IMAC y el corte con la TEVp, o luego de tratar con la TEVp. Esta cromatografía permite separar proteínas en base a su tamaño, por lo que sería útil para separar la Pro-RgpB de las proteínas contaminantes de tamaños inferiores y superiores que se observan en la SDS-PAGE.

Otra alternativa podría ser purificar la Pro-RgpB producida en S2. Esta proteína se expresó en el sobrenadante del cultivo, el cual se caracteriza por tener una menor cantidad de proteínas respecto al interior celular. Para esta purificación, se podría realizar un paso de captura por cromatografía de afinidad a Strep-tactin®, seguido de un corte con la proteasa TEV y finalmente un segundo paso de cromatografía de afinidad a Strep-tactin®, para retener el propéptido y la TEVp en la columna, y obtener la RgpB en el percolado.

4.3. Cuantificación de la RgpB purificada

La concentración proteica de la RgpB obtenida se estimó utilizando dos métodos diferentes. En primer lugar, se midió la absorbancia a 280 nm en un espectrofotómetro, asumiendo un

coeficiente de extinción de 1 $(mg/mL)^{-1}$ cm^{-1} para una solución al 0,1% (Abs 0,1%). De esta forma, se obtuvo una concentración de proteínas de 0,35 mg/mL. Posteriormente, se estimó la concentración mediante el método colorimétrico de Bradford realizando una curva de calibración, cuyo resultado y ecuación de la recta se presentan en el Anexo 1. Se determina una concentración de proteína de 0,15 mg/mL.

La medida de la absorbancia a 280 nm es un método directo para determinar la concentración de proteínas, basado en la absorbancia de la luz ultravioleta por los aminoácidos aromáticos triptófano y tirosina, y por la cistina, residuos de cisteína unidos por enlace disulfuro (130). Mientras que el ensayo de Bradford es un método colorimétrico permite cuantificar proteínas, utilizando la capacidad del Azul de Coomassie G-250 para unirse a ciertos residuos aminoacídicos como histidina, lisina, pero principalmente arginina (115). Por lo tanto, el contenido de los aminoácidos mencionados en las proteínas de una muestra influye en los resultados obtenidos para ambos métodos.

Las diferencias observadas con estos métodos para la RgpB podrían deberse no solo a la composición aminoacídica de las proteínas presentes, sino que también al coeficiente de extinción elegido para cuantificar por absorbancia a 280 nm. En este método, se utiliza la absorbancia medida para calcular la concentración a partir del coeficiente de extinción molar de la proteína ensayada. Para proteínas individuales, este valor puede estar reportado o puede calcularse a partir de su secuencia aminoacídica. Sin embargo, en mezclas complejas, donde se desconoce la identidad de una o más proteínas, es difícil estimar correctamente este coeficiente, y, por lo tanto, la concentración calculada puede ser muy diferente de la real (131). Por esta razón, se tomó la concentración de proteínas determinada por método de Bradford para la RgpB purificada.

Considerando la presencia de proteínas contaminantes, es necesario estimar qué porcentaje de la fracción de proteínas corresponde a la RgpB, para determinar con mayor exactitud su concentración en la muestra. Se utilizó el *software* ImageJ para establecer la intensidad de cada una de las bandas presentes en el carril de la SDS-PAGE, utilizando el protocolo de análisis de geles en una dimensión. Se realizó un densitograma del percolado de la IMAC 2 de la Figura 4.15, obteniendo que la banda correspondiente a la RgpB representa el 31% de las proteínas presentes en la muestra (Anexo 2). Por lo tanto, se estima que la concentración

de RgpB en la fracción purificada es de 46,5 µg/mL. Teniendo en cuenta que se obtienen 10 mL de la fracción, se logró obtener un rendimiento aproximado de 0,46 mg de RgpB por 500 mL de cultivo en *E. coli* (0,92 mg/L).

El rendimiento alcanzado es entre 40 y 100 veces mayor al obtenido en el reporte de expresión de la gingipaína en *S. cerevisiae*, siendo el mayor rendimiento obtenido de una producción recombinante. Además, este rendimiento resulta comparable con los que se obtienen al expresar la RgpB en *P. gingivalis*. Se alcanzó un mayor rendimiento que los 0,5 mg por litro de cultivo obtenidos de la purificación desde la cepa HG66 siguiendo el protocolo de Potempa y Nguyen (41), y menor que los 2,4 mg/L de la purificación de la RgpB fusionada a una etiqueta 6xHis por Veillard y colaboradores (94). Por lo tanto, se considera que el protocolo desarrollado en el presente trabajo es una alternativa conveniente para la obtención de la RgpB, teniendo las ventajas de la expresión en un sistema sencillo como *E. coli*. Estas incluyen un menor tiempo de expresión, de 16 h contra dos semanas en *P. gingivalis*, sin los requerimientos de sangre y anaerobiosis para el cultivo que esta presenta. Finalmente, el manejo de *P. gingivalis* en condiciones de laboratorio requiere un nivel de bioseguridad 2, haciendo que la expresión en *E. coli* sea técnicamente más sencilla y aplicable en condiciones de laboratorio típicas.

Es importante destacar que en los protocolos reportados se obtiene la RgpB con un alto grado de pureza, y si bien el agregado de los pasos de purificación propuestos podría disminuir el rendimiento obtenido en el presente trabajo, otros aspectos de la purificación podrían mejorarse para contrarrestar la pérdida de la proteína. Por ejemplo, podría mejorarse la captura de la Pro-RgpB en la IMAC 1 optimizando la cantidad de resina de afinidad utilizada, ya que en la Figura 4.15 se observa como en el percolado permanece una banda notoria de 85 kDa correspondiente a proteína que no se unió a la matriz. A su vez, destaca como la TEVp no logró cortar completamente la Pro-RgpB presente en el eluido de la primera IMAC. Para mejorar el corte de la proteasa TEV puede agregarse EDTA, ya que está reportado que este agente quelante promueve su corte proteolítico (112). Si bien el agregado de EDTA podría mejorar el corte, se ha reportado su capacidad de inhibir la RgpB por quelar los cationes calcio (132). Por lo que, podría evaluarse el agregado de EDTA en la incubación con la TEVp previa a la diálisis, para retirarlo en el siguiente paso.

Cabe mencionar que, durante la puesta a punto de la purificación, la fracción de proteínas obtenida después de inducir la expresión debía diluirse con un factor de 2,5 para sembrarla en una SDS-PAGE (Figura 4.5). En la purificación final de la Figura 4.15, se observa como esta fracción (diluida en un factor de 2,5) está considerablemente más diluida. Esto indica que la cantidad de proteínas obtenidas fue menor respecto a las producciones anteriores, realizadas en las mismas condiciones. Una posible explicación para esta disminución, es que en la última expresión se identificó una contaminación con bacteriófagos en los equipos comunes utilizados para expresar y purificar proteínas del laboratorio, lo que podría haber afectado negativamente la productividad. Los bacteriófagos se caracterizan por lisar las células presentes en el cultivo, lo que provoca una disminución de la densidad celular y como consecuencia una menor expresión de la proteína de interés (133). Por esta razón, se espera que en futuras producciones de la RgpB con el protocolo propuesto, se alcance un mayor rendimiento al obtenido en el presente trabajo.

4.4. Puesta a punto del ensayo de actividad

La RgpB nativa se caracteriza por una baja especificidad de sustrato, existiendo reportes de que su sitio activo puede acomodar varios sustratos peptídicos, teniendo solo como especificidad un residuo de arginina en la posición P1 (134, 135). Por esta razón, se ha descrito su capacidad de hidrolizar varios sustratos sintéticos con el residuo de arginina en P1. El ensayo de actividad propuesto por Potempa y Nguyen (54), se basa en la hidrólisis del sustrato cromogénico benzoil-L-arginina-p-nitroanilida (L-BAPNA), mientras que el ensayo descrito por Veillard y colaboradores (71), utiliza el sustrato fluorogénico acetil-L-arginina-7-amido-4-metilcumarina (Ac-Arg-AMC).

Los ensayos cromogénicos son útiles para medir la actividad de las gingipaínas en muestras obtenidas del cultivo de *P. gingivalis*, ya que la presencia de hemina provoca la extinción de la fluorescencia del grupo AMC, dificultando la medida de actividad con un sustrato fluorogénico. En cambio, los ensayos fluorométricos se caracterizan por ser aproximadamente 100 veces más sensibles, siendo adecuados para medir la actividad amidolítica de las gingipaínas purificadas (54). En el ensayo reportado, se utilizan concentraciones de 1 o 10 nM de RgpB para caracterizarla y evaluar inhibidores (71). Dada la mayor sensibilidad del ensayo fluorométrico, y la ausencia de hemina en la RgpB

purificada en el presente trabajo, se optó por poner a punto un ensayo de actividad usando el sustrato Z-Gly-Gly-Arg-AMC, ampliamente utilizado para evaluar la actividad de otras proteasas, como tripsina y trombina. El grupo AMC se caracteriza por la emisión de fluorescencia a 460 nm cuando se lo excita a 380 nm. En el sustrato peptídico utilizado, la fluorescencia del AMC se encuentra apagada por el enlace amida formado con el residuo de arginina. Por lo que, el AMC fluoresce cuando la RgpB escinde este grupo del resto del péptido (Figura 4.16).

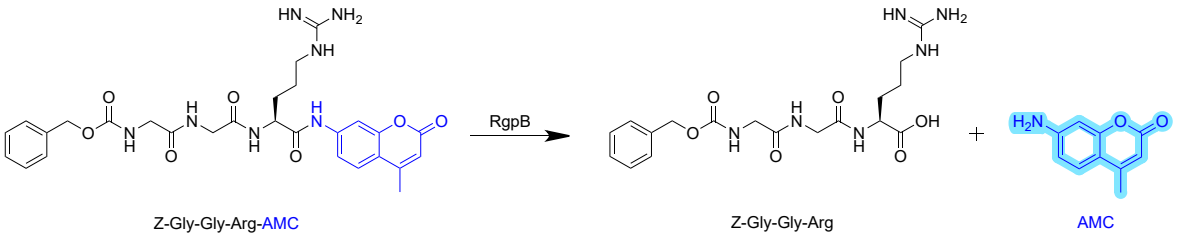

Figura 4.16. Esquema del sustrato utilizado en el ensayo de actividad de la RgpB. La proteasa reconoce el residuo de arginina del sustrato Z-Gly-Gly-Arg-AMC e hidroliza el grupo AMC, permitiendo medir su actividad enzimática por el aumento de la fluorescencia a 460 nm.

