



Departamento de
Microbiología, Medicina
Preventiva y Salud Pública
Universidad Zaragoza

Directores:

José Antonio Ainsa Claver

Grupo de Genética de Micobacterias

Departamento de Microbiología,

Medicina Preventiva y Salud Pública

Olga Abian Franco

Instituto Aragonés de

Ciencias de la Salud

Aproximaciones al desarrollo de nuevos fármacos antibacterianos en relación con los procesos de infección.

Mónica Jurado García

Master en Biología Molecular y Celular 12/13

ÍNDICE

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS	4
INTRODUCCIÓN	5
1 Historia.....	5
2 <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	6
2.1 Taxonomía	6
2.2 Características	7
3 Mecanismo frente al estrés oxidativo	8
3.1 Mecanismos de mantenimiento intracelular estado tiol-redox.....	9
3.2 Micotiol.....	10
3.3 Micorredoxinas.....	11
MATERIALES Y MÉTODOS	12
1 Material biológico, medios y condiciones de cultivo.....	12
1.1 Medios de cultivo	12
1.2 Condiciones de cultivo	13
1.3 Conservación de cepas.....	13
1.4 Plásmido	14
2 Extracción de plásmidos.....	14
2.1 Mini-Preparación.....	14
2.2 Cuantificación	15
3 Técnica generales de DNA	15
3.1 PCR	15
3.1.1 Comprobación del BAC.....	16
3.1.2 Obtención de productos de amplificación sobre el plásmido pKD4.....	17
3.1.3 Comprobación del intercambio alélico en <i>E.coli</i>	20
3.2 Electroforesis de DNA en gel de agarosa	21
4 Electrotransformación	22
4.1 Electrotransformación del plásmido pKD46.....	22
4.2 Electrotransformación de los sustratos de intercambio alélico en bacterias que expresan la recombinasa de pKD46.....	23
4.3 Siembra en placa.....	24
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
1 Comprobación de la presencia de los genes <i>mrx</i> en los BACs de <i>E.coli</i> , y electrotransformación del plásmido pKD46.....	26

2 Amplificación del gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 con los extremos correspondientes a los genes <i>mrx</i> , para obtener los sustratos de intercambio alélico.....	31
3 Introducción del sustrato de intercambio alélico en las células competentes que contienen el BAC y el plásmido pKD46.	34
4 Selección de las bacterias en las que el sustrato de intercambio alélico ha recombinado con el BAC.....	37
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40

ANTECEDENTES Y OBJETIVOS

Entre las enfermedades infecciosas que causan la muerte de 15 millones de personas al año, siendo la principal causa de morbilidad y mortalidad en los países desarrollados y subdesarrollados, nos encontramos con *Mycobacterium tuberculosis* (Mtb), que es el agente causal de la tuberculosis (TB), de la cual están infectados un tercio de la población mundial y sigue siendo la principal causa de muerte por un solo agente infeccioso, llegando a cifras de 1,7 millones de muertes al año. De los individuos infectados de tuberculosis, entre el 5-10% la desarrollaran de forma activa, mientras que los individuos restantes pueden controlar pero no eliminar la infección.

Mycobacterium tuberculosis (Mtb), durante su ciclo patogénico, se encuentra expuesto a numerosos factores de estrés redox, los mecanismos que utiliza para detectar este estrés y para mantener la homeostasis redox son fundamentales para el éxito de Mtb, e incluso se cree que todos estos mecanismos son importantes en la transición de la fase de latencia a la reactivación.

Ante el estrés redox emplean una serie de mecanismo y vías para la supervivencia, tales como el sistema tiorredoxina y las vías de micotiol, en estas ultimas entrarían las micorredoxinas, recientemente identificadas y caracterizadas en *Corynebacterium glutamicum* (Messens et al, 2009), una nueva clase de oxidoreductasas también presentes en Mtb, estas enzimas utilizan el micotiol para reducir disulfuros en la célula.

El objetivo de este trabajo es el estudio de la micorredoxinas, construyendo los sustratos de intercambio alélico necesarios para construir mutantes Knock-out de los genes *mrx1* (Rv3198A), *mrx2* (Rv3053c), y *mrx3* (Rv0508). Los mutantes previos se realizaron en BACs de *E.coli*, para en un futuro llevarlos a Mtb, pudiéndose utilizar para ensayar la actividad de nuevos fármacos antituberculosis en desarrollo y orientar estos procesos hacia fármacos más activos.

INTRODUCCIÓN

1 Historia

En pocas enfermedades es posible documentar la estrecha relación de la misma con la historia de la propia humanidad, como es el caso de la Tuberculosis. Hay evidencias paleopatológicas en restos neolíticos precolombinos, así como en momias egipcias que datan aproximadamente de año 2400 a.E.

A lo largo de la historia se le han dado diversos nombres a esta enfermedad, tales como tisis, mal de Pott, mal del Rey o plaga blanca.

Esta aceptada la teoría de que *Mycobacterium tuberculosis* se origino por la evolución de microorganismos primitivos dentro del propio genero. En algún momento de esta evolución tuvo reservorio en animales, dando lugar a *Mycobacterium bovis*, y coincidiendo con la domesticación de los animales, surgiría el reservorio en humanos, por la mutación de *M.bovis*.

En la Grecia clásica, Hipócrates de Cos le dio nombre a esta enfermedad, denominándola “Tisis”, describiendo el cuadro clínico de dicha enfermedad, en su “Tratado sobre las enfermedades”. Más tarde en la Edad Media y en el Renacimiento, aumenta la incidencia de tuberculosis, llamándose en estos momentos “el mal de Rey”, llegando a alcanzar su máxima incidencia en el siglo XVIII, donde Benjamis Marten publica “*A New Theory of Consumptions more specially of a Phthisis or Consumption of the Lungs*”, en la propone la teoría de que el causante de la tuberculosis debe ser algún tipo de ser vivo minúsculo capaz de sobrevivir en nuestro cuerpo.

Algún tiempo más tarde, Robert Koch (1843-1910) detalla en su publicación *Die Aetiologie der Tuberculose*, que *Mycobacterium* es el único causante de la tuberculosis en todas sus variantes.

En 1921, Albert Calmette y Camille Guérin producen la vacuna contra la tuberculosis (BCG), empleando una variante atenuada del *Mycobacterium bovis*.

A partir de 1944, donde se descubrió la estreptomicina, producida por el hongo *Streptomyces griseus* capaz de inhibir el crecimiento del *Mycobacterium*, surgieron nuevos fármacos antituberculosis: ácido para-amino salicílico (PAS) en 1946, isoniazida (INH) en 1952, pirazinamida (PAZ) en 1954, etambutol (EMB) en 1962 y rifampicina (RIF) en 1967. Llegando a conseguirse que la tuberculosis fuera una enfermedad tratable y curable.

Se creyó durante años que la tuberculosis estaba controlada y prácticamente erradicada, pero la pandemia del SIDA cambió esta idea, ya que con el SIDA se debilita el sistema inmunitario, haciendo que enfermedades que no son mortales en ese momento lo vuelvan a ser, como es el caso de la tuberculosis. Esto obligó en 1993 a la OMS (Organización Mundial de la Salud) a declarar la tuberculosis como “urgencia mundial”.

Actualmente, el tratamiento consiste en dos meses de administración de rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol, seguidos de cuatro meses con rifampicina e isoniazida.

2 *Mycobacterium tuberculosis*

2.1 Taxonomía

Pertenece al dominio Bacteria, de la clase *Actinobacteria*, del orden *Actinomycetales*, del suborden *Corynebacterineae*, agrupándose en el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*, que comprende varias especies como *M.bovis*, *M.tuberculosis*, *M.caprae*, entre otras.

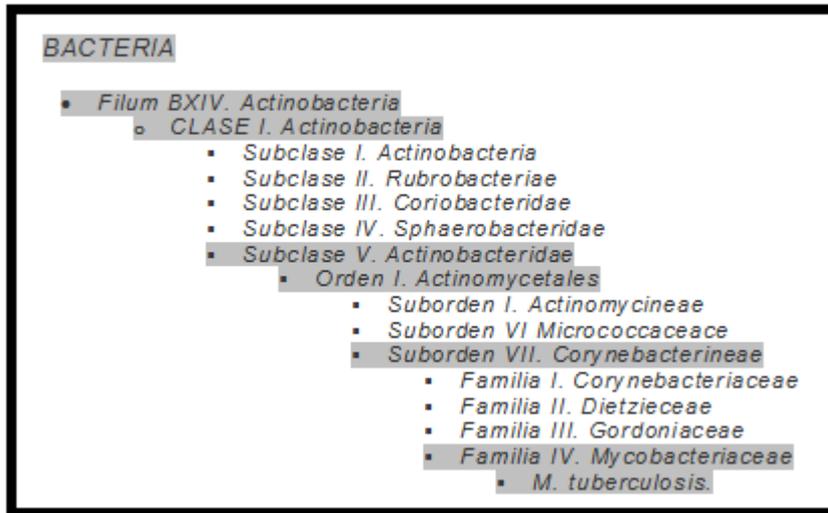


Fig. 1. Taxonomía de *Mycobacterium tuberculosis*.

2.2 Características

Son bacilos de tamaño 2-5 μm de longitud y 0,2-0,5 μm de anchura, posee un elevado contenido en G+C (65,6%) en su genoma, se caracteriza por ser intracelular obligado, aerobio estricto, con actividad catalasa y nitrato reductasa, inmóvil y no-esporulado, capacidad de acumular niacina y reducir los nitratos a nitritos. La transmisión es por vía aérea.

Se clasifican como micobacterias de crecimiento lento, ya que posee un tiempo de duplicación de 24 horas y debe transcurrir un periodo de 3 a 4 semanas para visualizar una colonia en medio sólido.

