



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Clonación y expresión en *Escherichia coli*
del gen *ctpE* (*Rv0908*) de
Mycobacterium tuberculosis: determinación
preliminar de su posible actividad
 Na^+ ATPasa**

Jenifer Cuesta Bernal

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2012

Clonación y expresión en *Escherichia coli* del gen *ctpE* (Rv0908) de *Mycobacterium tuberculosis*: determinación preliminar de su posible actividad Na⁺ ATPasa

Jenifer Cuesta Bernal
Química, Universidad Nacional de Colombia

**Tesis de Maestría presentada como requisito parcial para optar al título de
Magíster en Ciencias - Bioquímica**

Director: Carlos Yesid Soto Ospina
Ph.D., Profesor Asociado, Departamento de Química, Facultad de Ciencias,
Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá.

Codirector: Rafael Santiago Castaño Valencia
Ph.D., Profesor Grupo de Investigación Biomédica, Universidad ICESI

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias
Departamento de Química
Bogotá, Colombia

2012

*Dedico este trabajo a la memoria del
Profesor Luis Ramón Osses Basaure,
un excelente maestro y una gran
persona*

“Todo va a estar bien”

Agradecimientos

A Dios, gracias a Él todo es posible

A mis papás, Martha y Cesar, y mis hermanos Jessica y Diego, por su constante apoyo y acompañamiento, porque como nadie conocen el esfuerzo y las luchas detrás de la investigación.

A Miyer, mi mejor amigo, confidente, compañero y colega, porque siempre está ahí. Gracias por compartir conmigo los sueños, los triunfos, el trabajo duro, el cansancio, las tristezas y alegrías.

A la Universidad Nacional de Colombia, en donde he recibido una excelente formación para mi crecimiento como profesional e investigadora.

A la Vicerrectoría Académica de la Universidad Nacional de Colombia y el Programa de Beca Estudiante Sobresaliente de Posgrado, por el financiamiento recibido durante mis estudios de Maestría.

A la Dirección de Investigación Sede Bogotá DIB y la Dirección de Bienestar de la Facultad de Ciencias, por el apoyo económico brindado para llevar a cabo una pasantía de investigación en el Instituto Max Planck de Biofísica (Frankfurt, Alemania).

Al Profesor Carlos Yesid Soto y el Grupo de Bioquímica y Biología Molecular de Micobacterias por abrir sus puertas y permitirme ser parte de este proyecto.

Al Profesor Santiago Castaño (Universidad ICESI- Universidad del Valle) por su guía y motivación en el desarrollo del proyecto.

Al Profesor Klaus Fendler del Instituto Max Planck de Biofísica (Frankfurt, Alemania), porque sin conocerme, me dió la gran oportunidad de ser parte de su grupo. Una magnífica experiencia para mi formación personal y profesional.

Agradecimiento especial a Lina Hatahet, Javier Carrera Casanova y Hao Xie por su inmensa e invaluable ayuda, tiempo, dedicación y acertados consejos.

A Octavian Calinescu, Thomas Mager, Slavoj Kresak, Steffan Geys, Christian Janke y los demás integrantes del grupo de Biofísica Química en el Instituto Max Planck, por todas las discusiones que aportaron al desarrollo de este trabajo.

A la Profesora Maria Helena Ramirez y el Laboratorio de Investigaciones Básicas en Bioquímica (LIBBIQ), especialmente a Luis Contreras, Lina Sánchez y Leidy Rojas por su constante ayuda.

Al Profesor Pedro de Brito y el Laboratorio de Microbiología Ambiental por su constante colaboración.

Todos los Profesores del Área de Bioquímica, porque sus enseñanzas me han dado las mejores herramientas para desarrollar este trabajo.

A Camilo, Ana Silvia y Maria Camila, una mano amiga en tierras extranjeras.

A Helberth, Carolina, Silverio, Flavio y el Profesor Leonardo Fierro, por su amable recibimiento y consejos durante el entrenamiento en bicapas lipídicas artificiales en la Universidad del Valle (Cali, Colombia).

Contenido

	Pág.
Resumen.....	12
1. Justificación	15
2. Marco Teórico.....	17
3. Hipótesis Experimental.....	38
4. Objetivos.....	39
5. Materiales y Métodos	40
6. Resultados y Discusión	56
7. Conclusiones.....	93
8. Perspectivas	94
Anexo A	95
Anexo B	99
Anexo C.....	105
Referencias	106

Lista de figuras

	Pág.
Figura 2-1: Envoltura celular de las micobacterias.....	19
Figura 2-2: Etapas de la infección de <i>M. tuberculosis</i>	21
Figura 2-3: Esquema del granuloma clásico y respuesta inmune propuesta para la infección por <i>M. tuberculosis</i>	22
Figura 2-4: Esquema del alineamiento de las 12 secuencias protéicas de las ATPasas tipo P de <i>M. tuberculosis</i> transportadoras de iones metálicos	24
Figura 2-5: Dominios conservados para las ATPasas tipo P.....	27
Figura 2- 6: Ciclo de Post- Albers para las ATPasas tipo P.....	29
Figura 2-7: Ciclo catalítico propuesto para la Na ⁺ ATPasa.....	32
Figura 2-8: Circuito RC de la membrana plasmática.....	35
Figura 2-9: Esquema general de la generación de corriente por las bombas electrogénicas.....	36
Figura 2-10: Esquema de la adsorción de proteoliposomas y fragmentos de membrana sobre SSM.....	37
Figura 5-1: Esquema de una vesícula de membrana que es adsorbida sobre una membrana soportada en sólido (SSM)	51
Figura 5-2: Esquema del protocolo de intercambio de soluciones activadora (A) y no activadora (NA) en un experimento típico de SSM.....	52
Figura 5-3: Configuración general del sistema SSM.....	52
Figura 5-4: Interior de la cámara faradámica del sistema SSM.....	53
Figura 5-5: Chip sensor que contiene el electrodo de oro sobre el cual se ensambla la SSM.....	53
Figura 5-6: Cubetas utilizadas como soporte para el chip sensor con la SSM.....	54