Se evaluó la actividad de cinco concentraciones diferentes de RgpB (1, 5, 10, 50 y 100 nM), utilizando tres agentes reductores diferentes (DTT, β-mercaptoetanol o L-cisteína) a concentraciones de 1 mM, y en presencia o ausencia de 2,5 mM de $CaCl_2$. Todas las condiciones se evaluaron por duplicado. Se incubó durante 10 minutos a 37°C en una placa de 96 pocillos, y se largó la reacción agregando 5 µM del sustrato. Se midieron las RFU en función del tiempo a 37°C durante 1 h. Los resultados de cada uno de estos ensayos se presentan en la Figura 4.17.

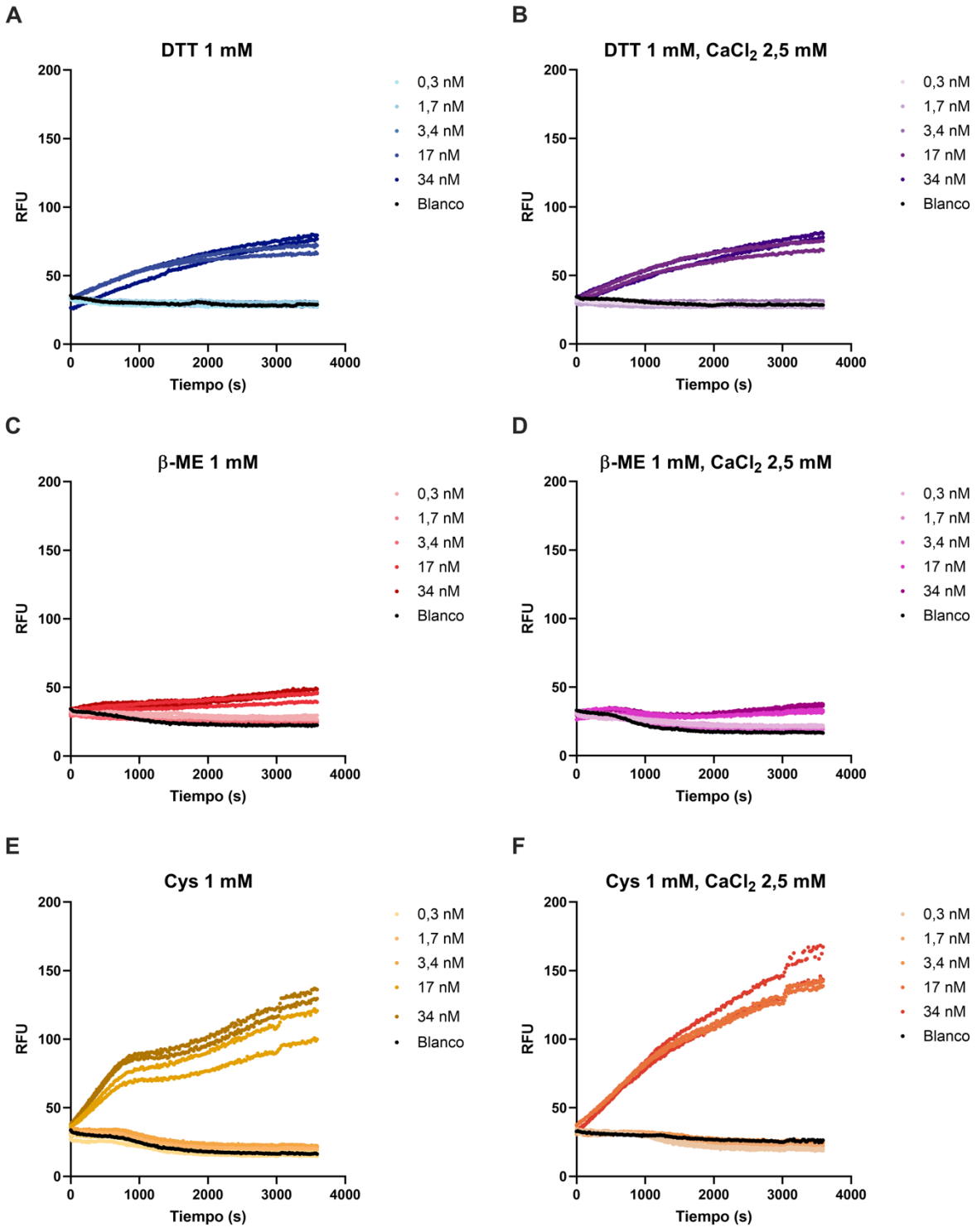

Figura 4.17. Gráficas de actividad enzimática de la RgpB, para los tres agentes reductores evaluados. A. Ensayo con 1 mM DTT. **B.** Ensayo con 1 mM DTT y 2,5 mM $CaCl_2$. **C.** Ensayo con 1 mM β-mercaptoetanol. **D.** Ensayo con 1 mM β-mercaptoetanol y 2,5 mM $CaCl_2$. **E.** Ensayo con 1 mM cisteína. **F.** Ensayo con 1 mM cisteína y 2,5 mM $CaCl_2$.

En la Figura 4.18 se observa una comparación de las pendientes iniciales obtenidas a partir de los gráficos de RFU en función del tiempo. Para esto se tomó la pendiente entre 0 y 1000 segundos, considerando esto como velocidades iniciales, ante la imposibilidad de determinar las unidades de enzima correspondientes utilizadas en el ensayo. Se normalizan los resultados con la pendiente obtenida para el blanco, y se presenta el promedio de cada pendiente, junto con su error estándar.

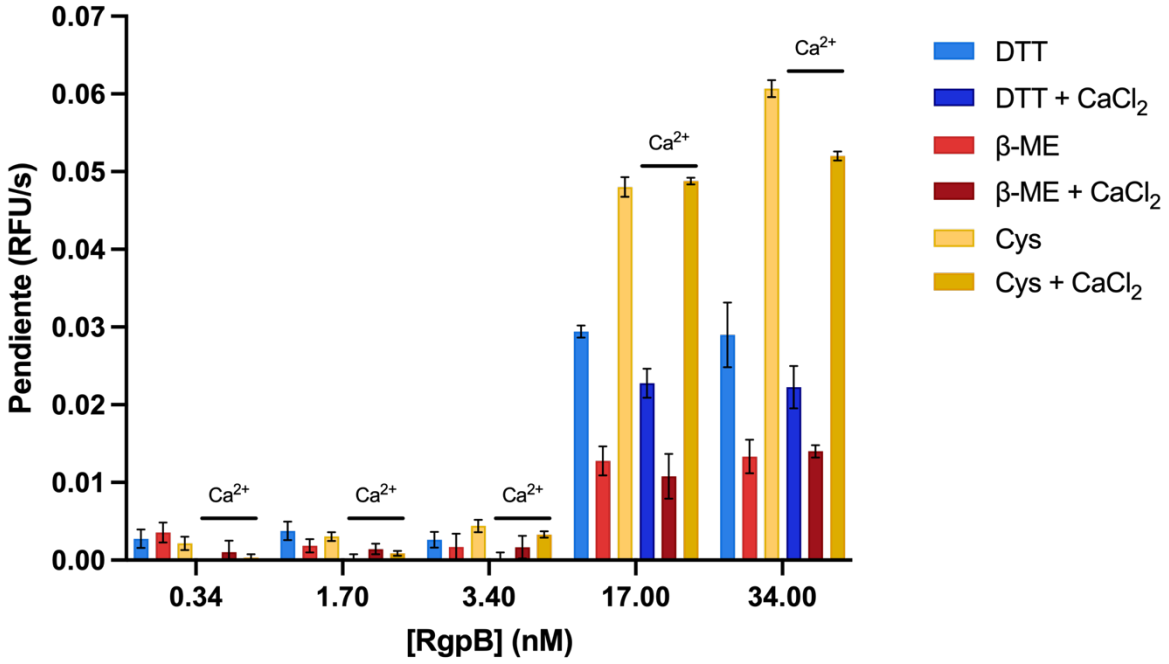

Figura 4.18. Comparación de la actividad enzimática de la RgpB, para distintos agentes reductores. Se representa la pendiente obtenida del gráfico de RFU en función del tiempo, para las cinco concentraciones evaluadas, en presencia y ausencia de calcio ($CaCl_2$ 2,5 mM).

Dado que el ensayo se realizó antes de establecer qué porcentaje de la fracción de proteínas corresponde a la RgpB con ImageJ, se sembraron concentraciones de la gingipaína menores a las calculadas inicialmente.

Se observa como para una concentración de 0,34; 1,7 y 3,4 nM de RgpB, se obtuvieron valores próximos a cero, lo que refleja una señal basal del ensayo, no obteniéndose una clara actividad enzimática (Figura 4.17). Para las concentraciones de 17 y 34 nM de RgpB, se visualizan diferencias en la pendiente obtenida para los tres agentes reductores ensayados. Se observa como al añadir cisteína, la pendiente es aproximadamente el doble que con DTT,

y casi cuatro veces más que con β-mercaptoetanol. La capacidad de la cisteína de estimular la actividad amidolítica de la RgpB ha sido ampliamente reportada, siendo el agente reductor utilizado en los ensayos de actividad descritos para esta proteasa (54, 57, 71, 132). A partir de estos resultados, se eligió la cisteína como agente reductor para el ensayo.

Al observar las pendientes obtenidas con el agregado de $CaCl_2$ para las concentraciones de 17 y 34 nM de RgpB, no se observa una clara tendencia para ninguno de los tres agentes reductores. Para los ensayos realizados con DTT parece disminuir la pendiente inicial, mientras que no parecería tener un efecto en los ensayos con β-mercaptoetanol. En cambio, para los ensayos con cisteína, se obtuvieron valores similares para una concentración de 17 nM de la gingipaína, mientras que para 34 nM se obtuvo una pendiente inicial mayor cuando no se suplementó con $CaCl_2$. Se ha descrito como el calcio es necesario para la estabilidad de las gingipaínas en solución, especialmente ensayando su actividad a 37°C (132). Destaca como el gráfico obtenido para cisteína en ausencia de calcio presenta varios puntos de inflexión no esperados, observándose una caída notoria luego de los 1000 s (Figura 4.17E). Dado que podría tratarse de un problema de la lectura del equipo, se optó por evaluar nuevamente la actividad con y sin $CaCl_2$.