La envoltura que poseen les proporciona protección y soporte, con mecanismos que permiten el intercambio de sustancias con el ambiente, las micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram + pero tienen algunos aspectos distintos. La diferencia radica, en que aunque ambos poseen peptidoglicanos, las moléculas asociadas a este polímero suelen ser lipídicas en lugar de proteicas y lipopolisacáridos como sucede en micobacterias.

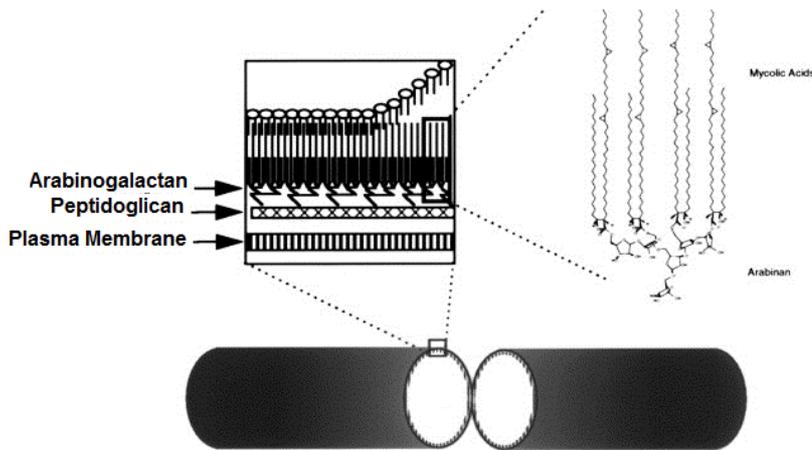


Fig. 2. Estructura de la envuelta de Mycobacterias.

Además la primera barrera con la que se encuentra ante un estrés oxidativo es la pared celular y la membrana, por ello veremos de qué partes se compone.

La envoltura se divide en dos partes principales;

→ La pared celular, los lípidos constituyen el 20% del peso seco de la bacteria, y esta dividida en cuatro capas, la más interna está compuesta por peptidoglicano, dando forma y rigidez, por encima de ésta, hay tres capas compuestas por complejos péptidos, polisacáridos y lípidos, en una matriz homogénea.

→ La membrana plasmática, la principal diferencia con otras membranas, es que los derivados de fosfolípidos están altamente glicosilados dando lugar a moléculas como el lipoarabinomano (LAM), importante en la patogénesis de la tuberculosis.

3 Mecanismo frente al estrés oxidativo

Las bacterias ante situaciones de extrema toxicidad, hace que se desencadene los sistemas de estrés celular, produciendo una respuesta para deshacerse de esos compuestos tóxicos o estados (metales, las especies reactivas de oxígeno (ROS), las especies reactivas de nitrógeno (RNS), de pH ácido, falta de nutrientes, y la hipoxia).

La exposición de las micobacterias al estrés oxidativo provoca cambios en el metabolismo y la fisiología que no sólo ayudan a sobrevivir dentro del hospedador, sino que también permiten que se exprese factores de virulencia que en última instancia conducen a la patogénesis de la enfermedad.

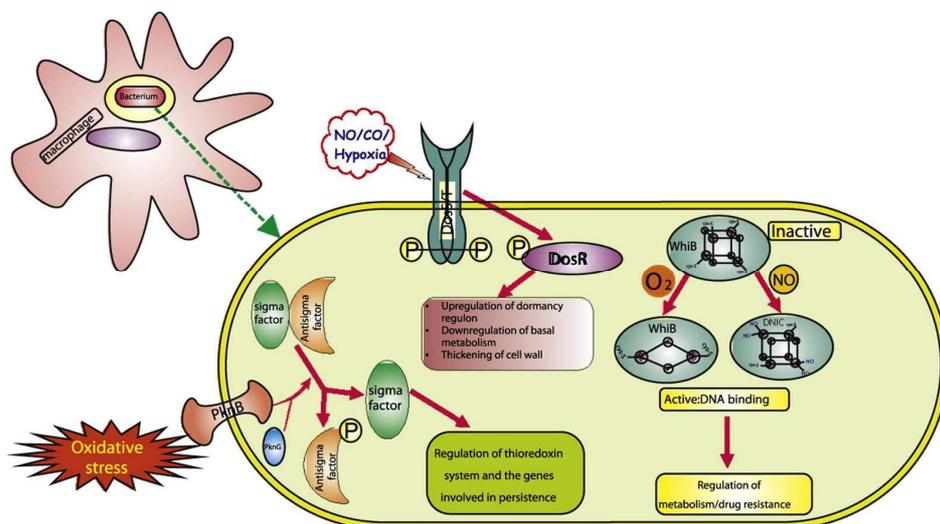


Fig. 3. Estrés redox al que se ve sometido una micobacteria.

El nivel de estrés redox en el microambiente que rodea *Mycobacterium tuberculosis*, juega un papel importante en la determinación de si los bacilos entran en el estado constante no-replicativo o el estado replicativo.

3.1 Mecanismo de mantenimiento intracelular estado tior-redox

Para la función de varias proteínas, los enlaces disulfuro entre cisteínas apareadas juega un papel muy importante, ya sea mediante la estabilización de la conformación o el funcionamiento como un modulo de detección redox. Para mantener un entorno de reducción en el citoplasma y resistir la formación no especifica inter e intramolecular de enlaces disulfuro, las bacterias gastan una energía considerable.

En el caso de las micobacterias, es vital mantener un *pool* óptimo de tior, porque hacen frente con frecuencia al estrés oxidoreductivo generado por el sistema inmune del hospedador. Este tior presente en las micobacterias, mantiene la reducción intracelular, con unas concentraciones milimolares de múltiples *buffers* de tior.

Utilizan múltiples vías para reducción de los enlaces disulfuro no específico que se producen, así como las que ocurren en proteínas que usan tiol como interruptor como sensor intracelular en ambiente redox.

En el sistema de micobacterias de tiol-disulfuro se compone de un pseudodisacárido de micotiol (MSH) y un sistema de Trx.

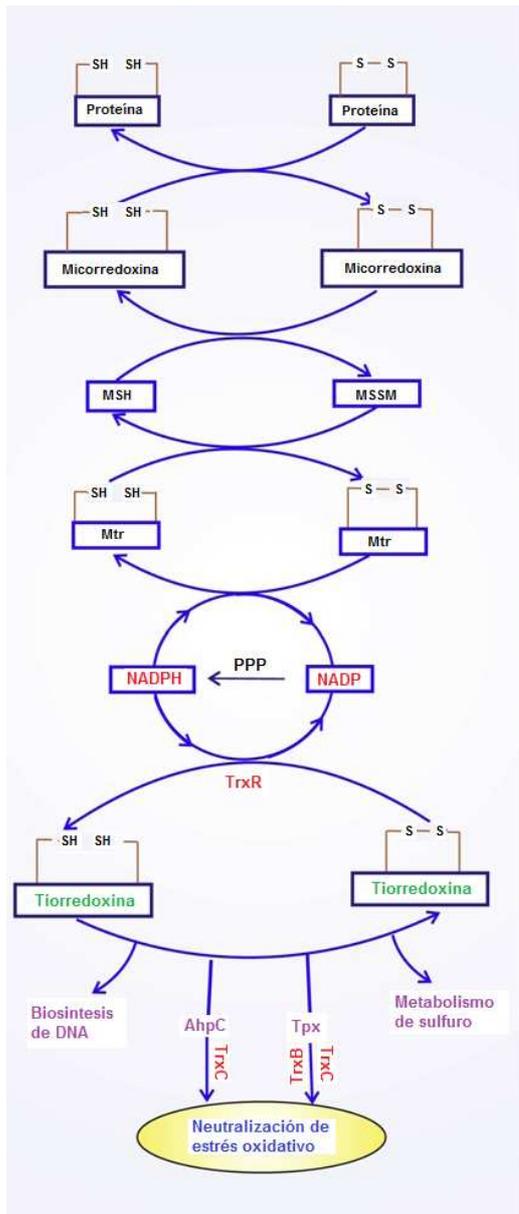


Fig. 4. Mecanismo para mantenimiento del contenido intracelular Tio-redox.

3.2 Micotiol

Los tioles de bajo peso molecular se emplean por las células vivas para evitar el estrés disulfuro y para mantener la humedad relativa.

El principal tiol presente en plantas, animales, bacterias Gram-negativas, y unas pocas bacterias Gram-positivas, es el glutatión (GSH).

Como la mayoría de actinobacterias, carecen del mecanismo del glutatión (GSH), en su lugar estas bacterias producen micotiol (MSH), que es incluso más resistente que el GSH. La autooxidación de MSH es más lento que en el GSH, lo que significa que el potencial redox de MSH es menor que la de GSH.

Además recientemente se identificaron dos micorreductoxinas (homólogas de glutarreductoxinas) que podrían catalizar la transferencia de electrones de MSH a los enlaces disulfuro en *Corynebacterium glutamicum*, en las que se demostró que era responsable de la resistencia a arseniato.

3.3 Micorreductoxinas

Se llevaron a cabo estudios sobre el mecanismo de defensa al estrés redox, con un metaloide, el arsénico, en su forma inorgánica y que en presencia de oxígeno se presenta como arseniato. Una forma que se observó de desintoxicación celular, es la reducción de arseniato a arsenito, mediante las enzimas arseniato reductasas citoplasmáticas (ArsCs). Se estudió en la actinobacteria, *Corynebacterium glutamicum*, describiéndose dos enzimas ArsC que se acoplan al *buffer* redox constituido por micotiol (MSH) y una nueva enzima denominada micorreductoxina (Mrx) conformando el par MSH/Mrx, siendo importante la presencia de las micorreductoxinas descubiertas también en *Mycobacterium tuberculosis*.