Figura 6-1: Predicciones bioinformáticas de la topología y perfil de hidrofobicidad de CtpE.....	57
Figura 6-2: Detección de la actividad ATPasa estimulada por Na ⁺ (40 mM) y en ausencia de K ⁺ sobre las vesículas de membrana de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....	58
Figura 6-3: Amplificación por PCR del gen <i>ctpE</i> (<i>Rv0908</i>) a partir de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....	59
Figura 6-4: Mapa de los posibles recombinantes de clonación pGEMT easy- CtpE.....	60
Figura 6-5: Tamizaje de colonias mediante PCR y mapeo de restricción para la identificación de los posibles clones pGEMT easy – CtpE.....	60
Figura 6-6: Mapa de los posibles recombinantes de expresión pET19b- CtpE.....	61
Figura 6-7: PCR en colonia para los posibles clones pET 19b-CtpE.....	62
Figura 6-8: Amplificación por PCR del gen <i>ctpE</i> (<i>Rv0908</i>) a partir de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....	64
Figura 6-9: Mapa de los posibles recombinantes pJET 1.2- CtpE(A) y pJET 1.2- CtpE(B)-	65
Figura 6-10: Análisis de restricción para 5 posibles clones de pJET 1.2 –CtpE.....	65
Figura 6-11: Mapeo de restricción del recombinante pJET 1.2 – CtpE.....	66
Figura 6-12: Amplificación por PCR del gen <i>ctpE</i> a partir DNA plasmídico del recombinante pJET 1.2 –CtpE.....	67
Figura 6-13: Digestión doble del vector pBAD A2 y el fragmento <i>ctpE</i> con las enzimas de restricción <i>Bgl</i> II y <i>Eco</i> RI.....	68
Figura 6-14: Análisis de restricción para 4 posibles clones de pBADA2 –CtpE.....	69
Figura 6-15: Mapeo de restricción del recombinante pBADA2 – CtpE.....	69
Figura 6-16: Mapa del recombinante de expresión pBAD A2- CtpE.....	70
Figura 6-17: Regulación del promotor araBAD por L-arabinosa.....	71
Figura 6-18: Placas de LB- agar-antibiótico mostrando colonias de <i>E. coli</i> transformadas con el recombinante pBAD A2 CtpE y el vector pRARE.....	73

Figura 6-19: Comparación de la expresión de la proteína recombinante CtpE entre las cepas de <i>E. coli</i> TOP10 y Rosetta 2.....	74
Figura 6-20: Cinética de crecimiento luego de la inducción de las 3 cepas recombinantes de <i>E. coli</i>	75
Figura 6-21: Reacción de la hidrólisis enzimática del BCPI por fosfatasa alcalina y reducción de NBT para la producción de compuestos coloreados empleados en la inmunodetección por western blot.	76
Figura 6-22: Detección de la expresión de la proteína recombinante CtpE en la cepa de <i>E. coli</i> TOP10 pBADA2 CtpE por western blot.....	77
Figura 6-23: Dot blot de las fracciones celulares separadas por centrifugación y ultracentrifugación para determinar la localización celular de la proteína CtpE expresada en <i>E.coli</i>	81
Figura 6-24: Reacción de fosfato inorgánico (Pi) con molibdato de amonio y formación de los complejos coloreados con verde malquita.....	84
Figura 6-25: Ensayo de actividad ATPasa en vesículas de membrana de <i>E. coli</i> expresando la proteína CtpE de <i>M. tuberculosis</i>	85
Figura 6-26: Efecto del inhibidor vanadato sobre la actividad ATPasa medida sobre vesículas de membrana de <i>E. coli</i> expresando la proteína CtpE de <i>M. tuberculosis</i>	87
Figura 6-27: Señales eléctricas obtenidas mediante la técnica de SSM para las vesículas de membrana de <i>E. coli</i> expresando la proteína CtpE.....	89

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 2-1: Clasificación de la familia de ATPasas tipo P en 5 grupos (Tipo I –Tipo V).....	26
Tabla 5-1: Descripción de las cepas de <i>E. coli</i> empleadas en el presente estudio.....	40
Tabla 5-2: Iniciadores diseñados para amplificar el gen <i>ctpE</i> a partir de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv (Primera estrategia).....	41
Tabla 5-3: Iniciadores diseñados para amplificar el gen <i>ctpE</i> a partir de DNA genómico de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra (Segunda estrategia) y DNA plasmídico de pJET1.2- CtpE.....	42
Tabla 5-4: Iniciadores diseñados para la secuenciación de los recombinantes pJET 1.2 CtpE y pBADA2- CtpE.....	45
Tabla 5-5: Composición de las soluciones preparadas para las medidas electrofisiológicas en vesículas de membrana de <i>E. coli</i> TOP10 CtpE adsorbidas a la SSM	55
Tabla 6-1: Resultados de la optimización de la temperatura de inducción para la expresión de la proteína recombinante CtpE en las cepas de <i>E. coli</i>	79
Tabla 6-2: Resultados de la optimización de la concentración de inductor en la expresión de la proteína recombinante CtpE en la cepa de <i>E. coli</i> TOP 10 pBADA2 CtpE.....	80
Tabla 6-3: Experimentos de solubilización a pequeña escala de la proteína recombinante CtpE	82

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosina trifosfato
BLM	Bicapas lipídicas planares
BSA	Albúmina de suero bovino
Car	Carbenicilina
Cam	Cloranfenicol
CL	Cardiolipina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
EMB	Etambutol
INH	Isoniazida
INS	Instituto Nacional de Salud
IPTG	Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido
LB	Medio de cultivo Luria Bertani
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
MCS	Sitio múltiple de clonación
MDR-TB	Cepas multidrogorresistentes de <i>M. tuberculosis</i>
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PE	Fosfatidiletanolamina
PG	Fosfatidilglicerol
Pi	Fosfato inorgánico

PI	Fosfatidilinositol
PIM	Fosfatidilinositol manosidos
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PZA	Pirazinamida
RMP	Rifampicina
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SERCA	Ca ²⁺ ATPasa de retículo sarcoplásmico
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia adquirida
SSM	Membranas soportadas en sólido
TAE	Buffer Tris- acetato EDTA
TB	Tuberculosis
TBS	Tris buffer salino
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR-TB	Cepas extremadamente resistentes de <i>M. tuberculosis</i>

Resumen

La tuberculosis es uno de los desafíos más importantes para la salud pública en el mundo. Actualmente hay una prevalencia de 2 billones de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis*, lo que representa el 30% de la población mundial. En la actualidad, entre los blancos terapéuticos de mayor interés para el control de patógenos intracelulares se encuentran las proteínas de membrana plasmática encargadas del transporte iónico: ATPasas, transportadores ABC y sistemas antiporter ion/H⁺ (Novoa *et. al.* 2012). De hecho, la regulación de la concentración de iones metálicos es central en la fisiología de la interacción hospedero- patógeno y ambos han desarrollado mecanismos sofisticados para el transporte de iones hacia el interior o el exterior celular dependiendo de sus necesidades (Soldati y Neyrolles, 2012).

Estudios genómicos de *M. tuberculosis* evidenciaron que existen 28 secuencias que codifican para transportadores putativos de iones metálicos, entre ellos 12 ATPasas tipo P (Novoa *et. al.*, 2012; Agranoff y Krishna, 2004, 1998). Este gran número de ATPasas (el mayor número reportado para una bacteria), puede dar la versatilidad requerida al bacilo para adaptarse a las condiciones intra- y extracelulares durante las diferentes etapas de la infección, las cuales difieren marcadamente en osmolaridad, concentraciones de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes.