Considerando que, en los ensayos de actividad reportados se utilizan concentraciones de cisteína de 10 mM, se ensayó la actividad de cinco concentraciones diferentes de RgpB (3,4; 6,8; 17; 34 y 68 nM) agregando 1 o 10 mM de cisteína, en presencia o ausencia de 2,5 mM de $CaCl_2$. En todas las condiciones, tanto la cisteína como el calcio se encuentran en exceso molar superior a las 100 veces. Todas las condiciones se evaluaron por duplicado. Los resultados de cada uno de estos ensayos se presentan en la Figura 4.19.

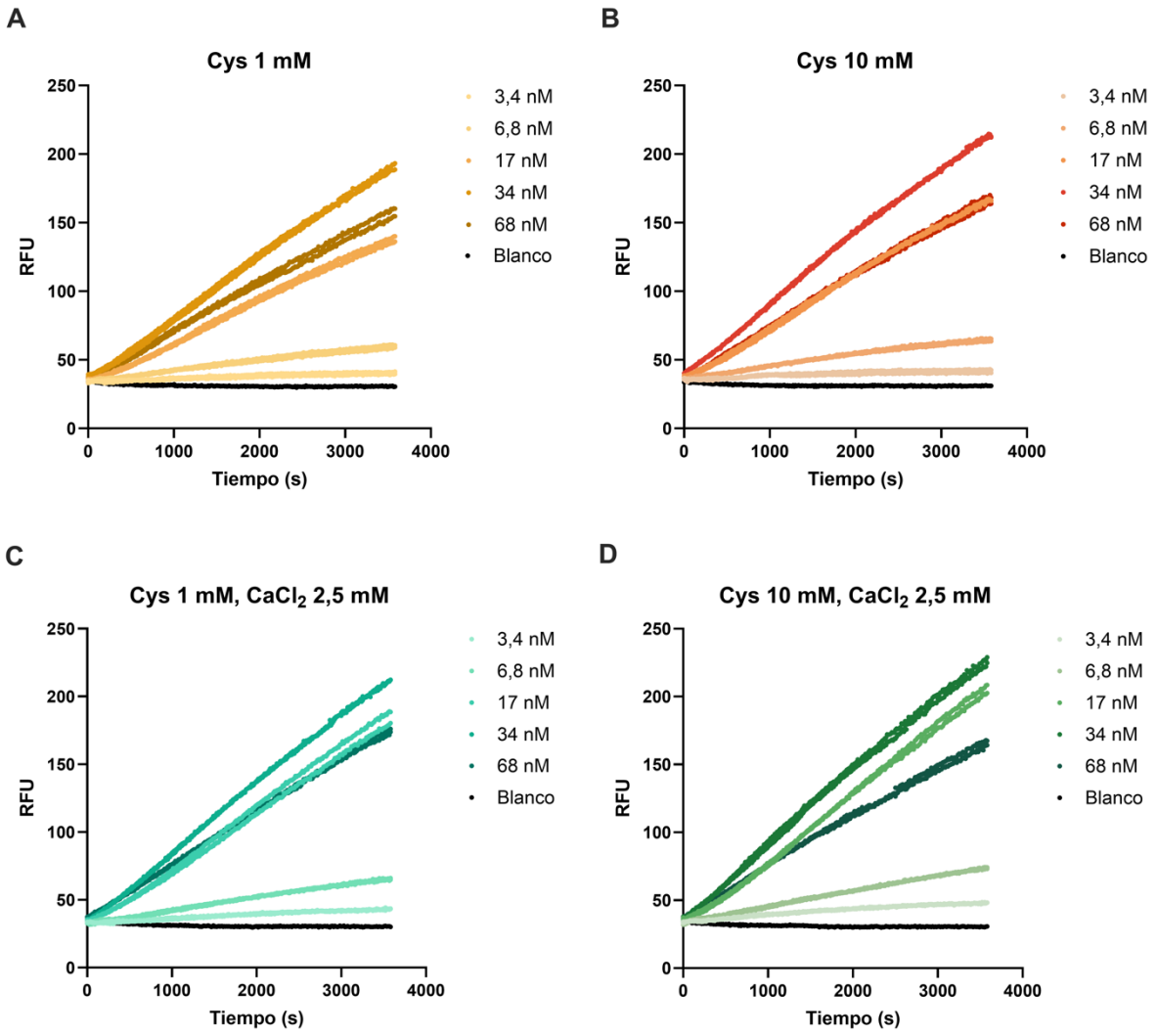

Figura 4.19. Gráficas de actividad enzimática de la RgpB, para las concentraciones de cisteína evaluadas. A. Ensayo con 1 mM cisteína. **B.** Ensayo con 1 mM cisteína y 2,5 mM $CaCl_2$. **C.** Ensayo con 10 mM cisteína. **D.** Ensayo con 10 mM cisteína y 2,5 mM $CaCl_2$.

En la Figura 4.20 se muestra una comparación de las pendientes de los gráficos de RFU en función del tiempo, para un rango de 0 a 1000 s. Se normalizan los resultados con la pendiente obtenida para el blanco, y se presenta el promedio de cada pendiente, junto con su error estándar.

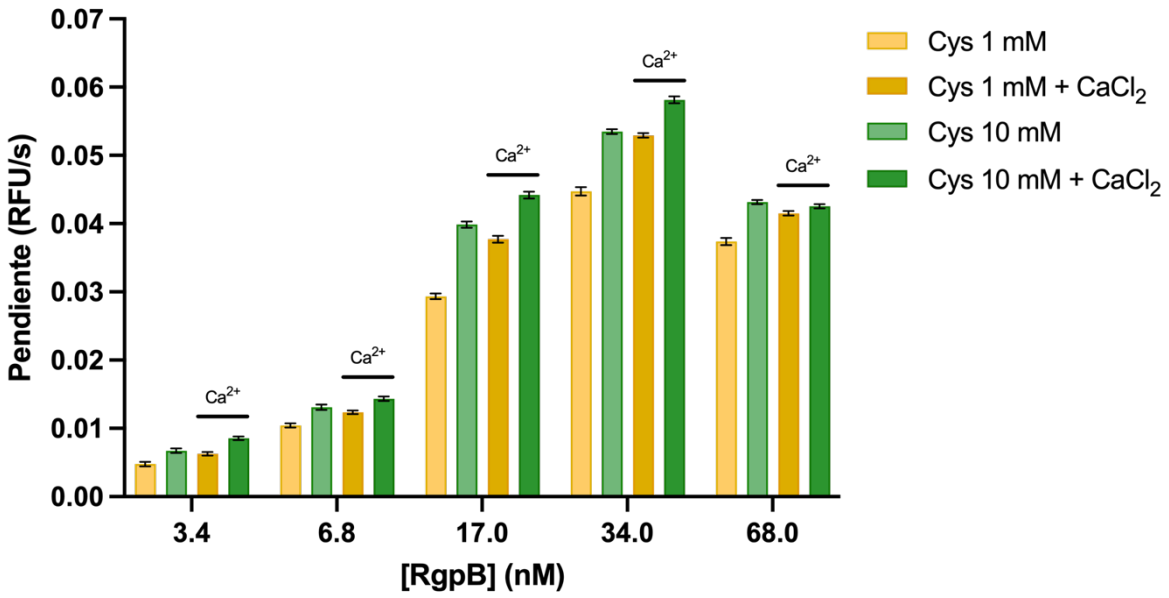

Figura 4.20. Comparación de la actividad enzimática de la RgpB, para distinta concentración de L-cisteína. Se representa la pendiente obtenida del gráfico de RFU en función del tiempo, para las cinco concentraciones evaluadas, en presencia y ausencia de calcio ($CaCl_2$ 2,5 mM).

Se obtuvo una actividad enzimática para todas las concentraciones de RgpB evaluadas, observándose como la pendiente inicial aumenta hasta 34 nM de la enzima, y decrece a una concentración de 68 nM, para todas las condiciones evaluadas. Este fenómeno podría indicar la inhibición de la gingipaína, posiblemente por alguna proteína o componente presente en la fracción obtenida al final de la purificación. Se podría estudiar la identidad de las proteínas contaminantes presentes en la fracción por espectrometría de masas, para evaluar si alguna de ellas podría tener la capacidad de inhibir la RgpB. Otra posibilidad es que, al estar más concentrada, la enzima sea más propensa a autodigerirse. Por lo que debería estudiarse su estabilidad en solución y autoproteólisis, por ejemplo, incubando la enzima por diferentes períodos de tiempo y observar si se digiere en una SDS-PAGE.

A su vez, se observa una tendencia a obtener una mayor pendiente al incrementar la concentración de cisteína. Considerando que a 1 y 10 mM la cisteína se encuentra en exceso en la solución, la mejora en la actividad no puede atribuirse a un aumento de los equivalentes de reducción, sino que se explica por la reportada actividad transpeptidasa de las gingipaínas (57). Además de actuar reduciendo la cisteína del sitio activo de la RgpB oxidada, la cisteína también podría ser un aceptor en la transpeptidación. Al incrementar su concentración, la

mayor disponibilidad de aceptores en solución provocaría un aumento la actividad de la RgpB.

Por último, se visualiza como la pendiente se mantiene o aumenta al agregar $CaCl_2$, para todas las concentraciones de RgpB evaluadas. Por esta razón, se considera que su efecto en la actividad de la gingipaína es favorable. Sin embargo, se considera importante realizar futuros estudios de estabilidad de la RgpB purificada, evaluando tanto condiciones de almacenamiento como su estabilidad al incubarla a 25, 30 y 37°C, en presencia y ausencia de calcio. Estos ensayos permitirían determinar si la enzima presenta actividad autoproteolítica, la cual es especialmente relevante al realizar ensayos de inhibición, en los que se incuban la enzima junto con un compuesto por un tiempo prolongado antes de medir la actividad enzimática (136).

A partir de los resultados obtenidos, se selecciona el ensayo con 10 mM de cisteína y 2,5 mM de $CaCl_2$ para la evaluación de la actividad enzimática de la RgpB, ya que permitió obtener la mayor actividad a lo largo de las cinco concentraciones de enzima evaluadas. El ensayo desarrollado se considera adecuado para futuros estudios cinéticos de la gingipaína, que permitan determinar K_M, k_{cat} y k_{cat}/K_M del par enzima-sustrato. Además, se considera importante realizar una curva de calibración de fluorescencia en RFU en función de la concentración de producto AMC, para poder obtener la actividad específica de la RgpB y calcular así los parámetros cinéticos.