Las investigaciones se han centrado en Mrx1, aunque se han descubierto tres micorreductoxinas (Mrx1, Mrx2 y Mrx3), pero Mrx2 no se sabe exactamente su papel en el estrés oxidativo, y se están haciendo indagaciones porque además podría tratarse de un gen esencial para la micobacteria.

Mrx1 es una pequeña proteína de 10 kDa, se ha llegado a determinar su estructura y su función, esta vinculada a la vía de transferencia electrónica del micotiol y es capaz de reducir disulfuros mixtos.

La biosíntesis de MSH en micobacterias, representa un objetivo potencial para fármacos, porque es único en actinobacterias y esta ausente en humanos.

MATERIALES Y MÉTODOS

1 Material biológico, medios y condiciones de cultivo

En este estudio hemos utilizado cepas bacterianas de *E.coli* DH10 β que contenían el BAC (Bacterial Artificial Chromosome) de interés, en este caso conteniendo los genes que codifican las micorreductoxinas de *Mycobacterium tuberculosis*.

Micorreductoxinas	BAC
Mrx1	Rv092
Mrx2	Rv280
Mrx3	Rv308

Tabla 1. Relación de la micorreductoxinas con el BAC en *E.coli*.

A partir de estas cepas, se construyeron otras derivadas, como se detalla en las secciones siguientes.

1.1 Medios de cultivo

E. coli con el BAC correspondiente, se cultivó en medio **líquido** Luria-Bertani (LB) (10g/l BactoTryptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl) y en medio **sólido** LB agar por agotamiento. Los medios fueron suplementados con el antibiótico correspondiente, Cloranfenicol (1mg/ml).

Otras cepas se cultivaron en presencia de Ampicilina (100 µg/ml)+ Cloranfenicol (1mg/ml), Kanamicina (50 mg/ml) + Cloranfenicol (1mg/ml), dependiendo si cultivamos el BAC con el plásmido pKD46 y BAC ya deletado en Mrx con el fragmento pKD4, respectivamente.

Para el **cultivo sólido**, se realizó en placas de agar Luria-Bertani (LB) (10g/l BactoTryptona, 5 g/l extracto de levadura, 10 g/l NaCl), con los antibióticos Cloranfenicol (1mg/ml), Ampicilina (100 µg/ml)+ Cloranfenicol (1mg/ml), Kanamicina (50 mg/ml) + Cloranfenicol (1mg/ml), dependiendo si cultivamos el BAC, el BAC con el plásmido pKD46 y BAC ya deletado en Mrx con el fragmento pKD4, respectivamente. Además se utilizaron placas conteniendo sólo Kanamicina (50 mg/ml), y sólo Cloranfenicol (1mg/ml), para poder diferenciar las cepas que tuvieran la delección de Mrx y las que tuvieran el BAC.

1.2 Condiciones de cultivo

Tanto *E. coli* con el BAC como *E. coli* con el BAC deletado se cultivaron en tubos de vidrio con agitación, se incubaron a 37°C. Mientras que *E. coli* con el BAC y el plásmido pKD46, se cultivaron en tubos de vidrio con agitación, se incubaron a 30°C ya que el plásmido pKD46 tiene un origen de replicación termosensible.

En el cultivo en placa, *E. coli* con el BAC y *E. coli* con el BAC deletado en Mrx, se incubaron a 37°C, mientras que *E. coli* con el BAC y el plásmido pKD46, se incubaron a 30°C.

1.3 Conservación de cepas

Todas las cepas utilizadas de *E. coli*, con el BAC, *E. coli* con el BAC y pKD46 y *E. coli* con el BAC deletado en Mrx, se conservan en medio de cultivo con 15% de glicerol. Para ello, se toman 700 µl de un cultivo crecido y se mezclan homogéneamente con 300 µl de glicerol 50%. Se conservan a -80°C.

1.4 Plásmido

El plásmido que se ha utilizado es el pKD46 que lleva una recombinasa, que se expresa con L-Arabinosa, llevando a cabo la recombinación que se desea. Tiene un origen de replicación termosensible, por lo que los cultivos que lo contienen deben incubarse a 30°C. Lleva un gen de resistencia a antibióticos beta-lactámicos.

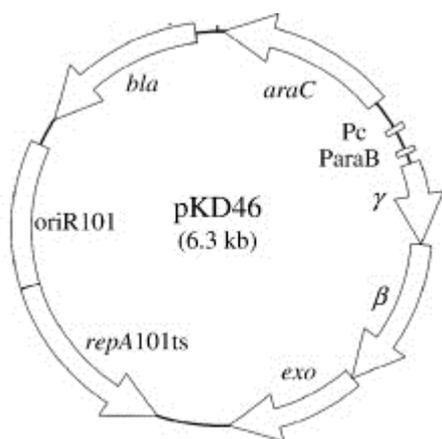


Fig. 5. Plásmido pKD46.

2 Extracción de plásmidos

Las extracciones de plásmidos a partir de cultivos de *E. coli* están basados en la lisis alcalina de las células bacterianas.

2.1 Mini-Preparación

Se parte de un cultivo de *E. coli* puro en medio líquido, crecido durante un día.

- 1) Se centrifuga 1,5 ml de cultivo y el pellet de bacterias se resuspende en 100 µl de Solución I (50 mM glucosa, 10 mM EDTA, 25 mM Tris HCl (pH 8,0), 4 mg/ml lisozima). Se incuba 5 min. a temperatura ambiente (Rotura de la pared bacteriana).

- 2) Se añade 200 μ l de Solución II (0,2 M NaOH, 1% SDS) y se mezcla suavemente invirtiendo el tubo varias veces hasta que el contenido quede viscoso. Se incuba en hielo durante 5 min. (Lisis bacteriana)
- 3) Se añade 150 μ l de Solución III fría (3 M acetato potásico, 11,5% v/v acético glacial), y se incuba en hielo 5 min. (Precipitado del DNA cromosómico).
- 4) Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. y se pasa el sobrenadante a un tubo eppendorf limpio.
- 5) Se añaden 2 volúmenes de etanol absoluto frío y un volumen final del 10% de acetato de sodio 3 M y se incuba a -20°C durante 30 min., así conseguimos que precipite el DNA plasmídico.
- 6) Se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. y se continúa con la fase acuosa en un tubo eppendorf limpio.
- 7) Se lava el precipitado con etanol 70%. A continuación se centrifuga a 12000 rpm durante 5 min. y se elimina el etanol.
- 8) Se seca el precipitado en speed-vac y se resuspende en 15-20 μ l de TE o H₂O milli-Q.
- 9) Se añade 1 μ l de RNAsa (1 mg/ml) y se incuba 15 min. a 37°C. Los plásmidos extraídos se conservan a -20°C.

2.2 Cuantificación

La cuantificación se realizó mediante medida de la absorbancia a 260nm en NanoDrop®.

3 TÉCNICAS GENERALES DE DNA

3.1 PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o Polimerase Chain Reaction (PCR) consiste en la amplificación de fragmentos de DNA comprendidos entre dos zonas determinadas del genoma cuya secuencia es conocida.

Se ha utilizado la enzima Taq polimerasa (Bioline) que es de alta fidelidad.

La mezcla de reacción debe contener:

- 5 μ l de Buffer (Bioline), que contiene 15 mM de $MgSO_4$ y desoxirribonucleótidos (dNTP) 25 mM.
- 0,5 μ l de cada uno de los oligonucleótidos 25 μ M.
- 0,25 μ l de Taq Polymerase (Roche).
- \leq 100 ng de DNA molde
- H_2O miliQ hasta alcanzar un volumen final de 17.75 μ l.

Todos los componentes de esta mezcla se mantienen en hielo. Es necesario, además, incluir un control negativo (sustituyendo el DNA molde por agua) para poder detectar contaminaciones por otros DNA si las hubiera, y un control positivo, para confirmar que la PCR tiene lugar correctamente.

La reacción de PCR se utilizó para diversas aplicaciones que se detallan a continuación.

3.1.1 Comprobación del BAC

El objetivo fue verificar que las cepas que se habían seleccionado a partir de la librería de BACs contenían efectivamente los genes de las micorrodoxinas.

El programa de la PCR es el siguiente:

- o 1 fase de 10 seg. A 94°C.
- o 30 ciclos compuestos por tres fases: 15 s a 94°C
15s a $T_m = 62^\circ C$
50s a 72°C.
- o Finaliza -4°C.

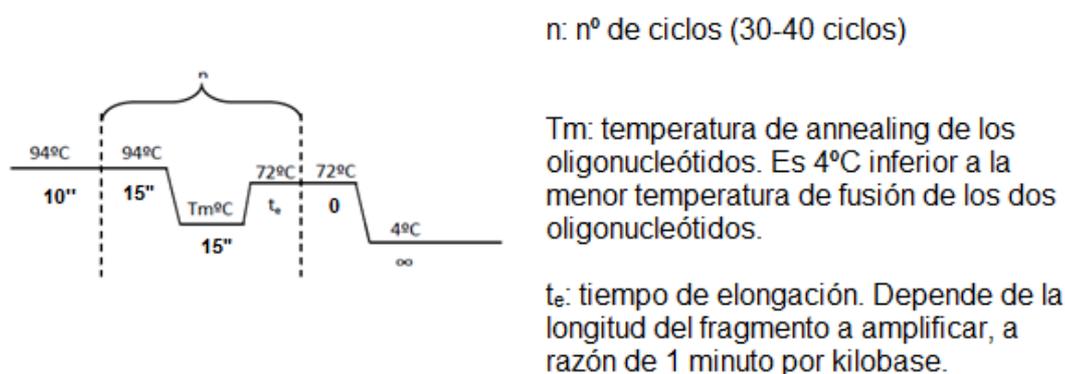


Fig. 6. Representación PCR

Primers	Secuencia 5'→3'	T _m
M1-AD	cgggcgtgtcgccacgcc	68°C
M1-BR	cgcagcgcttgccgccgg	69°C
M2-AD	ctggagccttgcgggccgc	66°C
M2-BR	cggccatgcagcggtatccgcg	68°C
M3-AD	ggtggccgctacgggtgcg	67°C
M3-BR	gaccggcgcgctacgatgcg	67°C

Tabla 2. Oligonucleótidos utilizados para la comprobación de los BACs.