Estudios bioinformáticos, permitieron clasificar a las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV como transportadores de metales pesados (Cu²⁺, Cu⁺, Cu⁺/Cu²⁺, Zn²⁺ y Co²⁺/Ni²⁺); a CtpE, CtpF, CtpH y CtpI como transportadores de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺ y Mg²⁺); y a KdpB, como una proteína que tiene alta identidad con la subunidad β de una ATPasa multimérica transportadora de K⁺ de *E. coli* (Novoa *et. al.* 2012). Sin embargo, la especificidad de sustrato para estas ATPasas solo ha sido establecida experimentalmente para tres de ellas. A partir de la creación de mutantes se ha logrado establecer que CtpD es una Co²⁺/Ni²⁺ - ATPasa (Raimunda *et. al.* 2012) y que CtpV y CtpC son ATPasas transportadoras de Cu²⁺ y Zn²⁺, respectivamente. (Ward S. *et.al.* 2010 y Botella H. *et.al.* 2011).

En nuestro grupo de investigación con anterioridad estableció la actividad ATPasa dependiente de Na⁺ en la membrana plasmática de *M. tuberculosis*. Dicha actividad se asoció a la presencia de una Na⁺ ATPasa tipo P, pues es inhibida por vanadato, un reconocido inhibidor de este tipo de bombas (Cuesta, 2010). Los estudios bioinformáticos también identificaron en el genoma del bacilo, al gen *ctpE* (Rv0908) de *M. tuberculosis* como posible codificante de una Na⁺ ATPasa tipo P.

El presente trabajo busca establecer la especificidad iónica de la proteína codificada por el gen *ctpE* de *M. tuberculosis*. Específicamente, se logró la clonación del gen en el vector de expresión pBADA2 y la expresión heteróloga en células de *E. coli* del producto génico CtpE. También, los resultados de algunos ensayos bioquímicos y medidas electrofisiológicas, realizados en vesículas de membrana de *E. coli*, sugieren que la proteína CtpE corresponde a un transportador de Na⁺ y/o K⁺.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas tipo P

Abstract

Tuberculosis is one of the most important challenges for global public health. Currently, there is a prevalence of 2 billion people infected with *Mycobacterium tuberculosis*, which represents 30% of world's population. Among the new therapeutic targets of highest interest to control intracellular pathogens, there are plasma membrane proteins involved in ionic transport: ATPases, ABC transporters and antiporter systems ion/H⁺ (Novoa *et. al.* 2012). In fact, the regulation of metallic ions concentration plays an important role in the physiology of host- pathogen interaction and both have developed sophisticated mechanisms for ion transport to the intra- or extracellular space according to their needs. (Soldati and Neyrolles, 2012).

Different studies have shown that *M. tuberculosis* genome possess 28 sequences that codify putative transporters of metallic ions, including 12 P type ATPases (Novoa *et. al.*, 2012; Agranoff and Krishna, 2004, 1998). This is the highest number reported for any bacteria, and might give the bacillum versatility to survive to different confitions during the infection, which differ in osmolarity, metallic ion concentration, pH and nutrient availability.

Bioinformatic studies allowed to classify P type ATPases of *M. tuberculosis* CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ and CtpV as heavy metal transporters (Cu²⁺, Cu⁺, Cu⁺/ Cu²⁺, Zn²⁺ and Co²⁺/Ni²⁺); CtpE, CtpF, CtpH and CtpI as alkaline and alkaline earth metal transporters (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, H⁺ and Mg²⁺); and KdpB, as a protein with high identity with β subunit of a multimeric ATPase transporter of K⁺ in *E. coli* (Novoa *et. al.* 2012). However, ion specificity has only been achieved for three of them. From mutagenesis studies it has been possible to establish that CtpD is a Co²⁺/Ni²⁺ - ATPase (Raimunda *et. al.* 2012) while CtpV and CtpC are transporters of Cu²⁺ and Zn²⁺, respectively. (Ward S. *et.al.* 2010 and Botella H. *et.al.* 2011).

Within our research group it has been established the ATPase activity stimulated by Na⁺ in the plasma membrane of *M. tuberculosis*. This activity was associated to the presence of

a Na⁺ type P ATPase, due to it is inhibited by vanadate, a recognized inhibitor of this kind of pumps (Cuesta, 2010). Bioinformatic studies also identified the gene *ctpE* (*Rv0908*) in *M. tuberculosis* genome as the codifying gene of a Na⁺ type P ATPase.

The objective of this work is to establish the ion specificity of the protein codified by the gene *ctpE* of *M. tuberculosis*. Specifically, cloning the gene in the expression vector pBADA2 and heterologous expression of CtpE in *E. coli* was achieved. The obtained results from biochemical assays and electrophysiological measurements made on membrane vesicles of *E. coli*, suggest that the protein CtpE corresponds to a Na⁺ and/or K⁺ transporter.

Key words *Mycobacterium tuberculosis*, type P ATPases

1. Justificación

La TB es una enfermedad infecciosa causada por *M. tuberculosis*, una bacteria altamente patogénica. De acuerdo con el reporte más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS), en el año 2011 se presentaron cerca de 8,3 -9,0 millones de nuevos casos de esta enfermedad en todo el mundo (WHO,2012). En Colombia, según informes del Ministerio de Salud y Protección Social y del Instituto Nacional de Salud (INS), en el año 2011, se registraron 10731 nuevos casos, siendo las regiones más afectadas: Orinoquía, Amazonía y los departamentos de Chocó, Quindío y Guajira (MINSALUD, 2012; INS, 2009).

En la mayoría de casos, la bacteria y el hospedero establecen un equilibrio, y los individuos infectados pueden permanecer asintomáticos por varias décadas. Actualmente, existe una prevalencia en todo el mundo de 2 billones de personas infectadas con *M. tuberculosis*, de los que un 10% desarrollaran TB debido al debilitamiento de su sistema inmune por causas diversas como la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), malnutrición o edad avanzada (Sundaramurthy y Pieters, 2007; Loughheed *et. al.*, 2009).

Aunque se ha progresado en el entendimiento de la base de la infección, la interacción de la bacteria con los macrófagos, la respuesta inmune del hospedero y el paso al estado de persistencia, aún existen muchas preguntas acerca de la biología del bacilo tuberculoso. Por ejemplo, el conocimiento de los requerimientos nutricionales de la micobacteria ha sido ampliamente estudiado; sin embargo, aun no se ha establecido la identidad de los transportadores de dichos compuestos esenciales (Niederwies, 2008).