Se considera que este ensayo puede convertirse en una herramienta útil para la evaluación de moléculas potencialmente inhibidoras de la RgpB. Al ser un ensayo en placa, sería adecuado para realizar un cribado *high-throughput*, permitiendo además la posterior caracterización bioquímica de los *hits* obtenidos en el ensayo de inhibición. Se podrían continuar evaluando otros parámetros, como el efecto de la temperatura en la actividad enzimática. Esto puede ser particularmente importante para los ensayos de testeo de inhibidores ya que los mismos suelen realizarse a temperaturas menores, de entre 25 y 30°C (136). A su vez, se podría evaluar el agregado de glicilglicina en la actividad enzimática de la RgpB producida, debido a los reportes que en presencia de este dipéptido, se duplica la actividad de las gingipaínas a concentraciones de 10 mM (57, 94).

4.5. Cribado de inhibidores

Se realizó una búsqueda *in silico* en la quimioteca de compuestos del Laboratorio de Biología Redox de Tripanosomátidos del IPMon, a partir de las estructuras químicas de los compuestos inhibidores patentados de gingipaínas. Se buscaron inhibidores utilizando un porcentaje de similitud del 90%. Este porcentaje se basa en el coeficiente de similitud de Tanimoto, el cual se obtiene al comparar el número de descriptores que dos moléculas tienen en común, con el número de descriptores que tienen en total (137). Además, se realiza una búsqueda de forma que las subestructuras ingresadas pueden superponerse como parte de estructuras más complejas, con fragmentos adicionales.

En primer lugar, se seleccionaron dos subestructuras de la patente US11059786B2 (82), que protege aminopiridinas inhibidoras de RgpA y RgpB, no encontrando compuestos que tengan presentes esas estructuras (Figura 4.21).

A **B**

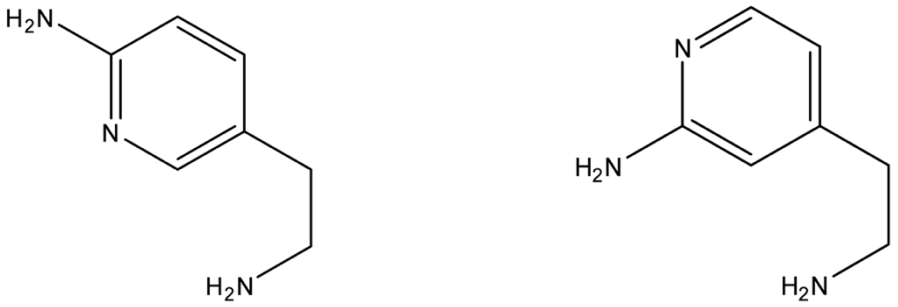

Figura 4.21. Estructura de las aminopiridinas indagadas en Chemfinder. A. Sustituyente en posición para. **B.** Sustituyente en posición meta.

Considerando que la patente US20220204457A1 (83) protege compuestos inhibidores de las Rgp derivados de arginina, se hizo una búsqueda de arginina y dos subestructuras similares, que podrían tener la capacidad de inhibir la RgpB. En la Figura 4.22 se presenta la subestructura indagada, junto con las tres moléculas obtenidas. No se encuentran compuestos para la arginina y la otra subestructura buscada (Figura 4.23).

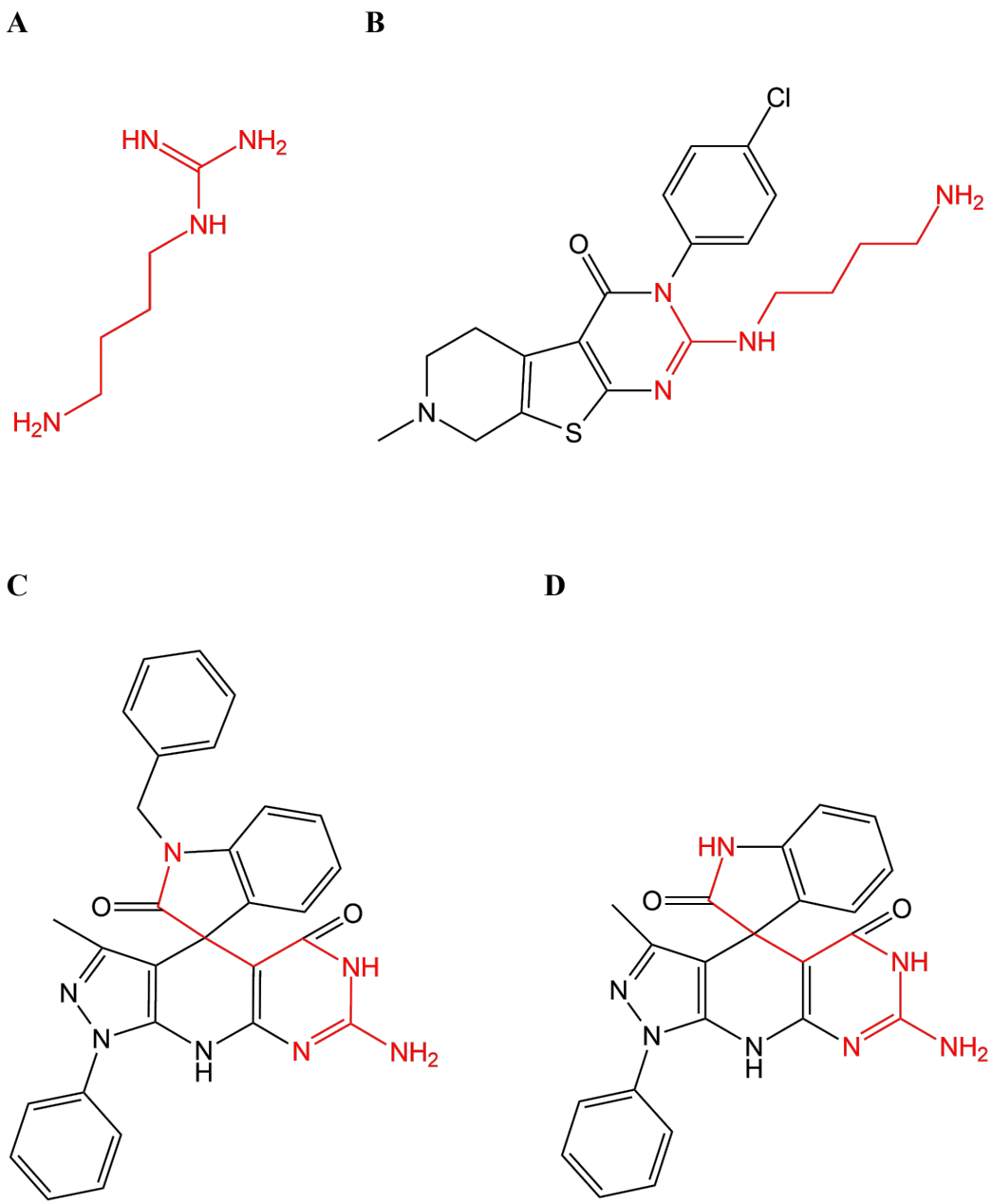

Figura 4.22. Estructuras de los resultados de la búsqueda de compuestos potencialmente inhibidores. A. Subestructura indagada, correspondiente a cadena lateral de arginina, unida a grupo amino. **B, C, D.** Compuestos identificados. Se indica en rojo la presencia de la subestructura indagada.

A **B**

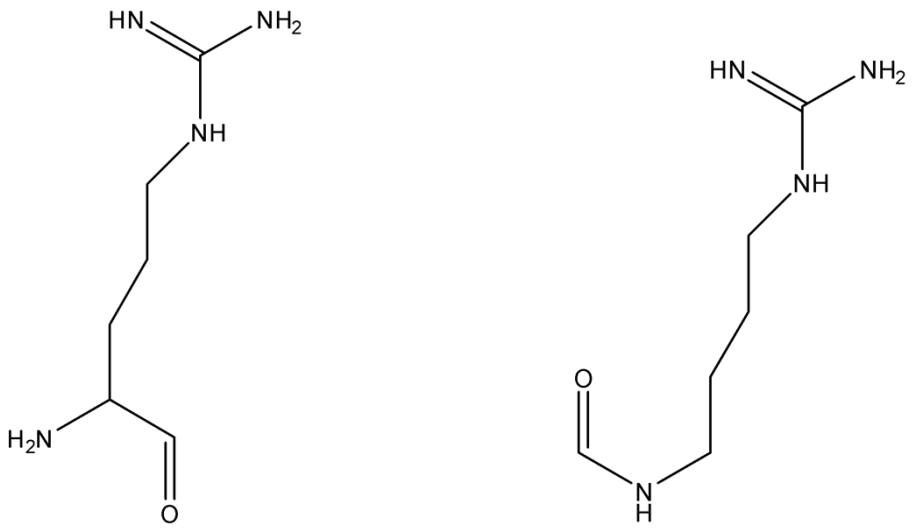

Figura 4.23. Estructura de derivados de arginina adicionales indagadas en Chemfinder. A. Arginina. **B.** Cadena lateral de arginina, formando enlace peptídico.

El compuesto de la Figura 4.22B presenta el grupo guanidilo formando parte de un heterociclo, mientras que en los compuestos observados en C y D, la subestructura completa se encuentra formando parte de dos heterociclos. Estas características resultan interesantes, ya que podrían interaccionar con el sitio activo de la RgpB de forma diferente al sustrato, provocando la inhibición de la enzima. Cabe mencionar que los compuestos identificados, no estarían protegidos por las patentes, por lo que se propone evaluar si presentan actividad inhibitoria *in vitro*.

La estrategia de búsqueda *in silico* por ligando utilizada presenta ventajas como la rapidez y bajo costo, lo que la convierte en una herramienta útil para un primer cribado de moléculas potencialmente inhibidoras. Sin embargo, presenta limitaciones importantes, ya que no permite explorar ni validar de la interacción entre el ligando y el sitio activo, ni identificar posibles sitios de unión alternativos de estas moléculas a la enzima. Como estrategia *in silico* alternativa, podría realizarse un cribado por blanco molecular, mediante estudios de *docking* y dinámica molecular, que permitan evaluar las posibles interacciones de las moléculas potencialmente inhibidoras con la RgpB.