Los oligonucleótidos M1-AD y M1-BR se utilizaron para detectar el gen *mrx1*, los oligonucleótidos M2-AD y M2-BR se utilizaron para detectar el gen *mrx2*, y los oligonucleótidos M3-AD y M3-BR se utilizaron para detectar el gen *mrx3*.

3.1.2 Obtención de productos de amplificación sobre el plásmido pKD4

Se utilizó para amplificar el gen de resistencia a Kanamicina, con los oligos P1 y P2 y con los extremos de *mrx1*, *mrx2* y *mrx3*.



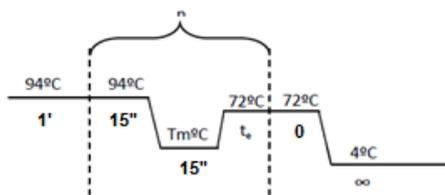
Fig. 7. Los fragmentos que se van a amplificar en cada caso, el que lleva solo p1 y p2 se utilizará como control negativo.

Las condiciones de la reacción fueron las mismas que en el apartado 3.1.1.

El programa de la PCR es el siguiente:

- 1 fase de 1 min. a 94°C.
- 30 ciclos compuestos por tres fases: 15 s a 94°C
15s a $T_m = 58^\circ\text{C}$
50s a 72°C.
- Finaliza -4°C.

n: nº de ciclos (30-40 ciclos)



T_m : temperatura de annealing de los oligonucleótidos. Es 4°C inferior a la menor temperatura de fusión de los dos oligonucleótidos.

t_e : tiempo de elongación. Depende de la longitud del fragmento a amplificar, a razón de 1 minuto por kilobase.

Fig. 8. Representación de PCR.

Después se realizó una purificación de lo obtenido, con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche). Una vez purificado siguiendo los pasos indicados en el protocolo de Roche, lo guardo a -20°C.

Los oligos utilizados:

Primers	Secuencia 5'→3'	Tm
M1-D	ctgccgagccgccacaccgcccgggctcgctcgccgcgctaggtagcgtgt cgtaggctggagctgcttc	68°C
M1-R	cccgcgtgatcatcgaatcgtggcagcgtgccaatgaaagtccacgtcg catatgaatatcctccttagt	69°C
M2-D	Gttgccagatcctgtcagattcccgatttccgcaaaggagcggtagcggc gttaggctggagctgcttc	66°C
M2-R	Gccccgcgatatccatggcaccgcaatcttcttatctatgtctgccgcg catatgaatatcctccttagt	68°C
M3-D	tcgcgccttggtgctgccgtccggccagcaccgcgactggcgccc gttaggctggagctgcttc	67°C
M3-R	cggcagcaccacctggccagctccctcgactacccagtaaaactggtgt catatgaatatcctccttagt	67°C
P1	gttaggctggagctgcttc	65°C
P2	catagtgaatatcctccttagt	65°C

Tabla 3. Oligonucleótidos usados para amplificar a pKD4.

En los oligonucleótidos M1-D, M2-D, y M3-D se destaca en negrita la secuencia correspondiente a la región P1. En los oligonucleótidos M1-R, M2-R y M3-R se destaca en negrita la secuencia correspondiente a la región P2.

Los oligonucleótidos M1-D y M1-R se utilizaron para amplificar el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 proporcionándole los extremos correspondientes al gen *mrx1*. De modo similar, los oligonucleótidos M2-D y M2-R, y los oligonucleótidos M3-D y M3-R se utilizaron para hacer la misma amplificación proporcionando extremos correspondientes a los genes *mrx2* y *mrx3* respectivamente.

Los oligonucleótidos P1 y P2 se utilizaron para amplificar el gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 sin proporcionarle secuencias adicionales.

3.1.3 Verificación del intercambio alélico en *E. coli*

Se utilizó con el objetivo de verificar si en las colonias que crecieron en placa LB con antibióticos Kanamicina (50 mg/ml) + Cloranfenicol (1mg/ml) contenían efectivamente el BAC en el que se había realizado el intercambio alélico en los genes de micorrodoxinas.

En esta ocasión, las condiciones fueron las siguientes:

- 2 μ l de Buffer (Bioline), que contiene 15 mM de $MgSO_4$ y desoxirribonucleótidos (dNTP) 25 mM.
- 0,15 μ l de cada uno de los oligonucleótidos 25 μ M.
- 0,075 μ l de Taq Polymerase (Roche).
- DNA molde a partir de picado en colonia con un palillo.
- H_2O miliQ hasta alcanzar un volumen final de 7.625 μ l.

El programa de la PCR es el siguiente:

- 1 fase de 10 min. a 94°C.
- 30 ciclos compuestos por tres fases: 15 s a 94°C
15s a $T_m = 58^\circ C$
50s a 72°C.
- Finaliza -4°C.

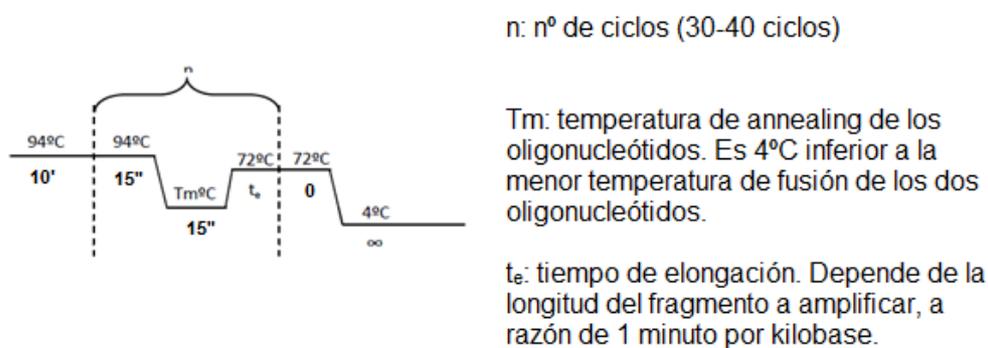


Fig. 9. Representación de PCR.

Primers	Secuencia 5'→3'	Tm
Tn5-A	cgcttgggtggagaggctattc	60°C
Tn5-B	ccgctcagaagaactcgtaag	58°C
Tn5-C	cccaaccttaccagagggcgcccc	68°C
Tn5-D	ctcccgattcgcagcgcacgccc	68°C

Tabla 4. Oligonucleótidos para comprobar la delección del gen.

Estos se combinaron con los oligonucleótidos mostrados en las Tablas 2 y 3 para verificar la presencia del intercambio alélico en los genes de micorrodoxinas.

3.2 Electroforesis de DNA en gel de agarosa

Esta técnica permite separar, identificar y aislar fragmentos de DNA que migran en una matriz de agarosa bajo la acción de un campo eléctrico. El DNA, de carga negativa a pH=8, se desplaza por los poros de agarosa hacia el polo positivo, dependiendo su movilidad de la longitud y conformación del DNA, de la concentración de agarosa y de la corriente aplicada. La elección del contenido en agarosa del gel dependerá del rango de longitudes de los fragmentos que se quieran separar.

La visualización de los fragmentos de DNA amplificados o digeridos con enzimas de restricción, cuyos tamaños varían entre 0,4 kb y 5kb, se realiza migrando las muestras en un gel de agarosa 0,8% -1,2% (p/v) preparado en tampón TBE 0,5x (Tris base 45mM, ácido bórico 45 mM, EDTA 0,1 mM, pH=8,0). Durante la preparación del gel, se añade bromuro de etidio, un agente intercalante del DNA que permitirá su posterior detección con luz UV (260nm), a una concentración de 0,5 µg/ml.

Cada una de las muestras se mezcla en primer lugar con un buffer de carga (azul de bromofenol 0,25%, sacarosa 10% en tampón TE), que la dota de mayor densidad, facilitando su carga en los pocillos del gel. Con objeto de asignar el tamaño a cada banda, es necesario incorporar un marcador de peso molecular, en este caso el DNA del fago digerido con *Pst*I. La migración se realiza en tampón TBE 0,5x a un voltaje de 90-100 voltios durante 30-45 min.

4 Electrotransformación

4.1 Electrotransformación del plásmido pKD46

En primer lugar, se prepararon células competentes de las cepas que contenían los BACs Rv092, Rv280, y Rv308 para introducirles el plásmido pKD46.

Para preparar **células electrocompetentes**:

- Se parte de 3 tubos con medio de cultivo LB con Cloranfenicol (1mg/ml), pre-incubados a 37°C, que se inocularon con cultivos previos de las cepas de *E. coli* que contenían los BACs Rv092, Rv280, y Rv308, respectivamente.
- Estos cultivos se incubaron hasta alcanzar una DO a 600nm de 0,5-0,6 momento en el cual se detuvo el crecimiento mediante la incubación en hielo del cultivo durante 10 min. (A partir de este momento respetar la cadena de frío).
- Las células se centrifugan y lavan dos veces con H₂O estéril y una vez con glicerol al 10%.
- Tras esto se centrifugan nuevamente y se resuspenden en 1 ml de glicerol 10% y se reparten en 4 alícuotas de 50 µl que se almacenan a -80°C.