Estudios bioinformáticos del genoma de *M. tuberculosis* evidenciaron que existen 28 secuencias que codifican para transportadores putativos de iones metálicos, entre ellos 12 ATPasas tipo P (CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI, CtpJ, CtpV y KdpB), las cuales han sido poco caracterizadas experimentalmente (Novoa *et. al.*, 2012; Agranoff y Krishna, 2004, 1998). Algunos de estos marcos de lectura también son codificados en *M. leprae* sugiriendo que tienen un rol a nivel intracelular, ya que este microorganismo únicamente sobrevive en el interior de las células hospederas.

Este gran número de ATPasas (el mayor número reportado para una bacteria), puede dar la versatilidad requerida al bacilo para adaptarse a las condiciones intra- y extracelulares durante las diferentes etapas de la infección, las cuales difieren marcadamente en osmolaridad, concentraciones de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes.

En este sentido, las ATPasas tipo P transportadoras de cationes Na^+ , Ca^{2+} , K^+ , H^+ , Cu^{2+} y Zn^{2+} juegan un rol importante en el control de la homeostasis celular y el transporte secundario de metabolitos. Varias de estas ATPasas se han implicado en la supervivencia de *M. tuberculosis* y otros patógenos intracelulares en el fagosoma. De hecho, la expresión de algunas de estas bombas es inducida cuando el bacilo infecta células humanas (Botella *et. al.* 2012). Por otro lado, estudios llevados a cabo en nuestro grupo de investigación, han evidenciado no solo la presencia de una actividad Na^+/K^+ ATPasa, en la membrana plasmática de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, sino también su importancia al someter a ambas micobacterias a condiciones de estrés metabólico como hipoxia e inanición (resultados no publicados).

Los estudios recientes sugieren que la familia de ATPasas tipo P juega un rol importante en la patogénesis de *M. tuberculosis* y por tanto, sería de gran interés identificar el sustrato transportado por cada miembro *Ctp* y establecer su contribución (y posible redundancia) a la resistencia de la bacteria (Botella *et. al.* 2012). Entre las bombas transportadoras de metales alcalinos y alcalinoterreos se ha propuesto a *CtpF*, *CtpH* y *CtpE* como una Na^+/K^+ , Ca^{2+} y Na^+ ATPasa, respectivamente (Novoa *et. al.*, 2012).

En la actualidad, el transporte de Na^+ mediado por ATPasas tipo P en *M. tuberculosis* es completamente desconocido. Para otros organismos, no se ha reportado una actividad transportadora de Na^+ mediada simultáneamente por Na^+ y Na^+/K^+ ATPasas, como ocurriría para *M. tuberculosis*. La existencia de un mecanismo alternativo que ayude a mantener la concentración intracelular de Na^+ (además de una Na^+/K^+ ATPasa) podría tener un impacto significativo en procesos metabólicos esenciales y la señalización fisiológica de la micobacteria (Rocafull *et. al.* 2012, Agranoff y Krishna, 2004, 1998, Yatime *et. al.* 2009).

2. Marco Teórico

2.1 Generalidades acerca de las micobacterias

El género *Mycobacterium* está compuesto por cerca de 100 especies de bacterias que en su gran mayoría son ambientales y no patógenas. Sin embargo, algunas especies como *M. tuberculosis*, *M. leprae* y *M. ulcerans*, corresponden a patógenos humanos causantes de tuberculosis (TB), lepra y úlceras de buruli, respectivamente. Su éxito como patógenos recae en la capacidad de residir y proliferar en los macrófagos del hospedero estableciendo así enfermedades a largo término (Cosma, 2003).

Este género está conformado por bacilos aerobios, inmóviles y no esporulados con un tamaño de 0,2-0,6 x 1-10 µm. Son muy exigentes nutricionalmente, algunos bacilos son de crecimiento lento y otros de crecimiento rápido. La pared celular es rica en lípidos y es precisamente esta superficie hidrofóbica la que le confiere a las micobacterias resistencia frente a muchos desinfectantes, antibióticos y tinciones habituales de laboratorio; de hecho al ser teñidos, los bacilos no se pueden decolorar con soluciones ácidas y por esta razón son conocidos como ácido alcohol resistentes. El método de tinción más empleado para identificar bacterias de este género es Ziehl-Neelsen (Cosma, 2003; Tomashefski y Farver, 2008). Además de su capacidad ácido-alcohol resistentes, también comparten otras características como: la presencia de ácidos micólicos con 60-90 átomos de carbono en su pared celular y un elevado contenido de guanosina+citosina (61-71%) en su DNA (Murray *et. al.*, 2006).

Otra clasificación de este género, se da entre micobacterias no tuberculosas (Complejo *M. avium*, MAC) y micobacterias tuberculosas (Complejo *M. tuberculosis*). Las micobacterias no tuberculosas son ubicuas en el medio ambiente, existen en una variedad de hospederos animales y se cree que son contraídas desde el ambiente (suelo, agua, polvo, aves, animales, comida). Entre ellas se encuentran *M. avium* y *M. intracellulare* que son patógenos oportunistas, es decir que solo causan infecciones en ciertos hospederos. Se ha especulado que una vez han entrado en los pulmones, estas bacterias forman biofilm como lo hacen en fuentes ambientales y con el tiempo provocan la destrucción de las mucosas (Tomashefski y Farver, 2008). Por otro lado, el complejo *M. tuberculosis* consiste de *M. tuberculosis*, *M. africanum*, *M. bovis*, *M. microti*, *M. canneti*, y *M. pinnipedii*, los que a pesar de ser organismos cercanamente relacionados a nivel de secuencia de nucleótidos, difieren significativamente en su morfología, bioquímica y hospedero infectado (Cosma, 2003; Tomashefski y Farver, 2008).

2.1.1 Envoltura celular

En las micobacterias, esta barrera física tiene baja permeabilidad incluso para la toma de nutrientes, lo cual entre otros, retarda el crecimiento de las mismas (Dafeé , 2008). Su composición química es diferente a la presentada por bacterias gram positivas y gram

negativas; de hecho el contenido lipídico puede alcanzar cerca del 40% del peso seco de la micobacteria (Dafeé , 2008).