Dado que solamente se encontraron tres moléculas candidatas, se considera importante realizar un cribado incluyendo otros inhibidores potenciales con los que se cuente información de su capacidad de inhibir otras proteasas de cisteína, como la MPro del virus SARS-CoV-2, previamente estudiada en los laboratorios de Inmunovirología y de Biología Redox de Tripanosomátidos (136). A su vez, se considera interesante la evaluación de potenciales inhibidores a partir de una quimioteca de alta diversidad química, con el fin de identificar moléculas de naturaleza química diferente a aquellas previamente identificadas como inhibidores de RgpB o proteasas de cisteína.

5. Conclusiones

En el presente trabajo se logró la expresión recombinante de la proteasa de cisteína RgpB de *P. gingivalis* en *E. coli*, siendo el primer reporte de expresión de forma soluble y activa en este sistema. Se alcanzó un rendimiento de 0,92 mg por litro de cultivo, comparable a los reportes previos de expresión en *P. gingivalis*, en un menor tiempo de cultivo, sin necesidad de sangre ni anaerobiosis estricta, con un proceso de purificación sencillo mediante dos IMAC. La pureza obtenida fue moderada, por lo que se propone continuar optimizando su proceso de purificación, agregando pasos cromatográficos adicionales o, en su defecto, modificando la construcción con otras etiquetas de afinidad.

A su vez, se alcanzó la expresión recombinante del zimógeno de la RgpB en la línea celular S2, siendo el primer reporte de expresión en células de insecto. Se plantea continuar con su purificación para determinar si es posible obtenerla de forma soluble y activa. En particular, resulta interesante evaluar si el rendimiento y la pureza que puede obtenerse con este sistema de expresión es mayor que con *E. coli*.

Se logró poner a punto un ensayo de actividad de la RgpB usando un sustrato fluorogénico, donde se optimizaron parámetros como la concentración de enzima, agente reductor, y el agregado de $CaCl_2$, para un ensayo a 37°C, pH 8, y 5 µM de concentración de sustrato. El ensayo desarrollado es adecuado para futuros estudios cinéticos que permitan determinar K_M, k_{cat} y k_{cat}/K_M del par enzima-sustrato, si bien se plantea evaluar adicionalmente el efecto de la temperatura y el agregado de glicilglicina en la actividad enzimática. Se propone continuar además con la caracterización biofísica de la RgpB producida, partiendo de los datos estructurales disponibles para predecir el espectro de dicroísmo circular, y compararlo con el obtenido experimentalmente a partir de la proteína pura.

Se realizó una primera búsqueda y selección de inhibidores candidatos para la RgpB *in silico*, por similitud a inhibidores patentados, encontrando tres compuestos candidatos pertenecientes a un espacio químico diferente a los patentados. El ensayo de actividad desarrollado puede convertirse en una herramienta útil no solamente para evaluar las moléculas seleccionadas *in vitro*, sino que también para un cribado *high-throughput*, permitiendo además la posterior caracterización bioquímica de los *hits* obtenidos.

Los resultados obtenidos en este trabajo representan un avance significativo en la expresión heteróloga de gingipaínas, siendo punto de partida para la búsqueda de compuestos antibacterianos contra estas proteasas, que logren disminuir o eliminar la patogenicidad de *P. gingivalis*. La obtención de moléculas que inhiban eficazmente la RgpB podría iniciar el desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas dirigidas al control de la periodontitis y las enfermedades asociadas.

6. Referencias bibliográficas

1. Hajishengallis G. Periodontitis: from microbial immune subversion to systemic inflammation. Nature Reviews Immunology. 2015;15(1):30–44.

2. Morales-Olavarría M, Nuñez-Belmar J, González D, Vicencio E, Rivas-Pardo JA, Cortez C, Cárdenas JP. Phylogenomic analysis of the *Porphyromonas gingivalis* - *Porphyromonas gulae* duo: approaches to the origin of periodontitis. Frontiers in Microbiology. 2023;14.

3. Van Dyke TE, Sima C. Understanding resolution of inflammation in periodontal diseases: Is chronic inflammatory periodontitis a failure to resolve? Periodontology 2000. 2020;82(1):205–213.

4. Hajishengallis G, Lamont RJ. Polymicrobial communities in periodontal disease: Their quasi-organismal nature and dialogue with the host. Periodontology 2000. 2021;86(1):210–230.

5. Loos BG, Van Dyke TE. The role of inflammation and genetics in periodontal disease. Periodontology 2000. 2020;83(1):26–39.

6. Gómez LA, De Avila J, Castillo DM, Montenegro DA, Trujillo TG, Suárez LJ, Lafaurie GI. *Porphyromonas gingivalis* Placental Atopobiosis and Inflammatory Responses in Women With Adverse Pregnancy Outcomes. Frontiers in microbiology. 2020;11.

7. Endo A, Watanabe T, Ogata N, Nozawa T, Aikawa C, Arakawa S, Maruyama F, Izumi Y, Nakagawa I. Comparative genome analysis and identification of competitive and cooperative interactions in a polymicrobial disease. The ISME Journal. 2015;9(3):629–642.

8. Martínez-García M, Hernández-Lemus E. Periodontal Inflammation and Systemic Diseases: An Overview. Frontiers in Physiology. 2021;12.

9. Socransky SS, Haffajee AD, Cugini MA, Smith C, Kent RL. Microbial complexes in subgingival plaque. Journal of Clinical Periodontology. 1998;25(2):134–144.

10. Lamont RJ, Hajishengallis G, Koo H. Social networking at the microbiome-host interface. Infection and Immunity. 2023;91(9).

11. Hajishengallis G, Lamont RJ, Koo H. Oral polymicrobial communities: Assembly, function, and impact on diseases. Cell Host & Microbe. 2023;31(4):528–538.

12. Hajishengallis G, Lamont RJ. Dancing with the Stars: How Choreographed Bacterial Interactions Dictate Nososymbiocity and Give Rise to Keystone Pathogens, Accessory Pathogens, and Pathobionts. Trends in Microbiology. 2016;24(6):477–489.

13. World Health Organization. Global oral health status report: towards universal health coverage for oral health by 2030. Geneva; 2022. Disponible desde: https://iris.who.int/bitstream/handle/10665/364538/9789240061484-eng.pdf?sequence=1

14. Radu C-M, Radu C, Arbănaşi E-M, Hogea T, Murvai V, Chiș I-A, Zaha D. Exploring the Efficacy of Novel Therapeutic Strategies for Periodontitis: A Literature Review. Life. 2024;14(4):468.

15. Elashiry M, Morandini AC, Cornelius Timothius CJ, Ghaly M, Cutler CW. Selective Antimicrobial Therapies for Periodontitis: Win the "Battle and the War." International Journal of Molecular Sciences. 2021;22(12):6459.

16. Shaddox LM, Walker CB. Treating chronic periodontitis: current status, challenges, and future directions. Clinical, cosmetic and investigational dentistry. 2010;2:79–91.

17. Ardila CM, Lopez MA, Guzman IC. High resistance against clindamycin, metronidazole and amoxicillin in *Porphyromonas gingivalis* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* isolates of periodontal disease. Medicina Oral Patología Oral y Cirugia Bucal. 2010:e947–e951.

18. Colombo APV, do Souto RM, Araújo LL, Espíndola LCP, Hartenbach FARR, Magalhães CB, da Silva Oliveira Alves G, Lourenço TGB, da Silva-Boghossian CM. Antimicrobial resistance and virulence of subgingival staphylococci isolated from periodontal health and diseases. Scientific Reports. 2023;13(1):11613.

19. Walker CB. The acquisition of antibiotic resistance in the periodontal microflora. Periodontology 2000. 1996;10(1):79–88.

20. Sanz M, Herrera D, Kebschull M, Chapple I, Jepsen S, Berglundh T, Sculean A, Tonetti MS. Treatment of stage I–III periodontitis—The EFP S3 level clinical practice guideline. Journal of Clinical Periodontology. 2020;47(S22):4–60.

21. Suvan J, Leira Y, Moreno Sancho FM, Graziani F, Derks J, Tomasi C. Subgingival instrumentation for treatment of periodontitis. A systematic review. Journal of Clinical Periodontology. 2020;47(S22):155–175.

22. Roky M, Tan J, Sztukowska MN, Trent JO, Demuth DR. Identification of Small-Molecule Inhibitors Targeting *Porphyromonas gingivalis* Interspecies Adherence and Determination of Their In Vitro and In Vivo Efficacies. Antimicrobial agents and chemotherapy. 2020;64(11).

23. Griffen AL, Becker MR, Lyons SR, Moeschberger ML, Leys EJ. Prevalence of *Porphyromonas gingivalis* and Periodontal Health Status. Journal of Clinical Microbiology. 1998;36(11):3239–3242.

24. How KY, Song KP, Chan KG. *Porphyromonas gingivalis*: An Overview of Periodontopathic Pathogen below the Gum Line. Frontiers in Microbiology. 2016;7.

25. Roper JM, Raux E, Brindley AA, Schubert HL, Gharbia SE, Shah HN, Warren MJ. The Enigma of Cobalamin (Vitamin B12) Biosynthesis in *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Biological Chemistry. 2000;275(51):40316–40323.

26. Lamont RJ, Jenkinson HF. Life Below the Gum Line: Pathogenic Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis*. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 1998;62(4):1244–1263.

27. Hajishengallis G, Liang S, Payne MA, Hashim A, Jotwani R, Eskan MA, McIntosh ML, Alsam A, Kirkwood KL, Lambris JD, et al. Low-Abundance Biofilm Species Orchestrates Inflammatory Periodontal Disease through the Commensal Microbiota and Complement. Cell Host & Microbe. 2011;10(5):497–506.

28. Cugini C, Klepac-Ceraj V, Rackaityte E, Riggs JE, Davey ME. *Porphyromonas gingivalis*: keeping the pathos out of the biont. Journal of Oral Microbiology. 2013;5(1):19804.

29. Kuboniwa M, Lamont RJ. Subgingival biofilm formation. Periodontology 2000. 2010;52(1):38–52.

30. Mydel P, Takahashi Y, Yumoto H, Sztukowska M, Kubica M, Gibson FC, Kurtz DM, Travis J, Collins LV, Nguyen K-A, et al. Roles of the Host Oxidative Immune Response and Bacterial Antioxidant Rubrerythrin during *Porphyromonas gingivalis* Infection. PLoS Pathogens. 2006;2(7):e76.