Para llevar a cabo la **electrotransformación** de las células con el plásmido pKD46:

- Se mezcla la alícuota de células electrocompetentes con 50 μ l de H₂O milli-Q estéril.
- Se adicionan 1 μ l de DNA plasmídico.
- Se pone la mezcla en cubetas de 0,2cm (Bio-Rad) preenfriadas a 4°C.
- Se les da un pulso (2,5kV, 25 μ F, 200 Ω) en un GenePulser XcellTM (Bio-Rad).
- Las células se recogen en 900 μ l de LB y se incuban 1 hora a 30°C para que expresen la resistencia al antibiótico.
- Se siembran las distintas diluciones en placas petri con LB agar y los antibióticos ampicilina y cloranfenicol.

4.2 Electrotransformación de los sustratos de intercambio alélico en bacterias que expresan la recombinasa de pKD46

En esta técnica, las bacterias que contienen uno de los BACs y el plásmido pKD46 se tratan con arabinosa para que expresen la recombinasa. Los cultivos se incuban en la estufa de 30°C ya que pKD46 es termosensible.

Para preparar **células electrocompetentes**:

- Se parte de 100 ml de medio líquido LB con cloranfenicol (10mg/ml), con Ampicilina (100 μ g/ml) y L-Arabinosa 0.2%, incubación a 30°C durante 2 horas, posteriormente añadimos 5ml del cultivo de *E.coli* con el BAC correspondiente y con el plásmido pKD46.
- Este cultivo se incuba a 30°C hasta alcanzar una DO a 600nm de 0,5-0,6 momento en el cual se para el crecimiento mediante la incubación en hielo del cultivo durante 20 min. (A partir de este momento respetar la cadena de frío).
- Las células se centrifugan y lavan dos veces con H₂O estéril y una vez con glicerol al 10%.
- Tras esto se centrifugan nuevamente y se resuspenden en 1 ml de glicerol 10% y se reparten en 4 alícuotas de 200 μ l que se almacenan a -80°C.

Para llevar a cabo la **electrotransformación** de las células que llevan uno de los BACs y el plásmido pKD46 con los sustratos de intercambio alélico, se siguió este protocolo:

- Se mezcla:
 - ➔ 150 μ l BAC Rv092 + 5,27 μ l pKD4 con los extremos de mrx1.
 - ➔ 150 μ l BAC Rv092 + 8,70 μ l pKD4 control negativo.
 - ➔ 150 μ l BAC Rv280 + 4,09 μ l pKD4 con los extremos de mrx2.
 - ➔ 150 μ l BAC Rv280 + 8,70 μ l pKD4 control negativo.
 - ➔ 150 μ l BAC Rv308 + 4,65 μ l pKD4 con los extremos de mrx3.
 - ➔ 150 μ l BAC Rv308 + 8,70 μ l pKD4 control negativo.
- Se pone la mezcla en cubetas de 0,2cm (Bio-Rad) preenfriadas a 4°C.
- Se les da un pulso (2,5kV, 25 μ F, 200 Ω) en un GenePulser XcellTM (Bio-Rad).
- Las células se recogen en 900 μ l de LB y se incuban 1 hora a 30°C para que se lleve a cabo la recombinación y se exprese la resistencia al antibiótico.
- Se siembran en placa las distintas diluciones en placas petri con LB agar y el antibiótico correspondiente.

4.3 Siembra en placa

Tras las 1 hora de incubación a 30°C, se plaquean las células transformadas en medio sólido LB con el antibiótico correspondiente, Kanamicina (50mg/ml) y cloranfenicol (10mg/ml).

En el caso de los **controles** se siembran en placa 100 μ l del inóculo sin diluir.

Como el proceso de recombinación homóloga se produce con una frecuencia muy baja, se siembra en placa todo el volumen, dividiéndose en 2 partes iguales y empleándose cada una de las partes para inocular una placa. También se preparan diluciones 10^{-1} y 10^{-2} del control positivo como de control negativo. Las placas se incuban a 37°C, durante aproximadamente 2 días, hasta que aparecen las colonias de bacterias transformadas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se están realizando muchos estudios a nivel de estrés redox en la clase Actinobacteria, más concretamente en el género *Mycobacterium*, que presenta enfermedades virulentas para el hombre y animales, por ello el reciente descubrimiento de la micorrodoxinas, esta planteando un reto importante para poder conocer mejor los mecanismos de los que se vale la bacteria para sobrevivir, y de alguna manera buscar su punto débil para poder combatirla.

En este estudio hemos trabajado con cepas de *E.coli* DH10 β que contenían los BACs Rv092, Rv280, y Rv308, cada uno de ellos conteniendo un gen de una micorrodoxina de *M. tuberculosis* (Mrx1, Mrx2 ó Mrx3, respectivamente). El trabajo se puede dividir en varios pasos:

1. Comprobación de la presencia de los genes *mrx* en los BACs de *E.coli*, y electrotransformación del plásmido pKD46.
2. Amplificación del gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 con los extremos con los extremos correspondientes a los genes *mrx*, para obtener los sustratos de intercambio alélico.
3. Introducción del sustrato de intercambio alélico en las células competentes que contienen el BAC y el plásmido pKD46.
4. Selección de las bacterias en las que el sustrato de intercambio alélico ha recombinado con el BAC.

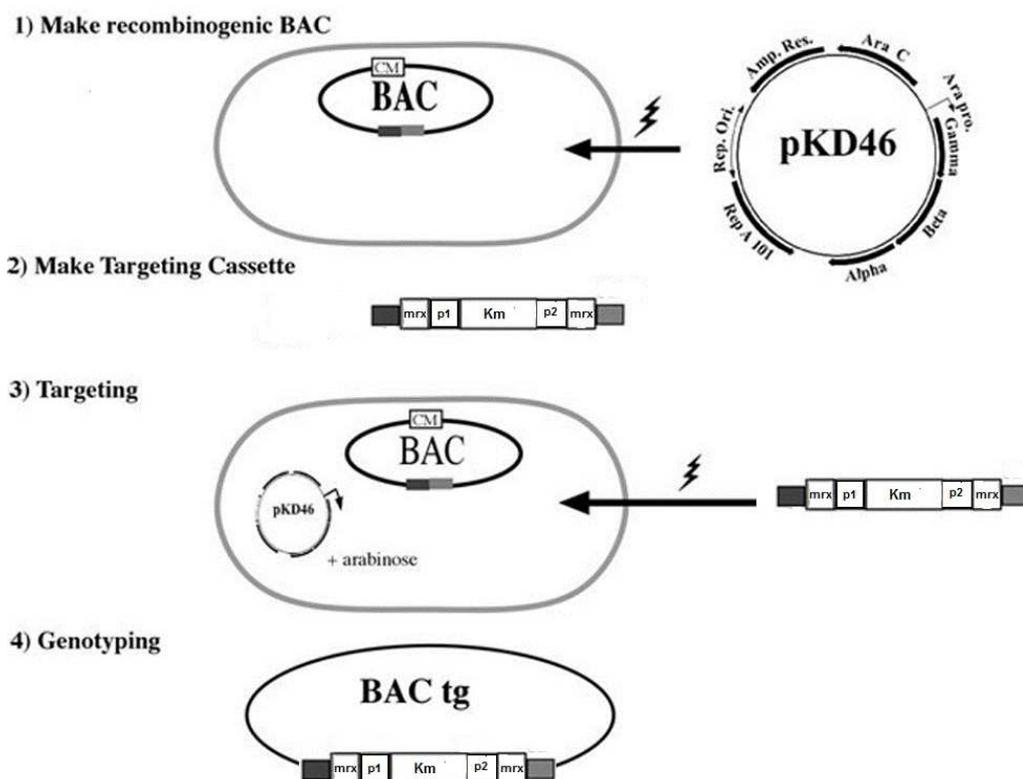


Fig. 10. Descripción general del proceso de recombinação homóloga con los genes *mrx* ubicados en BACs, mediante la utilización de la recombinasa contenida en el plásmido pKD46.

1. Comprobación de la presencia de los genes *mrx* en los BACs de *E.coli*, y electrotransformación del plásmido pKD46

Para poder comprobar la presencia de los genes *mrx* en los BACs, las cepas fueron crecidas en medio líquido LB con cloranfenicol (1mg/ml), incubadas en agitación a 37°C, tras lo cual se extrajo el BAC por mini-prep.

Las secuencias de los tres genes *mrx* de *M. tuberculosis* se obtuvieron de la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>), y se diseñaron los oligonucleótidos mostrados en la Tabla 2. Con cada par de oligonucleótidos, se procedió a amplificar cada uno de los genes *mrx* de *M. tuberculosis*.

Los tamaños que debería obtenerse son los siguientes:

Gen *mrx1* (BAC Rv092) → 470 pb

Gen *mrx2* (BAC Rv280) → 484 pb

Gen *mrx3* (BAC Rv308) → 508 pb

Como se puede observar en el gel obtenido, se cumplía los tamaños, los que nos permitió verificar que los BACs contenían los genes respectivos.

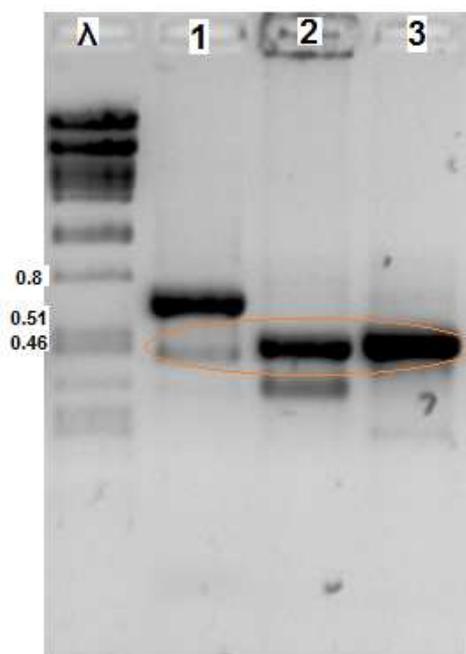


Fig. 11. Resultado de comprobación de los BACs.