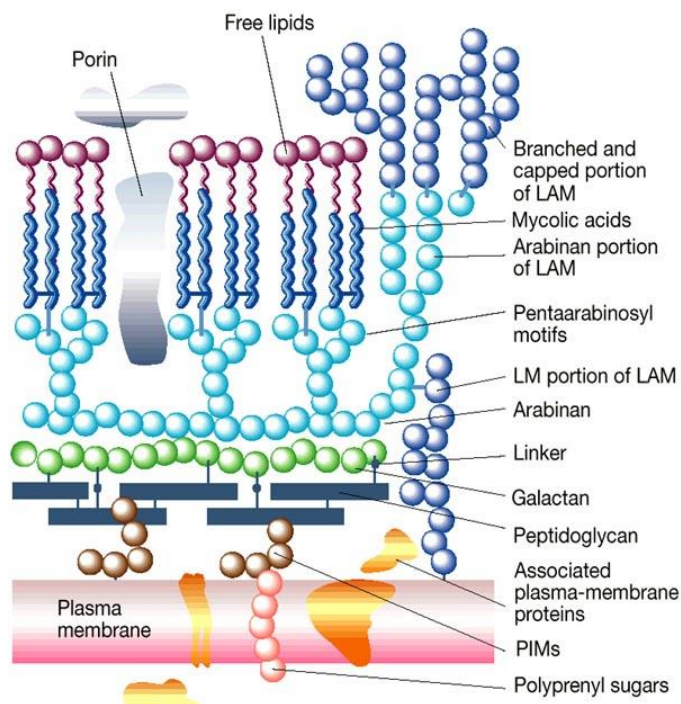
Se ha establecido que la envoltura celular consiste de la membrana plasmática o bicapa lipídica, rodeada por una pared celular de carbohidratos y lípidos, que a su vez esta rodeada por la cápsula compuesta principalmente de polisacárido y proteína (Figura 2-1). La presencia de periplasma entre la membrana plasmática y el peptidoglicano (capa de 10- 15 nm de espesor), aun debe ser demostrada (Dafeé, 2008). A pesar de que estructuralmente las micobacterias son similares a las bacterias gram positivas, también poseen características de bacterias gram negativas, razón por la cual las micobacterias no se han clasificado dentro de ninguno de los dos grupos (Hett E, 2008).

Membrana plasmática o bicapa lipídica: Su composición, apariencia y función no son muy diferentes de otras membranas biológicas. La bicapa lipídica esta compuesta principalmente de fosfolípidos cuya fracción de ácidos grasos tienen cadenas de menos de 20 carbonos, presentan dobles enlaces o ramificaciones: ácido palmítico ($C_{16:0}$), octadecenoico ($C_{18:1}$) y 10-metiloctadecenoico (tuberculostearico C_{19r}). Los fosfolípidos encontrados son: fosfatidilinositol manosidos (PIM), fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), fosfatidiletanolamina (PE) y poco fosfatidilinositol (PI). Las micobacterias no tienen fosfatidilcolina (PC). El mayor componente de la membrana plasmática es la CL (aproximadamente 52%), PIM (36-38%) y PE (aproximadamente 10%) (Dafeé M, 2008; Goren M, 1972).

Pared celular: Consiste de un “esqueleto” covalentemente enlazado y una variedad de sustancias unidas no covalentemente como lípidos, glicolípidos y pocos polipéptidos. El “esqueleto” es una macromolécula conformada por peptidoglicano unido por enlaces covalentes al arabinogalactano y ácidos micólicos (α ramificados y β hidroxilados de cadenas muy largas de mas de C_{90}) que define la forma de la pared celular. Se ha propuesto que los ácidos micólicos forman una monocapa cerca de la superficie externa de la pared intercalados con cadenas de ácidos grasos. Este modelo se “asemeja” a la membrana externa de las bacterias gram negativas, sin embargo, su presencia no se ha corroborado hasta ahora con micrografías electrónicas. En este caso la toma de nutrientes se facilitaría por la presencia de porinas en la pared que han sido reportadas en *M. chelonae* y *M. smegmatis* (Dafeé M, 2008).

Capa externa o cápsula: Los principales componentes de esta capa son polisacáridos y proteínas y su proporción varía con respecto a la especie; por ejemplo, para especies de crecimiento lento como *M. tuberculosis* y *M. kansasii* hay una mayor proporción de polisacáridos, mientras que para especies de crecimiento rápido como *M. smegmatis* la cápsula está compuesta mayoritariamente de proteínas. Solo entre el 2 -3% del material expuesto en la superficie corresponde a lípidos (Dafeé M, 2008). En *M. tuberculosis*, los polisacáridos identificados son glucano, arabinomanano y manano. Por otro lado, también se ha reportado la presencia de proteínas como β -lactamasas, fosfolipasas, hemaglutinina, catalasa, peroxidasa, superóxido dismutasa etc. (Dafeé y Etienne, 1999).

Figura 2-1: Envoltura celular de las micobacterias. La membrana plasmática compuesta por fosfolípidos como fosfatidilinositol manosidos (PIM), es rodeada por una pared celular rica en carbohidratos y lípidos (ácidos micólicos, lipoarabinomanano LAM, lipomanano LM) (Tomado de Park y Bendelac, 2000).



2.2 *Mycobacterium tuberculosis*

Es un bacilo no móvil, aerobio y ácido- alcohol resistente. Fue descubierto por Robert Koch en 1882. Cultivado sobre medio sólido, crece lentamente (aproximadamente en 2 semanas) y las colonias formadas son rugosas de color crema (Cosma, 2003; Tomashefski y Farver, 2008). Este patógeno intracelular es el más ancestral del complejo *M. tuberculosis*. Debido a que este bacilo es un patógeno obligado, solo es contraído desde humanos infectados (Cosma, 2003; Tomashefski y Farver, 2008).

A partir de análisis bioinformáticos del genoma de *M. tuberculosis* (aproximadamente 4000 kpb), se encontró que el bacilo es capaz de sintetizar todos los aminoácidos esenciales, vitaminas, y cofactores, y metabolizar una gran cantidad de compuestos orgánicos. Bajo condiciones aeróbicas, el ATP es generado por fosforilación oxidativa empleando la cadena de transporte de electrones, aunque es evidente que también debe poseer los mecanismos necesarios para adaptarse a los cambios ambientales microaerófilos y/o anaeróbicos en el interior del granuloma. *M. tuberculosis* es resistente a muchos antibióticos gracias a su envoltura celular hidrofóbica que actúa como barrera permeable, y a que es capaz de sintetizar enzimas hidrolíticas y transferasas como la β -lactamasa y aminoglicosidoacetil transferasa, y varios sistemas de eflujo de drogas como por ejemplo transportadores tipo ABC (Cole *et. al.* 1998).

La envoltura celular de *M. tuberculosis* tiene una composición de lípidos, glicolípidos y polisacáridos inusuales similar a la de otras micobacterias (ácidos micólicos, lipoarabinomano y arabinogalactano entre otros), los cuales son responsables de disparar las reacciones inflamatorias del hospedero (Murray *et. al.*, 2006). Debido a que *M. tuberculosis* presenta tan diversos y numerosos ligandos en su superficie, es de esperar que *in vivo*, la bacteria sea internalizada en los macrófagos usando más de una vía mediada por receptor, de hecho se ha comprobado que la bacteria activa el sistema complemento para ser opsonizada por C3b y de esta forma ser reconocida por los receptores CR1, CR3 y CR4 de los macrófagos para ser fagocitada, además la bacteria no opsonizada puede ser reconocida gracias a sus polisacáridos de superficie (lipoarabinomano) por otros receptores como el receptor de manosa con el fin de entrar a los macrófagos (Ernst, 1998).