31. Uriarte SM, Edmisson JS, Jimenez-Flores E. Human neutrophils and oral microbiota: a constant tug-of-war between a harmonious and a discordant coexistence. Immunological Reviews. 2016;273(1):282–298.

32. Yilmaz Ö. The chronicles of *Porphyromonas gingivalis*: the microbium, the human oral epithelium and their interplay. Microbiology. 2008;154(10):2897–2903.

33. Wang M, Shakhatreh M-AK, James D, Liang S, Nishiyama S, Yoshimura F, Demuth DR, Hajishengallis G. Fimbrial Proteins of *Porphyromonas gingivalis* Mediate In Vivo Virulence and Exploit TLR2 and Complement Receptor 3 to Persist in Macrophages. The Journal of Immunology. 2007;179(4):2349–2358.

34. Zheng S, Yu S, Fan X, Zhang Y, Sun Y, Lin L, Wang H, Pan Y, Li C. *Porphyromonas gingivalis* survival skills: Immune evasion. Journal of Periodontal Research. 2021;56(6):1007–1018.

35. Bostanci N, Belibasakis GN. *Porphyromonas gingivalis*: an invasive and evasive opportunistic oral pathogen. FEMS Microbiology Letters. 2012;333(1):1–9.

36. Hajishengallis G, Shakhatreh M-AK, Wang M, Liang S. Complement Receptor 3 Blockade Promotes IL-12-Mediated Clearance of *Porphyromonas gingivalis* and Negates Its Virulence In Vivo. The Journal of Immunology. 2007;179(4):2359–2367.

37. de Jongh CA, de Vries TJ, Bikker FJ, Gibbs S, Krom BP. Mechanisms of *Porphyromonas gingivalis* to translocate over the oral mucosa and other tissue barriers. Journal of Oral Microbiology. 2023;15(1).

38. Bregaint S, Boyer E, Fong SB, Meuric V, Bonnaure-Mallet M, Jolivet-Gougeon A. *Porphyromonas gingivalis* outside the oral cavity. Odontology. 2022;110(1):1–19.

39. Viafara-García SM, Morantes SJ, Chacon-Quintero Y, Castillo DM, Lafaurie GI, Buitrago DM. Repeated *Porphyromonas gingivalis* W83 exposure leads to release pro-inflammatory cytokynes and angiotensin II in coronary artery endothelial cells. Scientific Reports. 2019;9(1):19379.

40. Zhang J, Xie M, Huang X, Chen G, Yin Y, Lu X, Feng G, Yu R, Chen L. The Effects of Porphyromonas gingivalis on Atherosclerosis-Related Cells. Frontiers in Immunology. 2021;12.

41. Stobernack T, Glasner C, Junker S, Gabarrini G, de Smit M, de Jong A, Otto A, Becher D, van Winkelhoff AJ, van Dijl JM. Extracellular Proteome and Citrullinome of the Oral Pathogen *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Proteome Research. 2016;15(12):4532–4543.

42. Chow YC, Yam HC, Gunasekaran B, Lai WY, Wo WY, Agarwal T, Ong YY, Cheong SL, Tan S-A. Implications of *Porphyromonas gingivalis* peptidyl arginine deiminase and gingipain R in human health and diseases. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2022;12.

43. Du Teil Espina M, Gabarrini G, Harmsen HJM, Westra J, van Winkelhoff AJ, van Dijl JM. Talk to your gut: the oral-gut microbiome axis and its immunomodulatory role in the etiology of rheumatoid arthritis. FEMS Microbiology Reviews. 2019;43(1):1–18.

44. Dominy SS, Lynch C, Ermini F, Benedyk M, Marczyk A, Konradi A, Nguyen M, Haditsch U, Raha D, Griffin C, et al. *Porphyromonas gingivalis* in Alzheimer's disease brains: Evidence for disease causation and treatment with small-molecule inhibitors. Science Advances. 2019;5(1).

45. Vanterpool SF, Been J V., Houben ML, Nikkels PGJ, De Krijger RR, Zimmermann LJI, Kramer BW, Progulske-Fox A, Reyes L. *Porphyromonas gingivalis* within Placental Villous Mesenchyme and Umbilical Cord Stroma Is Associated with Adverse Pregnancy Outcome. PLOS ONE. 2016;11(1):e0146157.

46. León R, Silva N, Ovalle A, Chaparro A, Ahumada A, Gajardo M, Martinez M, Gamonal J. Detection of *Porphyromonas gingivalis* in the Amniotic Fluid in Pregnant Women With a Diagnosis of Threatened Premature Labor. Journal of Periodontology. 2007;78(7):1249–1255.

47. Chaparro A, Blanlot C, Ramírez V, Sanz A, Quintero A, Inostroza C, Bittner M, Navarro M, Illanes SE. *Porphyromonas gingivalis*, treponema denticola and toll-like receptor 2 are associated with hypertensive disorders in placental tissue: a case-control study. Journal of Periodontal Research. 2013;48(6):802–809.

48. Potempa J, Pike R, Travis J. Titration and Mapping of the Active Site of Cysteine Proteinases from *Porphyromonas gingivalis* (Gingipains) Using Peptidyl Chloromethanes. Biological Chemistry. 1997;378(3–4).

49. Chen J-M, Rawlings ND, Stevens RAE, Barrett AJ. Identification of the active site of legumain links it to caspases, clostripain and gingipains in a new clan of cysteine endopeptidases. FEBS Letters. 1998;441(3):361–365.

50. Guo Y, Nguyen K-A, Potempa J. Dichotomy of gingipains action as virulence factors: from cleaving substrates with the precision of a surgeon's knife to a meat chopper-like brutal degradation of proteins. Periodontology 2000. 2010;54(1):15–44.

51. Veillard F, Sztukowska M, Nowakowska Z, Mizgalska D, Thøgersen IB, Enghild JJ, Bogyo M, Potempa B, Nguyen K-A, Potempa J. Proteolytic processing and activation of gingipain zymogens secreted by T9SS of *Porphyromonas gingivalis*. Biochimie. 2019;166:161–172.

52. Li N, Collyer CA. Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* — complex domain structures confer diverse functions. European Journal of Microbiology and Immunology. 2011;1(1):41–58.

53. Goel A. Modification of T9SS cargo proteins of *Porphyromonas gingivalis* for their secretion in soluble form and purification by affinity chromatography [Tesis de maestría]. University of Louisville; 2016. Disponible desde: https://ir.library.louisville.edu/etd/2415/

54. Potempa J, Nguyen K. Purification and Characterization of Gingipains. Current Protocols in Protein Science. 2007;49(1).

55. Du Teil Espina M. Tricking the gatekeepers: subversion of host immune responses by *Porphyromonas gingivalis* [Tesis de doctorado]. University of Groningen; 2022. Disponible desde: https://research.rug.nl/en/publications/f89ed983-9bf0-409d-8299-42252e82bdae

56. Potempa J, Banbula A, Travis J. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. Periodontology 2000. 2000;24(1):153–192.

57. Zhang L, Veith PD, Huq NL, Chen Y-Y, Seers CA, Cross KJ, Gorasia DG, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* Gingipains Display Transpeptidation Activity. Journal of Proteome Research. 2018;17(8):2803–2818.

58. Seers CA, Mahmud ASM, Huq NL, Cross KJ, Reynolds EC. *Porphyromonas gingivalis* laboratory strains and clinical isolates exhibit different distribution of cell surface and secreted gingipains. Journal of Oral Microbiology. 2021;13(1).

59. Kamaguchi A, Ohyama T, Sakai E, Nakamura R, Watanabe T, Baba H, Nakayama K. Adhesins encoded by the gingipain genes of *Porphyromonas gingivalis* are responsible for co-aggregation with *Prevotella intermedia*. Microbiology. 2003;149(5):1257–1264.

60. Pike R, McGraw W, Potempa J, Travis J. Lysine- and arginine-specific proteinases from *Porphyromonas gingivalis*. Isolation, characterization, and evidence for the existence of complexes with hemagglutinins. The Journal of biological chemistry. 1994;269(1):406–11.

61. Schifferle RE, Shostad SA, Bayers-Thering MT, Dyer DW, Neiders ME. Effect of protoporphyrin IX limitation on Porphyromonas gingivalis. Journal of Endodontics. 1996;22(7):352–355.

62. Carlisle MD, Srikantha RN, Brogden KA. Degradation of Human α- and β-Defensins by Culture Supernatants of *Porphyromonas gingivalis* Strain 381. Journal of Innate Immunity. 2009;1(2):118–122.

63. Popadiak K, Potempa J, Riesbeck K, Blom AM. Biphasic Effect of Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* on the Human Complement System. The Journal of Immunology. 2007;178(11):7242–7250.

64. de Diego I, Veillard FT, Guevara T, Potempa B, Sztukowska M, Potempa J, Gomis-Rüth FX. *Porphyromonas gingivalis* Virulence Factor Gingipain RgpB Shows a Unique Zymogenic Mechanism for Cysteine Peptidases. Journal of Biological Chemistry. 2013;288(20):14287–14296.

65. Eichinger A, Beisel HG, Jacob U, Huber R, Medrano FJ, Banbula A, Potempa J, Travis J, Bode W. Crystal structure of gingipain R: an Arg-specific bacterial cysteine proteinase with a caspase-like fold. The EMBO Journal. 1999;18(20):5453–5462.

66. Manta B, Lundstedt E, Garcia A, Eaglesham JB, Berkmen M. Disulfide bond formation in *Escherichia coli*. En: Redox Chemistry and Biology of Thiols. Elsevier; 2022. p. 341–371.

67. Bouwman CW, Kohli M, Killoran A, Touchie GA, Kadner RJ, Martin NL. Characterization of SrgA, a *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Virulence Plasmid-Encoded Paralogue of the Disulfide Oxidoreductase DsbA, Essential for Biogenesis of Plasmid-Encoded Fimbriae. Journal of Bacteriology. 2003;185(3):991–1000.

68. Stenson TH, Weiss AA. DsbA and DsbC Are Required for Secretion of Pertussis Toxin by *Bordetella pertussis*. Infection and Immunity. 2002;70(5):2297–2303.

69. Shibata S, Shoji M, Okada K, Matsunami H, Matthews MM, Imada K, Nakayama K, Wolf M. Structure of polymerized type V pilin reveals assembly mechanism involving protease-mediated strand exchange. Nature Microbiology. 2020;5(6):830–837.