1. Rv092 (*Mrx1*) Banda más tenue.
2. Rv280 (*Mrx2*)
3. Rv308 (*Mrx3*)

Como puede observarse en la Figura 11, en el caso de las amplificaciones de los genes *mrx1* y *mrx2*, se obtuvieron dos bandas de amplificación inespecíficas, una banda de mayor tamaño e intensidad que el producto real en el caso de *mrx1*, y una banda de menor tamaño e intensidad en el caso de *mrx2*. No obstante, esto no impidió constatar la presencia de los productos de amplificación reales.

Una vez que hemos comprobado la presencia de los genes *mrx*, se procedió a realizar la electrotransformación del plásmido pKD46 en cada una de las tres cepas.

Las células de *E. coli* una vez transformadas con este plásmido se incubaron a 30°C en la cubeta, y se sembraron en placas de agar LB con Ampicilina (100 µg/ml)+ Cloranfenicol (1mg/ml), la Ampicilina para mantener el plásmido pKD46 y el Cloranfenicol para mantener el BAC.

Al cabo de un día se observó la aparición de colonias pequeñas, que hubo que dejar otro día mas en la estufa a 30°C para que alcanzaran un tamaño adecuado (Figuras 13, 14 y 15). Posiblemente, el pequeño tamaño de las colonias al cabo de 24 horas de incubación puede ser debido a la presión a la que se ven sometidas las bacterias, ante dos antibióticos que inhiben dos procesos importantes en las bacterias como son la síntesis de su pared celular y la síntesis de proteínas.

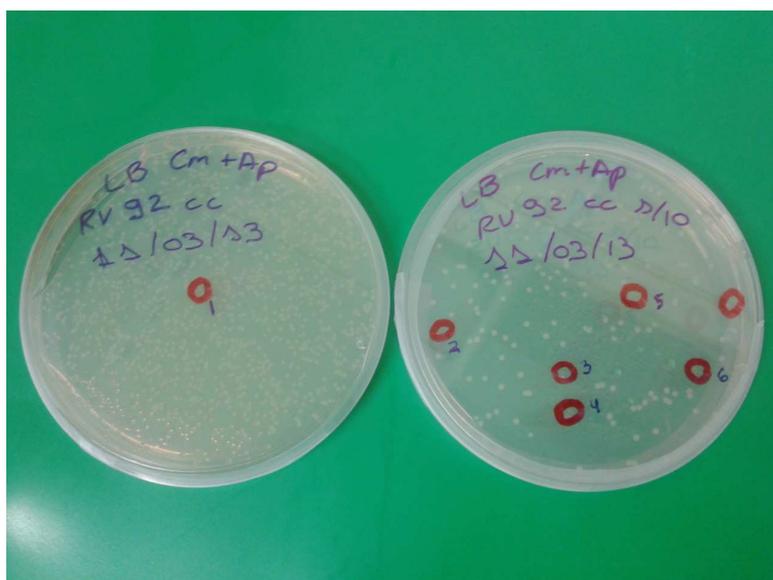


Fig. 12. Colonias de *E.coli* con BAC Rv092 (Mrx1) con pKD46.

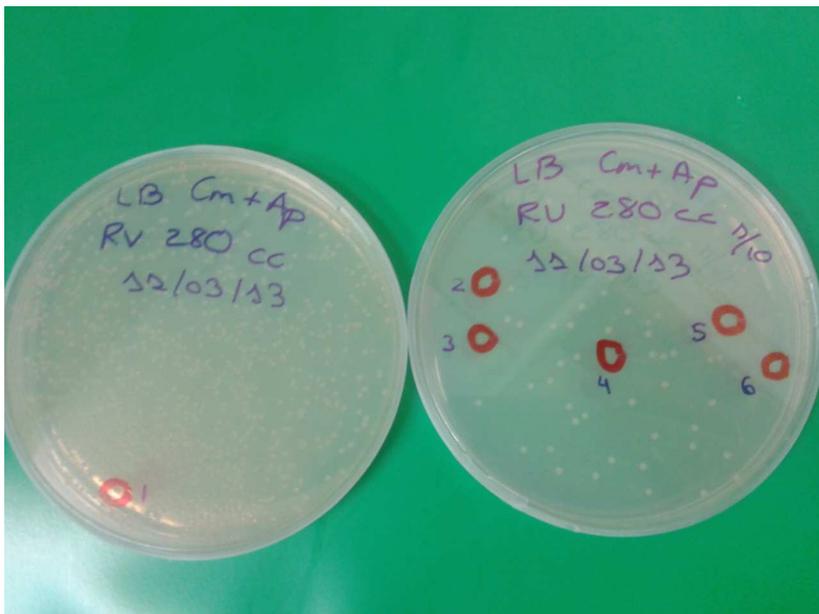


Fig. 13. Colonias *E.coli* con BAC Rv280 (Mrx2) con pKD46.

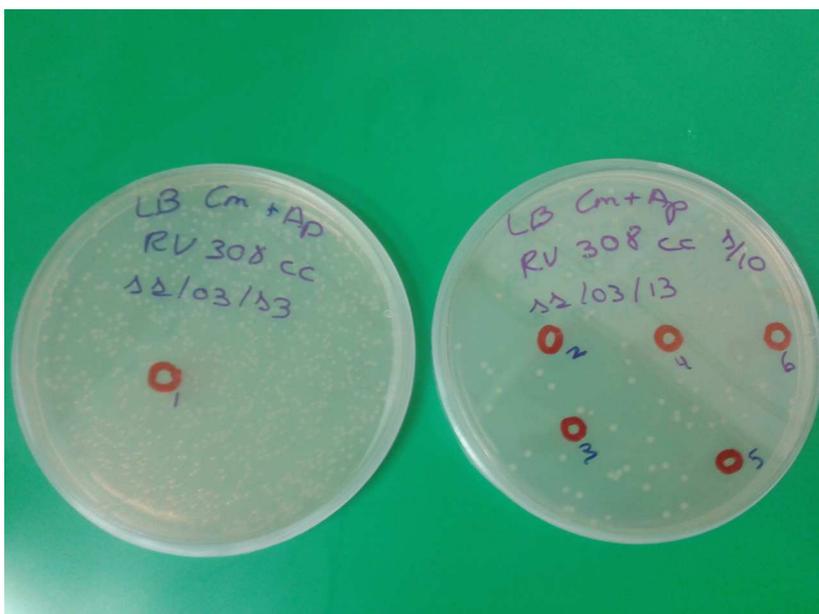


Fig. 14. Colonias de *E.coli* con BAC Rv308 (Mrx3) con pKD46.

A partir de las placas obtenidas en la transformación del plásmido pKD46 (Figuras 13, 14 y 15), se seleccionaron 6 colonias para cada BAC, y se procedió a verificar por PCR la presencia del BAC y del plásmido pKD46.

En primer lugar, para comprobar por PCR la presencia de los BACs, se utilizaron los oligonucleótidos y las condiciones descritas anteriormente (Figura 11), en las colonias que hemos seleccionado. Los resultados de la electroforesis en gel de agarosa al 0.8% se muestran en las siguientes figuras.

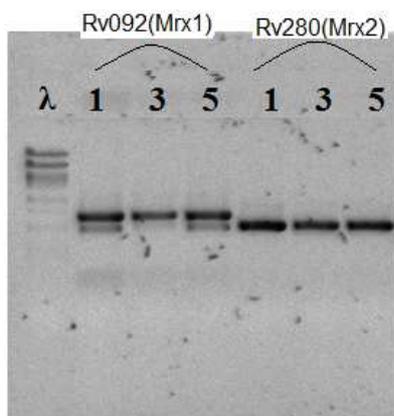


Fig. 15. Comprobación de los BACs en las colonias crecidas en placa LB (Amp+Cm).
Rv092(Mrx1) \Leftrightarrow Los primeros 1,3,5
Rv280(Mrx2) \Leftrightarrow 1,3,5

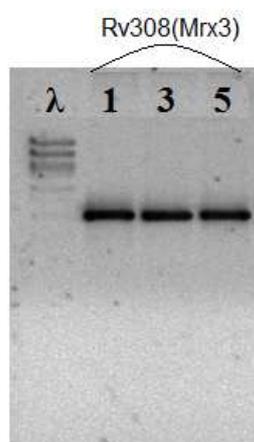


Fig. 16. Comprobación de los BACs en las colonias crecidas en placa LB (Amp+Cm).
Rv308(Mrx3) \Leftrightarrow 1,3,5

Estos datos nos muestran que las colonias que hemos seleccionado, siguen conteniendo el BAC y no lo han perdido ni durante el proceso de electroporación, ni por la transformación del plásmido pKD46.

En segundo lugar, para comprobar la presencia del plásmido pKD46, se utilizaron los oligonucleótidos específicos de este plásmido, que son pKD46-gam-fw (5'-cctgttttcctaatcagccccggc-3') y pKD46-bet-rv (5'-aatgccgtctggcaagagtg-3').