2.3 Tuberculosis

La TB es una enfermedad generada por la infección con *M. tuberculosis* y afecta principalmente los pulmones (TB pulmonar) aunque también puede afectar otros órganos (TB extrapulmonar).

A pesar de la disponibilidad de tratamientos, en la actualidad la TB se mantiene como un problema de salud pública global. La TB junto con la malaria y el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) son las enfermedades con mayores tasas de mortalidad anual en el mundo especialmente en países subdesarrollados (en África y Asia se presenta más del 80% de los casos), de hecho, es la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas a nivel mundial después de la infección por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

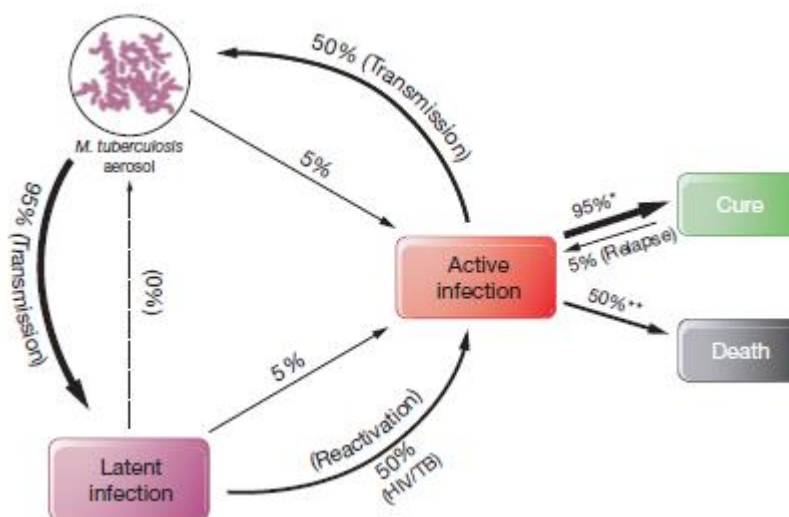
De acuerdo con el reporte más reciente de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el año 2011 se presentaron cerca de 8,3 -9,0 millones de nuevos casos de esta enfermedad (WHO,2012; Rachman y Kaufmann, 2007). En Colombia, según informes del Ministerio de Salud y Protección Social y del Instituto Nacional de Salud (INS), en el año 2011, se registraron 10731 nuevos casos, siendo las regiones más afectadas: Orinoquía, Amazonía y los departamentos de Chocó, Quindío y Guajira (MINSALUD, 2012; INS, 2009).

Se estima que un tercio de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* pero solo el 10% de esa población desarrollará la enfermedad activa, y el riesgo se incrementa más de 10 veces en individuos coinfectados con VIH (Figura 2-2) (WHO, 2012; Koul *et.al.* 2011). Por otro lado, también existe un estado de infección que se conoce como TB latente, la cual es asintomática y no infecciosa, surge de la restricción inmune del crecimiento de *M. tuberculosis* en el hospedero. El estado metabólico no replicativo de la bacteria que adquiere durante la TB latente, se denomina dormancia. De las condiciones de estrés en las que se encuentra la bacteria durante la latencia, es la hipoxia la que induce estados no replicativos y tolerancia a ciertas drogas como isoniazida (Koul *et.al.* 2011).

Los factores que determinan la progresión de la enfermedad son: el número de bacilos inhalados, la susceptibilidad del hospedero y la respuesta inmunológica del mismo (Cosma, 2003; Tomaszefski y Farver 2008).

La tuberculosis puede ser tratada con drogas como: isoniazida (INH), etambutol (EMB), rifampicina (RMP) y pirazinamida (PZA), las cuales se suministran durante un largo tiempo (18-24 meses) y en diferentes combinaciones (8-10 medicamentos). Sin embargo, se ha incrementado la aparición de cepas multidrogorresistentes de *M. tuberculosis* (MDR-TB) que son resistentes a por lo menos a RMP e INH, las dos principales drogas de primera línea usadas para tratar TB; y también las cepas extremadamente resistentes de *M. tuberculosis* (XDR-TB) las cuales son resistentes a RMP, INH y fluoroquinolonas y otras drogas de segunda línea (por ejemplo kanamicina) lo que deteriora el tratamiento actual. Además no hay drogas disponibles en contra de *M. tuberculosis* en estado dormante (WHO, 2012; Koul *et.al.* 2011).

Figura 2-2: Etapas de la infección de *M. tuberculosis*. Transmisión de *M. tuberculosis* y progresión de la enfermedad activa y latente. Solo una parte de la población presentará la enfermedad activa varios años después de la exposición a la bacteria (por ejemplo, pacientes inmunosuprimidos por infección con VIH). Después del tratamiento el 95% de los pacientes se recupera (*), mientras que sin tratamiento (**) en el 50% de los casos el individuo fallece (Tomado de Koul *et.al.*, 2011).



Por estas razones, se necesitan desarrollar nuevos medicamentos que puedan atacar la TB capaces de acortar el periodo de tratamiento (incluyendo menores frecuencias y dosis de medicamento), que estén dirigidas a combatir las cepas MDR-TB y XDR-TB y que además puedan ser co-administradas con medicamentos contra el VIH. Entre los nuevos medicamentos que se están desarrollando actualmente se encuentran las diarilquinolinas (TMC207) y benzotiazainas (BTZ043) las cuales afectan la síntesis de ATP (especialmente en condiciones de hipoxia) y la síntesis de arabinano, respectivamente. Al ser medicamentos dirigidos contra proteínas de membrana que son más fácilmente accesibles (sitios de unión) desde el espacio periplásmico, se eliminan algunos

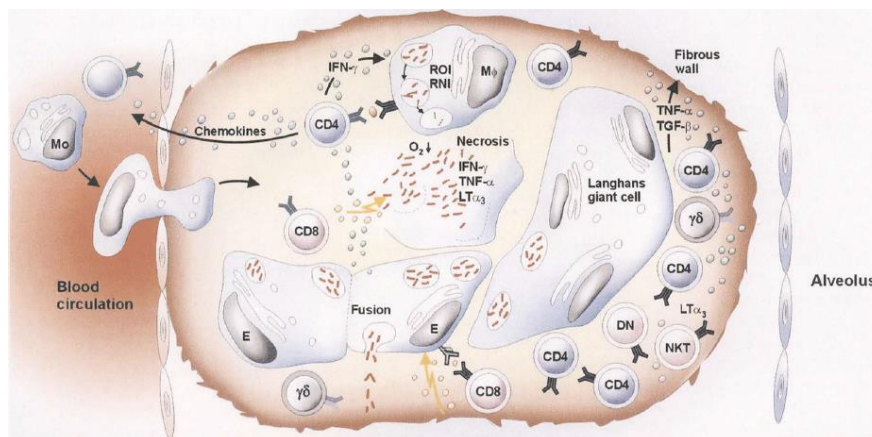
problemas relacionados con la permeabilidad de la membrana de la micobacteria (Koul *et.al.* 2011).