70. Laugisch O, Wong A, Sroka A, Kantyka T, Koziel J, Neuhaus K, Sculean A, Venables PJ, Potempa J, Möller B, et al. Citrullination in the periodontium—a possible link between periodontitis and rheumatoid arthritis. Clinical Oral Investigations. 2016;20(4):675–683.

71. Veillard F, Sztukowska M, Mizgalska D, Ksiazek M, Houston J, Potempa B, Enghild JJ, Thogersen IB, Gomis-Rüth FX, Nguyen K-A, et al. Inhibition of gingipains by their profragments as the mechanism protecting *Porphyromonas gingivalis* against premature

activation of secreted proteases. Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects. 2013;1830(8):4218–4228.

72. Kadowaki T, Baba A, Abe N, Takii R, Hashimoto M, Tsukuba T, Okazaki S, Suda Y, Asao T, Yamamoto K. Suppression of Pathogenicity of *Porphyromonas gingivalis* by Newly Developed Gingipain Inhibitors. Molecular Pharmacology. 2004;66(6):1599–1606.

73. Kataoka S, Baba A, Suda Y, Takii R, Hashimoto M, Kawakubo T, Asao T, Kadowaki T, Yamamoto K. A novel, potent dual inhibitor of Arg-gingipains and Lys-gingipain as a promising agent for periodontal disease therapy. The FASEB Journal. 2014;28(8):3564–3578.

74. Okamoto M, Sugimoto A, Leung K -P., Nakayama K, Kamaguchi A, Maeda N. Inhibitory effect of green tea catechins on cysteine proteinases in *Porphyromonas gingivalis*. Oral Microbiology and Immunology. 2004;19(2):118–120.

75. Yamanaka A, Kouchi T, Kasai K, Kato T, Ishihara K, Okuda K. Inhibitory effect of cranberry polyphenol on biofilm formation and cysteine proteases of *Porphyromonas gingivalis*. Journal of Periodontal Research. 2007;42(6):589–592.

76. Wu D, Liu X, Li X, Hao L, Zhao G. Discovery of specific inhibitors of *Porphyromonas gingivalis* gingipains from food-derived flavonoids by high-throughput virtual screening and molecular simulations. Food Bioscience. 2024;61:104596.

77. Imamura T, Matsushita K, Travis J, Potempa J. Inhibition of Trypsin-Like Cysteine Proteinases (Gingipains) from *Porphyromonas gingivalis* by Tetracycline and Its Analogues. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 2001;45(10):2871–2876.

78. Grenier D, Plamondon P, Sorsa T, Lee H, McNamara T, Ramamurthy NS, Golub LM, Teronen O, Mayrand D. Inhibition of Proteolytic, Serpinolytic, and Progelatinase-B Activation Activities of Periodontopathogens by Doxycycline and the Non-Antimicrobial Chemically Modified Tetracycline Derivatives. Journal of Periodontology. 2002;73(1):79–85.

79. Fröhlich E, Kantyka T, Plaza K, Schmidt K -H., Pfister W, Potempa J, Eick S. Benzamidine derivatives inhibit the virulence of *Porphyromonas gingivalis*. Molecular Oral Microbiology. 2013;28(3):192–203.

80. Yokoyama K, Sugano N, Shimada T, Shofiqur RAKM, Ibrahim E-SM, Isoda R, Umeda K, Sa N Van, Kodama Y, Ito K. Effects of egg yolk antibody against *Porphyromonas gingivalis* gingipains in periodontitis patients. Journal of Oral Science. 2007;49(3):201–206.

81. Skottrup PD, Leonard P, Kaczmarek JZ, Veillard F, Enghild JJ, O'Kennedy R, Sroka A, Clausen RP, Potempa J, Riise E. Diagnostic evaluation of a nanobody with picomolar affinity toward the protease RgpB from *Porphyromonas gingivalis*. Analytical Biochemistry. 2011;415(2):158–167.

82. Lynch CC, Konradi AW, Galemmo RA. Aminopyridine compounds and methods for the preparation and use thereof. United States patent US11059786B22021. 2021 Jul 13.

83. Galemmo RA, Konradi AW, Lynch CC, Dominy SS. Arginine gingipain inhibitors. United States patent US20220204457A1. 2022 Jun 30.

84. Konradi AW, Dominy SS, Lynch CC, Vacca J, Coburn C. Inhibitors of lysine gingipain. United States patent US20210017167A1. 2021 Jan 21.

85. Konradi AW, Galemmo RJr, Dominy SS, Lynch CC, Holsinger LJ. Ketone inhibitors of lysine gingipain. United States patent US10730826B2. 2020 Aug 4.

86. Smith K. GAIN Trial: Phase 2/3 Study of COR388 in Subjects With Alzheimer's Disease. 2022. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03823404

87. Roughan S. Cortexyme Announces Clinical Hold on Atuzaginstat's Investigational New Drug Application. Business Wire. 2022 Jan 26 [citado 16 Apr 2024]. Disponible desde: https://www.businesswire.com/news/home/20220126005419/en/

88. Cortexyme. A Single and Multiple Ascending Dose Study of COR588. 2022. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT03823404

89. Alzheimer's Drug Discovery Foundation. Gingipain Inhibitors. 2023. Disponible desde: https://www.alzdiscovery.org/uploads/cognitive_vitality_media/Gingipain_Inhibitors.pdf

90. Bejerot S. Periodontitis and Periodontal Bacteria in Dementia. 2024. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05557617

91. Centre Hospitalier Universitaire de Nice. Oral Bacterial and Viral Mapping by Dental Plaque in Elderly Patients With and Without Alzheimer's Disease (ORal MICrobiology in Alzheimer's Patients) (ORAMICAL). 2021. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT04869904

92. Borsa L. Analysis of the Periodontal Microbiota in Elderly Subjects with and Without Alzheimer's Disease: a Case Control Study (ORAMICAL). 2025. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05077618

93. Rocha Rodrigues V. Periodonitis and Alzheimer's Disease. 2022. Disponible desde: https://clinicaltrials.gov/study/NCT05189132

94. Veillard F, Potempa B, Guo Y, Ksiazek M, Sztukowska MN, Houston JA, Koneru L, Nguyen K-A, Potempa J. Purification and characterisation of recombinant His-tagged RgpB gingipain from *Porphymonas gingivalis*. Biological Chemistry. 2015;396(4):377–384.

95. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. Frontiers in Microbiology. 2014;5.

96. Ortega C, Prieto D, Abreu C, Oppezzo P, Correa A. Multi-Compartment and Multi-Host Vector Suite for Recombinant Protein Expression and Purification. Frontiers in Microbiology. 2018;9.

97. Correa A, Oppezzo P. Overcoming the Solubility Problem in *E. coli*: Available Approaches for Recombinant Protein Production. En: García-Fruitós E, editor. Insoluble Proteins: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2015. p. 27–44. Disponible desde: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2205-5_2

98. Fuchs A. Genetically engineering Gingipains for high yield large scale purification [Tesis de maestría]. University of Louisville; 2023. Disponible desde: https://ir.library.louisville.edu/cgi/viewcontent.cgi?article=5509&context=etd

99. Margetts MB, Barr IG, Webb EA. Overexpression, Purification, and Refolding of a *Porphyromonas gingivalis* Cysteine Protease from *Escherichia coli*. Protein Expression and Purification. 2000;18(3):262–268.

100. Zak KM, Bostock MJ, Waligorska I, Thøgersen IB, Enghild JJ, Popowicz GM, Grudnik P, Potempa J, Ksiazek M. Latency, thermal stability, and identification of an inhibitory compound of mirolysin, a secretory protease of the human periodontopathogen *Tannerella forsythia*. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry. 2021;36(1):1267–1281.

101. Ciaston I, Budziaszek J, Satala D, Potempa B, Fuchs A, Rapala-Kozik M, Mizgalska D, Dobosz E, Lamont RJ, Potempa J, et al. Proteolytic Activity-Independent Activation of the Immune Response by Gingipains from *Porphyromonas gingivalis*. mBio. 2022;13(3).

102. Moelants EA V., Loozen G, Mortier A, Martens E, Opdenakker G, Mizgalska D, Szmigielski B, Potempa J, Van Damme J, Teughels W, et al. Citrullination and Proteolytic Processing of Chemokines by *Porphyromonas gingivalis*. Infection and Immunity. 2014;82(6):2511–2519.

103. Mikolajczyk J, Boatright KM, Stennicke HR, Nazif T, Potempa J, Bogyo M, Salvesen GS. Sequential Autolytic Processing Activates the Zymogen of Arg-gingipain. Journal of Biological Chemistry. 2003;278(12):10458–10464.

104. Walsh G. Post-translational modifications of protein biopharmaceuticals. Drug Discovery Today. 2010;15(17–18):773–780.

105. Schneider I. Cell lines derived from late embryonic stages of *Drosophila melanogaster*. Journal of embryology and experimental morphology. 1972;27(2):353–65.

106. Olivero-Deibe N. Producción y caracterización de inmunógenos contra el virus de la leucemia bovina [Tesis de doctorado]. Montevideo: Universidad de la República (Uruguay); 2021. Disponible desde: https://hdl.handle.net/20.500.12008/43423

107. Carrión F. Desarrollo de herramientas para el estudio de la respuesta humoral y su actividad neutralizante frente a variantes de SARS-CoV-2 [Tesis de doctorado]. Montevideo: Universidad de la República (Uruguay); 2024. Disponible desde: https://hdl.handle.net/20.500.12008/44819

108. Olivero-Deibe N, Tomé-Poderti L, Carrión F, Bianchi S, Fló M, Prieto D, Rammauro F, Addiego A, Ibañez N, Portela M, et al. Expression, Purification, and Characterization of Bovine Leukemia Virus-Like Particles Produced in *Drosophila* S2 Cells. Frontiers in Virology. 2021;1.

109. Carrión F, Rammauro F, Olivero-Deibe N, Fló M, Portela MM, Lima A, Durán R, Pritsch O, Bianchi S. Soluble SARS-CoV-2 RBD and human ACE2 peptidase domain produced in *Drosophila* S2 cells show functions evoking virus–cell interface. Protein Science. 2023;32(8).

110. Tomé-Poderti L, Olivero-Deibe N, Carrión F, Portela MM, Obal G, Cabrera G, Bianchi S, Lima A, Addiego A, Durán R, et al. Characterization and application of recombinant Bovine Leukemia Virus Env protein. Scientific Reports. 2024;14(1):12190.