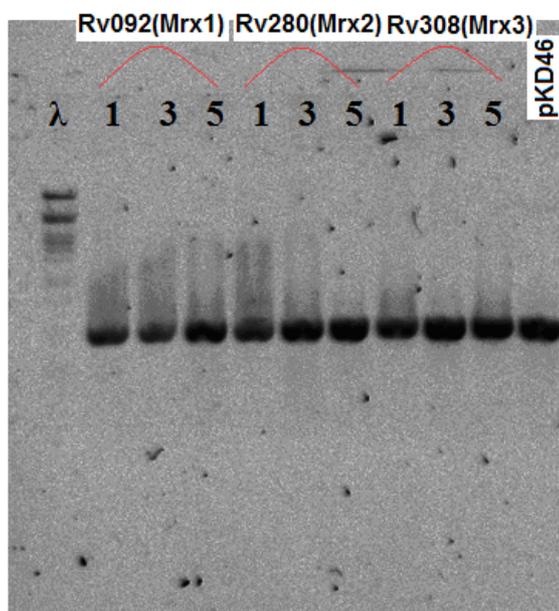


Fig. 17. Comprobación de que esta pKD46 presente en las colonias seleccionadas.

Como se puede observar en la figura 17, en todos los casos se obtuvo un producto de amplificación de 473 pares de bases, indicativo de la presencia del plásmido pKD46 en todas las colonias analizadas.

En conclusión, siendo que todas las colonias analizadas mantenían tanto el plásmido pKD46 como su respectivo BAC, se seleccionó una colonia de cada caso para continuar el trabajo.

2. Amplificación del gen de resistencia a kanamicina a partir del plásmido pKD4 con los extremos con los extremos correspondientes a los genes *mrx*, para obtener los sustratos de intercambio alélico.

El siguiente paso consistió en amplificar el gen de resistencia a kanamicina que contiene el plásmido pKD4 y dotar a los productos de amplificación de extremos con secuencias idénticas a las que flanquean cada uno de los genes *mrx* de *M. tuberculosis*.

Para diseñar estos oligonucleótidos, de nuevo se utilizaron las secuencias de los tres genes *mrx* de *M. tuberculosis* que se obtuvieron de la base de datos Tuberculist (<http://tuberculist.epfl.ch/>). Los oligonucleótidos se muestran en la Tabla 3 (sección Materiales y métodos). Para cada uno de los tres genes *mrx* de *M. tuberculosis*, en el diseño de los oligonucleótidos se siguieron estas pautas:

- 1) se seleccionaron 50 nucleótidos situados inmediatamente delante del codón de inicio de la traducción (para el oligonucleótido directo) y otros 50 nucleótidos situados después del codón de finalización de la traducción (para el oligonucleótido reverso).
- 2) a estas secuencias, se añadieron las secuencias correspondientes de las regiones P1 y P2, añadiéndose la región P1 al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido directo, y la región P2 al extremo 3' de la secuencia del oligonucleótido reverso.

Las regiones P1 y P2 están presentes en el plásmido pKD4, que se va a utilizar como molde en la reacción de amplificación, y se encuentran flanqueando el gen de resistencia a la kanamicina.

Con cada uno de estos tres pares de oligonucleótidos, se amplificó la región P1-gen de resistencia a kanamicina-P2 a partir del plásmido pKD4. Estos productos de PCR contienen en sus extremos 50 nucleótidos correspondientes a cada uno de los tres genes *mrx* de *M. tuberculosis*.

Además, se realizó una amplificación adicional utilizando los oligonucleótidos que contienen solamente la secuencia de las regiones P1 y P2, sobre el mismo plásmido pKD4. En este caso, el producto de PCR contiene únicamente la región P1-gen de resistencia a kanamicina-P2, sin ningún nucleótido adicional en sus extremos. Este producto se utilizará como control negativo en las etapas posteriores de este trabajo.

El resultado de las reacciones de PCR se observa en la siguiente figura:

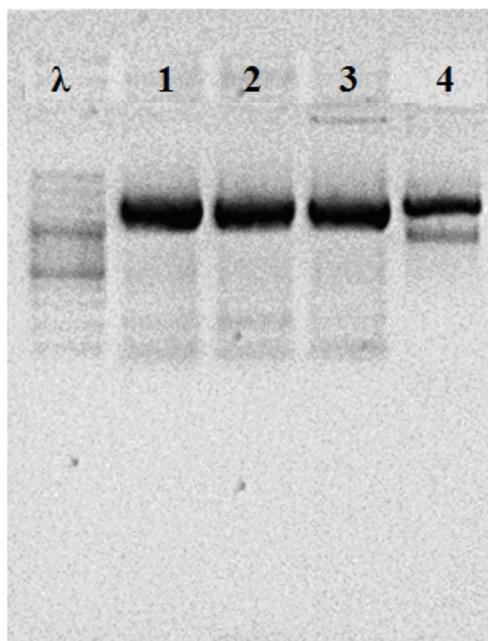


Fig. 18. Comprobación amplificación de fragmento de pKD4, sin purificar.

0. Escalera de 100 pb.
1. pKD4+extremos mrx1
2. pKD4+extremos mrx2
3. pKD4+extremos mrx3
4. pKD4 sin extremos mrx

En todos los casos pudimos verificar que la amplificación del gen de resistencia a kanamicina del plásmido pKD4 se había producido correctamente, porque se obtuvo un producto de 1577 pb.

Los productos de amplificación se purificaron con el High Pure PCR Product Purification Kit (Roche), para ser utilizados en la etapa siguiente de este trabajo.

Estos productos de amplificación serán los que se utilizarán posteriormente para llevar a cabo la recombinación homóloga y así reemplazar los genes *mrx* que están presentes en los BACs por una copia del gen de resistencia a la kanamicina.

3. Introducción del sustrato de intercambio alélico en las células competentes que contienen el BAC y el plásmido pKD46.

Una vez que se habían obtenido los sustratos de intercambio alélico para los tres genes *mrx* a partir del plásmido pKD4 (etapa 2), procedimos a introducir estos sustratos en las tres cepas de *E. coli* que contienen los BACs con los genes *mrx* de *M. tuberculosis* en las que a su vez habíamos introducido el plásmido pKD46, que contiene el gen de la recombinasa inducible por arabinosa (etapa 1).

En primer lugar, cuantificamos la concentración de los productos de PCR, obteniendo estos valores:

Producto PCR	Concentración(ng/ml)	260/280	260/230
pKD4(Mrx1)	94,8	1,85	1,70
pKD4(Mrx2)	122,1	1,82	1,80
pKD4(Mrx3)	107,5	1,80	1,42
pKD4(P1P2)	57,5	1,83	1,75

Tabla 5. Datos obtenidos en el Nanodrop.

Realizamos la electrotransformación de las tres cepas en las que se indujo la expresión de la recombinasa utilizando L-arabinosa. En la transformación se utilizaron un total de 8 µg de DNA de los productos de PCR obtenido sobre el plásmido pKD4. Para cada cepa se hicieron dos electrotransformaciones, utilizando en cada caso un producto diferente, que fueron:

- el producto de amplificación que contiene los extremos idénticos a las regiones que flanquean el gen *mrx* concreto que está presente en el BAC que posee la cepa. En este caso, es de esperar que se produzca la recombinación entre las regiones de 50 nucleótidos que flanquean el producto de PCR y las secuencias presentes en el BAC, dando como resultado neto la sustitución de la región codificante del gen *mrx* en el BAC por la secuencia codificante del gen de resistencia a kanamicina.

Cuando esto suceda, dará lugar a la aparición de colonias resistentes a cloranfenicol y kanamicina.

- b) el producto de amplificación obtenido con los oligonucleóticos P1 y P2, como control negativo de la recombinación. En este caso, no se debería producir la recombinación, ya que no existen secuencias idénticas entre el producto de PCR y el BAC. Sin embargo, es probable que aparezcan algunas colonias resistentes a cloranfenicol y kanamicina (aunque en número menor a las obtenidas en el caso anterior), debidas a fenómenos de recombinación ilegítima.

El resultado de estas electrotransformaciones se muestra en las figuras 19 y 20.



Fig. 19. Placas de LB (Km+Cm), para Rv092 Δ mrx1::Km(pKD4) a la derecha, y a la izquierda la placa con su control negativo.