Hasta el momento la única vacuna usada como una medida preventiva (aunque no completamente eficaz) es la variante atenuada de *M. bovis* (BCG) pero muestra efectividad variable en prevenir TB en adultos. Se han hecho grandes esfuerzos para descubrir una vacuna novedosa y en la actualidad existen muchos candidatos a vacuna que están siendo probadas en modelos animales e incluso 7 de ellos están siendo probados en poblaciones pediátricas (Koul *et.al.* 2011).

2.3.1 Patogénesis

El bacilo tuberculoso se dispersa por contacto interpersonal vía aérea cuando las personas infectadas expelen la bacteria viva en gotas pequeñas, por ejemplo tosiendo. Los organismos son depositados en el alvéolo donde producen una reacción inflamatoria y se multiplican libremente produciendo una acumulación local de neutrófilos y macrófagos. Los macrófagos son la primera línea de defensa en contra del bacilo, no solo actúan como células presentadoras de antígeno para los linfocitos T ayudadores CD4+ (los cuales son reclutados junto con los monocitos al lugar de la lesión) sino que fagocitan la bacteria e inician la destrucción del bacilo. La acumulación local de linfocitos, macrófagos y células epiteliales en la lesión tuberculosa forman el granuloma (Figura 2-3) (Tomashefski y Farver, 2008). A pesar de que la activación de linfocitos lleva a la producción de anticuerpos esta respuesta no es eficaz puesto que las bacterias se encuentran protegidas en su localización intracelular (Murray, *et. al.*, 2006).

Figura 2-3: Esquema del granuloma clásico y respuesta inmune propuesta para la infección por *M. tuberculosis*. Los macrófagos alveolares (Mφ), células epiteliales (E) y Células de Langhans rodean a la bacteria en el centro del granuloma donde los niveles de oxígeno son bajos creando un ambiente hostil para la micobacteria. Las células T reconocen el antígeno y liberan un gran número de citoquinas para matar las células infectadas o las micobacterias. Los macrófagos emplean especies reactivas de oxígeno (RIO) y nitrógeno (RNI) para matar el bacilo. (Tomado de Tomashefski y Farver, 2008)



Sin embargo, este mecanismo solo ayuda a contener la infección y no erradica totalmente a *M. tuberculosis*; después de ser fagocitada la bacteria no es degradada

debido a que impide la maduración del fagosoma, es decir que inhibe la fusión fagosoma-lisosoma en el macrófago; de esta manera la bacteria sobrevive en un ambiente ligeramente ácido. Además las bacterias fagocitadas evitan su destrucción mediada por especies de óxido nítrico y aniones superóxido al catabolizar catalíticamente los oxidantes generados (Murray, *et. al.* 2006; Chastellier, 2009). De este modo, el organismo puede vivir durante largos periodos dentro de los granulomas, inhibiendo la maduración del fagosoma y eliminando las enzimas lisosomales necesarias para destruir la micobacteria. El desarrollo de la enfermedad dependerá del balance entre el macrófago para eliminar la bacteria y la capacidad de la bacteria para destruir el macrófago y dispersarse a otros tejidos por vías linfáticas o vasculares. (Cosma, 2003; Tomashefski y Farver 2008).

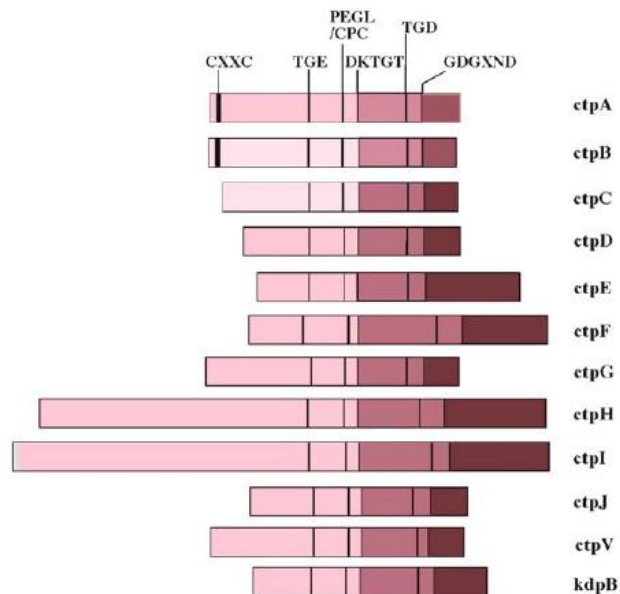
2.4 Mecanismos de transporte de nutrientes empleados por *M. tuberculosis*

A pesar de que los requerimientos nutricionales de las micobacterias han sido ampliamente estudiados, aun hoy en día la identidad de muchos de los transportadores de nutrientes esenciales todavía es desconocida. Aunque se sabe que *M. tuberculosis* emplea carbohidratos como fuente de carbono durante la primera semana de infección y que esta fuente de energía puede ser remplazada por lípidos (ácidos grasos) durante el progreso de la enfermedad, aún no se conocen las proteínas de membrana encargadas de mediar este proceso (Niederweis, 2008).

Por otro lado, estudios genómicos han reportado la presencia de genes que codificarían proteínas transportadoras putativas de solutos que contienen sulfato, fosfato y algunos aminoácidos. En el genoma de *M. tuberculosis* también se han reportado la presencia de 28 genes que codifican para una gran variedad de transportadores primarios y secundarios de iones metálicos, representando así el 24% de todos los transportadores en el organismo, entre ellos 12 ATPasas tipo P (el mayor número reportado para un organismo procarionota). Las especificidades posibles de ion incluyen K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , $Fe^{2+/3+}$ y Hg^{2+} (Novoa *et. al.* 2012, Niederweis, 2008, Agranoff y Krishna, 2004) (Figura 2-4).

Algunos de estos marcos de lectura también son codificados en *M. leprae* sugiriendo que tienen un rol a nivel intracelular. De acuerdo con Agranoff y Krishna (2004, 1998) este gran número de ATPasas puede dar la versatilidad requerida al bacilo para adaptarse a los niches intra- y extracelulares durante las diferentes etapas de la infección, las cuales difieren marcadamente en osmolaridad, concentraciones de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes. Los mismos investigadores resaltan el hecho que al no haber datos de la influencia de estos metales (excepto del Mg^{2+}) en la expresión génica de *M. tuberculosis*, lo convierte en un área de estudio significativa ya que los iones metálicos son muy importantes como cofactores metabólicos esenciales y mensajeros en la señalización fisiológica.