111. Kwon K, Hasseman J, Latham S, Grose C, Do Y, Fleischmann RD, Pieper R, Peterson SN. Recombinant expression and functional analysis of proteases from *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus anthracis*, and *Yersinia pestis*. BMC Biochemistry. 2011;12(1):17.

112. Dalla Rizza J, Ortega C, Carrión F, Fló M, Correa A. Production, purification and characterization of a double-tagged TEV protease. Protein Expression and Purification. 2022;191:106021.

113. Correa A, Ortega C, Obal G, Alzari P, Vincentelli R, Oppezzo P. Generation of a vector suite for protein solubility screening. Frontiers in Microbiology. 2014;5.

114. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. Protein Expression and Purification. 2005;41(1):207–234.

115. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical Biochemistry. 1976;72(1–2):248–254.

116. Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, Appel RD, Bairoch A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. En: Walker JM, editor. The Proteomics Protocols Handbook. 1st ed. Totowa, NJ: Humana Press; 2005.

117. Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. Nature Methods. 2012;9(7):671–675.

118. Francis DM, Page R. Strategies to Optimize Protein Expression in *E. coli*. Current Protocols in Protein Science. 2010;61(1).

119. Chou CP. Engineering cell physiology to enhance recombinant protein production in *Escherichia coli*. Applied Microbiology and Biotechnology. 2007;76(3):521–532.

120. Vasina JA, Baneyx F. Expression of Aggregation-Prone Recombinant Proteins at Low Temperatures: A Comparative Study of the *Escherichia coli* cspA and tac Promoter Systems. Protein Expression and Purification. 1997;9(2):211–218.

121. Eğilmez Hİ, Haspolat E. Temperature-Dependent Parameters in Enzyme Kinetics: Impacts on Enzyme Denaturation. Fundamental Journal of Mathematics and Applications. 2024;7(4):226–235.

122. Atroshenko DL, Sergeev EP, Golovina DI, Pometun AA. Additivities for Soluble Recombinant Protein Expression in Cytoplasm of *Escherichia coli*. Fermentation. 2024;10(3):120.

123. Turner P, Holst O, Karlsson EN. Optimized expression of soluble cyclomaltodextrinase of thermophilic origin in *Escherichia coli* by using a soluble fusion-tag and by tuning of inducer concentration. Protein Expression and Purification. 2005;39(1):54–60.

124. Xu J, Wu Z, Zhao K, Xi Z, Wang L, Cheng F, Xue Y, Zheng Y. IPTG-induced high protein expression for whole-cell biosynthesis of L-phosphinothricin. Biotechnology Journal. 2023;18(9).

125. Rasooli F, Hashemi A. Efficient expression of EpEX in the cytoplasm of *Escherichia coli* using thioredoxin fusion protein. Research in Pharmaceutical Sciences. 2019;14(6):554.

126. Larentis AL, Nicolau JFMQ, Esteves G dos S, Vareschini DT, de Almeida FVR, dos Reis MG, Galler R, Medeiros MA. Evaluation of pre-induction temperature, cell growth at induction and IPTG concentration on the expression of a leptospiral protein in *E. coli* using shaking flasks and microbioreactor. BMC Research Notes. 2014;7(1):671.

127. Troy T, Denson JP, Esposito D. Optimizing Expression and Solubility of Proteins in *E. coli* Using Modified Media and Induction Parameters. En: Burgess-Brown NA, editor. Heterologous Gene Expression in *E. coli*: Methods and Protocols. New York, NY: Springer New York; 2017. p. 65–82. Disponible desde: https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6887-9_5

128. Wang G, de Jong RN, van den Bremer ETJ, Parren PWHI, Heck AJR. Enhancing Accuracy in Molecular Weight Determination of Highly Heterogeneously Glycosylated Proteins by Native Tandem Mass Spectrometry. Analytical Chemistry. 2017;89(9):4793–4797.

129. Waritani T, Okuno Y, Ashida Y, Tsuchiya R, Kobayashi K, Yamada T. Development and characterization of monoclonal antibodies against canine trypsin. Veterinary Immunology and Immunopathology. 2001;80(3–4):333–338.

130. Simonian MH. Spectrophotometric Determination of Protein Concentration. Current Protocols in Toxicology. 2004;21(1).

131. Bocian A, Sławek S, Jaromin M, Hus KK, Buczkowicz J, Łysiak D, Petrílla V, Petrillova M, Legáth J. Comparison of Methods for Measuring Protein Concentration in Venom Samples. Animals. 2020;10(3):448.

132. Chen Z, Potempa J, Polanowski A, Wikstrom M, Travis J. Purification and characterization of a 50-kDa cysteine proteinase (gingipain) from *Porphyromonas gingivalis*. The Journal of biological chemistry. 1992;267(26):18896–901.

133. Łos M, Czyz A, Sell E, Wegrzyn A, Neubauer P, Wegrzyn G. Bacteriophage contamination: is there a simple method to reduce its deleterious effects in laboratory cultures and biotechnological factories? Journal of applied genetics. 2004;45(1):111–20.

134. Huq NL, Seers CA, Toh ECY, Dashper SG, Slakeski N, Zhang L, Ward BR, Meuric V, Chen D, Cross KJ, et al. Propeptide-Mediated Inhibition of Cognate Gingipain Proteinases. PLoS ONE. 2013;8(6):e65447.

135. Ally N, Whisstock JC, Sieprawska-Lupa M, Potempa J, Le Bonniec BF, Travis J, Pike RN. Characterization of the Specificity of Arginine-Specific Gingipains from *Porphyromonas gingivalis* Reveals Active Site Differences between Different Forms of the Enzymes. Biochemistry. 2003;42(40):11693–11700.

136. Ruatta SM, Prada Gori DN, Fló Díaz M, Lorenzelli F, Perelmuter K, Alberca LN, Bellera CL, Medeiros A, López G V., Ingold M, et al. Garbage in, garbage out: how reliable training data improved a virtual screening approach against SARS-CoV-2 MPro. Frontiers in Pharmacology. 2023;14.

137. Maggiora G, Vogt M, Stumpfe D, Bajorath J. Molecular Similarity in Medicinal Chemistry. Journal of Medicinal Chemistry. 2014;57(8):3186–3204.

7. Anexos

7.1. Anexo 1

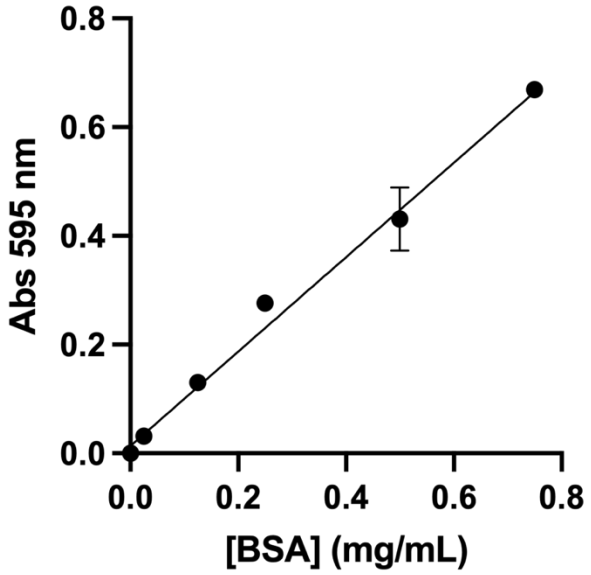

Figura 7.1. Curva de calibración para el ensayo de Bradford. El rango de concentración utilizado fue de 0,025 a 0,750 mg/mL de *Albumin Standard* (BSA), ensayadas por duplicado. La ecuación del ajuste lineal es y = 0,8681x + 0,01353; con un R^2 de 0,9858.

7.2. Anexo 2

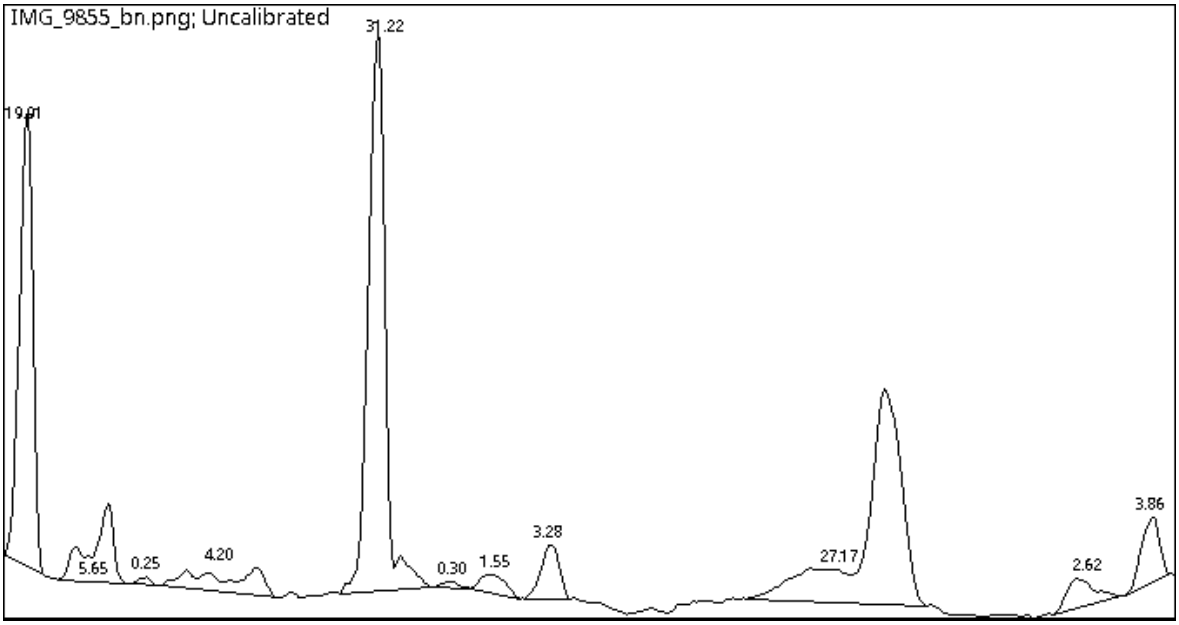

Figura 7.2. Densitograma de RgpB obtenida en Figura 4.14. Se indica sobre cada pico el tamaño expresado como porcentaje del tamaño total de los picos medidos. El quinto pico, de izquierda a derecha, corresponde a la banda de RgpB. Elaborado con ImageJ (117).