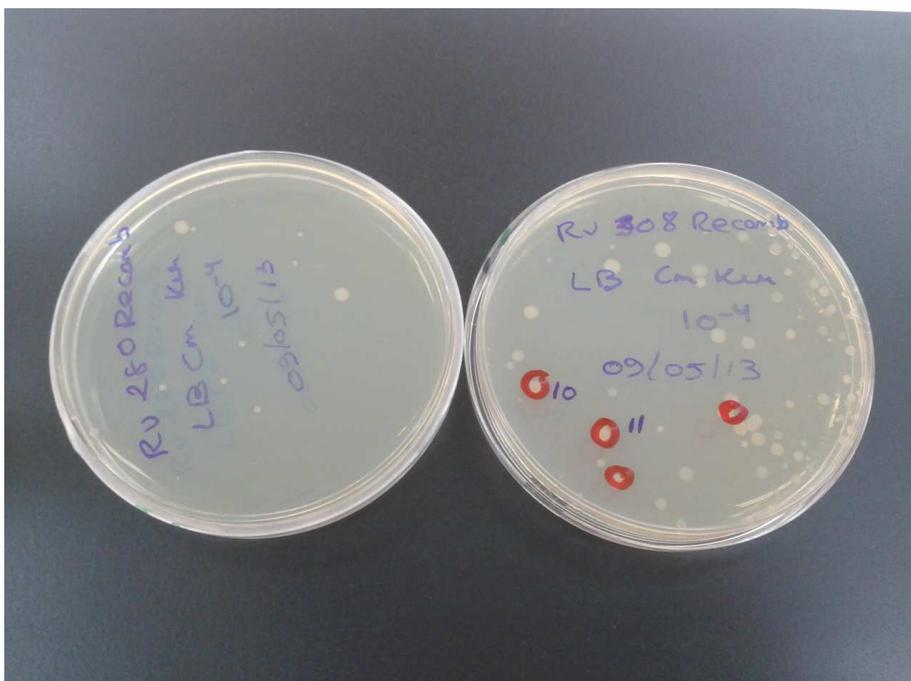


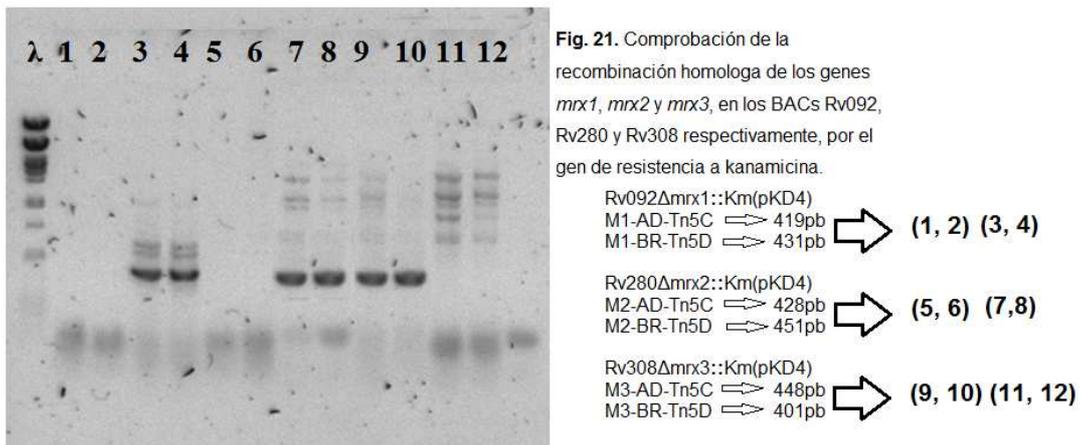
Fig. 20. Placas de LB (Km+Km), para Rv280 Δ mrx2::Km(pKD4) y Rv308 Δ mrx3::Km(pKD4), en esta ocasión se muestran las placas correspondientes a una dilución 10^{-4} , debido al elevado número de colonias que se obtuvieron.

En los resultados en placa en el caso de Rv092 Δ mrx1::Km(pKD4), se observa que el número de colonias que crecen en las placas de la electrotransformación realizada con el producto de PCR que lleva los extremos específicos del gen mrx1 es unas 10 veces superior a las colonias que crece en la placa de control negativo, solo lo pongo imagen en el caso de Rv092 Δ mrx1::Km(pKD4), porque era la que mejor se observaba. Las de Rv280 Δ mrx2::Km(pKD4) y Rv308 Δ mrx3::Km(pKD4), tuve que hacer diluciones para poder observar colonias aisladas.

4. Selección de las bacterias en las que el sustrato de intercambio alélico ha recombinado con el BAC.

La etapa final de este trabajo ha consistido en la caracterización de las bacterias recombinantes obtenidas en la etapa anterior.

Esto se ha llevado a cabo mediante la técnica de PCR en la que los oligonucleótidos utilizados en las etapas anteriores del trabajo se han combinado con oligonucleótidos específicos del gen de resistencia a la kanamicina. De esta forma se ha verificado la sustitución de la secuencia codificante de los genes *mxr1*, *mxr2* y *mxr3*, en los BACs Rv092, Rv280 y Rv308 respectivamente, por el gen de resistencia a kanamicina.



Como observamos en la imagen, cada dos bandas es una colonia, amplificada con ambos juegos de oligos, se identifican claramente 3 colonias que amplificaron la resistencia a kanamicina, en el lugar donde debería estar el BAC de *E.coli*.

Así que podemos concluir que por los menos 3 colonias de las seleccionadas llevaron acabo la recombinación homóloga, siendo delecionado el gen *mxr* y sustituido por la resistencia a kanamicina.

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Las micorrodoxinas forman parte de un mecanismo fundamental para la supervivencia del bacilo, ya que le proporciona una regulación, que le permite luchar en condiciones de estrés oxidativo, que es lo que se encuentra durante la infección.

Pero como todo mecanismo esta compuesto de muchos más componentes, del que las micorrodoxinas forman parte pero aun se desconoce el papel que juegan todas las micorrodoxinas, ya que por ahora se ha estudiado a fondo Mrx1 que parece ser muy importante en estrés redox, pero Mrx2, aun esta por determinar si realmente actúa como una micorrodoxina o que papel tiene, y parece que incluso hay indicios de que puede ser un gen esencial para la célula, lo que complicaría, el bloquearlo en micobacterias, porque la bacteria no seria capaz de crecer.

En el Mrx3 se sabe que esta, pero también quedan muchos estudios por realizar, porque se desconoce en que parte actúa esta micorrodoxina, si esta dentro del mecanismo que hemos explicado, o actúa de manera independiente.

En este trabajo hemos construido tres BACs recombinantes, en los que hemos sustituido respectivamente uno de los tres genes *mrx* que codifican micorrodoxinas de *M. tuberculosis*, por un gen de resistencia a kanamicina. La etapa siguiente consistirá en amplificar estas regiones y trasladarlas directamente a *Mycobacterium tuberculosis*, con el objetivo de conseguir tres mutantes defectivos, cada uno de ellos, en uno de los genes que codifican micorrodoxinas. Una vez que se consigan estos mutantes, se estudiará su fenotipo, en concreto su capacidad de respuesta frente al estrés oxidativo, y su capacidad para sobrevivir en el interior de células eucariotas. Con todo esto, se evaluará su posible utilidad como dianas para nuevos fármacos.

En el caso de que alguno de estos genes pudiera ser esencial, como parece ser el caso de *mrx2*, está prevista una estrategia de análisis genético basada en la expresión condicional de los genes clonados en plásmido con promotores inducibles, que pueda verificar, en caso de que así sea, el carácter esencial de alguno de ellos.

Queda aun mucho camino por recorrer en el estudio del mecanismo contra el estrés oxidativo que utilizan las micobacterias, porque seguramente hay componentes que desconocemos y que puede dar un vuelco a todo que tenemos estudiado hasta ahora.

Aunque esto sin duda abre un abanico para la creación de posibles fármacos diana, porque como se ha mencionado anteriormente, la biosíntesis de MSH es única en Actinobacterias, y al estar ausente en humanos, es una vía que se podría usar para diseñar nuevas estrategias de control de esta enfermedad.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- [1] Tortora, G., Funke, B., Case, C., *Introducción a la Microbiología*. 2007
- [2] WHO. Global tuberculosis control 2012. *Epidemiology, Strategy, Financing*. World Health Organization. 2012.
- [3] Bhat, S.A., et al., *The mechanism of redox sensing in Mycobacterium tuberculosis*. Free Radic Biol Med. 2012 Oct 15;53(8):1625-41.
- [4] Ordoñez, E., et al., *Arsenate Reductase, Mycothiol, and Mycoredoxin Concert Thiol/Disulfide Exchange*. J Biol Chem. 2009 May 29; 284(22): 15107–15116.
- [5] Trivedi, A., et al., *Redox biology of tuberculosis pathogenesis*. Adv Microb Physiol. 2012;60:263-324.
- [6] Mateos, L.M., *El arsénico, ese conocido tan desconocido*. Ambiociencias–Revista de divulgación científica, Facultad de ciencias Biológicas y Ambientales, Universidad de León, 2010.
- [7] Van Laer, K., et al., *NrdH-redoxin of Mycobacterium tuberculosis and Corynebacterium glutamicum dimerizes at high protein concentration and exclusively receives electrons from thioredoxin reductase*. J Biol Chem. 2013 Mar 15;288(11):7942-55.
- [8] Van Laer, K., et al., *Mycoredoxin-1 is one of the missing links in the oxidative stress defence mechanism of Mycobacteria*. Mol Microbiol. 2012 Sep 13.
- [9] Den Hengst, C. D., et al., *Redox control in actinobacteria*. Biochimica et Biophysica Acta 1780 (2008) 1201–1216.
- [10] Brosch, R., et al., *Use of a Mycobacterium tuberculosis H37Rv bacterial artificial chromosome library for genome mapping, sequencing, and comparative genomics*. Infect Immun. 1998 May;66(5):2221-9.
- [11] Antelmann, H., et al., *Bacterial mechanisms of reversible protein S-thiolation: structural and mechanistic insights into mycoredoxins*. Mol Microbiol. 2012 Sep 24.
- [12] Villadangos, A.F., et al., *Corynebacterium glutamicum survives arsenic stress with arsenate reductases coupled to two distinct redox mechanisms*. Mol Microbiol. 2011 Nov;82(4):998-1014.

- [13] Lévy-Frébault V.V., et al., *Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species*. Int J Syst Bacteriol. 1992 Apr;42(2):315-23.
- [14] Wu, B., et al., *Novel Channel Enzyme Fusion Proteins Confer Arsenate Resistance*. J Biol Chem. 2010 December 17; 285(51): 40081–40087.
- [15] Datsenko, K.A., et al., *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products*. Proc Natl Acad Sci U S A. 2000 Jun 6;97(12):6640-5.
- [16] Hollenback, S. M., et al., *Recombineering based procedure for creating BAC transgene constructs for animals and cell lines*. Curr Protoc Mol Biol. 2011 Jul;Chapter 23:Unit 23.14.
- [17] Birnboim, H.C. and J. Doly, *A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA*. Nucleic Acids Res, 1979. 7(6): p. 1513-23.
- [18] Fahey, R.C. *Glutathione analogs in prokaryotes*. Biochim Biophys Acta. 2013 May; 1830(5):3182-98.
- [19] Barry, C.E. 3rd., et al., *Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions*. Prog Lipid Res. 1998 Jul-Aug;37(2-3):143-79.
- [20] Doublet, B., et al., *Antibiotic marker modifications of lambda Red and FLP helper plasmids, pKD46 and pCP20, for inactivation of chromosomal genes using PCR products in multidrug-resistant strains*. J Microbiol Methods. 2008 Oct;75(2):359-61.