Figura 2-4: Esquema del alineamiento de las 12 secuencias protéicas de las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* transportadoras de iones metálicos. El sitio de fosforilación ha sido alineado para facilitar la comparación en el tamaño de las proteínas. El loop citoplasmático mas largo se muestra en rosado intermedio, y los extremos N- y C- terminal en rosado claro y oscuro respectivamente. Se indican las secuencias de los dominios conservados en las ATPasas tipo P (Tomado de Agranoff y Krishna, 2004).



Otros estudios de knockout de genes descritas por Agranoff (2004,1998), más precisamente con el gen *mntH* de *M. tuberculosis* que codifica para un transportador de Mn^{2+} , reportaron que no hay un efecto fenotípico de los mutantes en los medios de cultivo líquido y dentro de los macrófagos a pesar de la aparente importancia de este catión para el metabolismo del bacilo. Esto podría confirmar el efecto compensatorio de las ATPasas tipo P y sus numerosas especificidades de sustrato.

2.5 ATPasas

Las ATPasas son proteínas de membrana que hidrolizan ATP, liberando energía que es utilizada para transportar al menos una sustancia a través de la bicapa lipídica (EC 3.6.1.3 adenosintrifosfatasa). Se encuentran tanto en bacterias como plantas y animales y pueden clasificarse en 4 grupos. ATPasas tipo P, F, V y ABC (Pedersen, 2007):

- **ATPasas tipo F:** Están presentes en la mayoría de tipos celulares aerobios y actúan como ATP sintasas, es decir que producen ATP a partir de ADP y P_i en presencia de Mg^{2+} en respuesta a un gradiente electroquímico de protones generado por la cadena de transporte de electrones. Estas proteínas se localizan en la membrana interna de la mitocondria de eucariotes, membrana plasmática de bacterias y en el tilacoide del cloroplasto en las plantas. Consisten de dos subunidades una F_1 o catalítica y la F_0 de soporte en la membrana (por eso también son llamadas las F_1F_0 ATPasas) (Pedersen, 2007).

- **ATPasas tipo V:** Se encuentran en las vacuolas de organismos eucariotas y membranas plasmáticas de bacterias y también de eucariotas. Están involucradas en diferentes procesos intra- e intercelulares como endocitosis mediada por receptor, transporte activo de metabolitos y proteínas, y homeostasis (Pedersen, 2007) .

- **ABC ATPasas:** Más conocidas como transportadores ABC, son ubicuas en los sistemas biológicos ya que transportan diferentes nutrientes hacia fuera y dentro de la célula, entre ellos Cl⁻ y colesterol. Algunas de estas solo son inducidas en presencia de sustancias extrañas y se llaman transportadores resistentes a drogas (Pedersen, 2007).

- **ATPasas tipo P:** Son una familia ubicua y variada de proteínas integrales de membrana que están involucradas en proceso de transporte de iones y lípidos en todos los organismos vivos. Su nombre proviene del hecho de que forman un intermediario fosforilado en un residuo conservado de ácido aspártico (Asp) durante la catálisis. Sus masas moleculares oscilan entre 70-150 kDa (Pedersen, 2007).

2.6 ATPasas tipo P

Su nombre es debido a que forman un intermediario fosforilado (del inglés, *phosphorylated*) en un residuo conservado de Asp durante la catálisis. Estas bombas iónicas comparten diferentes características bioquímicas: estables en ácido, son fosforiladas en un residuo de Asp durante el ciclo catalítico, son inhibidas por vanadato (análogo al estado de transición, estado E2), y requieren Mg²⁺ para estabilizar el estado de transición (Pedersen, 2007; Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Alineamientos de secuencias protéicas muestran patrones conservados característicos, entre ellos la secuencia del motivo DKTGTLT, la presencia de entre 6-10 hélices transmembranales (M1-M10) y dominios citoplasmáticos muy conservados entre las hélices M2 y M3 y entre M4 y M5 (Kühlbrandt, 2004). Basados en su similaridad de secuencias, la familia de ATPasas tipo P puede ser dividida en 5 ramas (I- V), las cuales a su vez pueden subdividirse dependiendo del ion transportado (Tabla 2-1) (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

-**ATPasas Tipo I:** Las más sencillas y antiguas de las ATPasas tipo P. Se dividen en 2 subtipos y transportan K⁺, Cu⁺, Ag⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺ (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

- **ATPasas Tipo IV y V:** Son el subtipo más relacionado a las ATPasas tipo I. A pesar de su homología estructural, todavía es desconocida su función. En el caso de las Tipo IV pueden estar relacionadas con la traslocación de lípidos (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

- **ATPasas Tipo II y III:** ATPasas tipo P electrogénicas, las cuales han sido las más investigadas, ya que crean y mantienen el potencial de membrana en las células de plantas y animales gracias a la generación de un gradiente iónico. Entre ellas se

encuentra la Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoplásmico (del inglés, *Sarco/endoplasmic reticulum Ca^{2+} ATPase*, SERCA), la cual intercambia 2 iones Ca^{2+} hacia el lumen del retículo por 2 o 3 iones H^+ ; y la Na^+/K^+ ATPasa que intercambia 3 iones Na^+ desde el citosol por 2 K^+ del espacio extracelular (Kühlbrandt, 2004).

Tabla 2-1: Clasificación de la familia de ATPasas tipo P en 5 grupos (Tipo I –Tipo V). A su vez se muestran la subclasificación de estas bombas con respecto al ion transportado.

Tipo	Ion Transportado	Organismos	Observaciones
Tipo I	IA: K^+	Bacterias <i>E.coli</i> : Kdp	Compuesto por diferentes subunidades.
	IB: Cu^+ , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+}	Bacterias <i>S. cerevisiae</i> Plantas y animales.	Proteínas de resistencia a metales en bacterias. Una sola cadena de polipéptido. Organización diferente de hélices transmembrana.
	Tipo II	IIA: Ca^{2+} (SERCA) IIB: Ca^{2+} (membrana) IIC: Na^+/K^+ y H^+/K^+ .	Animales Plantas Animales
Tipo III	IID: Na^+ IIIA: H^+	Eucariotas Plantas y hongos	Mantienen el pH intracelular 6,6 cuando el exterior es de 3,5.
	Tipo IV	IIIB: Mg^{2+} Lípidos	Bacterias Eucariotas
Tipo V	Desconocido	Eucariotas	Especificidad del sustrato y función biológica aún desconocidas.

A partir de estudios realizados con la SERCA, Na^+/K^+ ATPasas y H^+ ATPasas se ha determinado que las estructuras de las ATPasas tipo P son más conservadas que sus secuencias. En general, existen 5 dominios (citoplasmáticos y de membrana) conservados en la estructura de las ATPasas tipo P relacionados de acuerdo son su función o posición (Figura 2-5). Los residuos requeridos para la función enzimática son invariantes. Algunas diferencias se observan en los loops extra-citoplasmáticos y citoplasmáticos (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

- Dominios citoplasmáticos

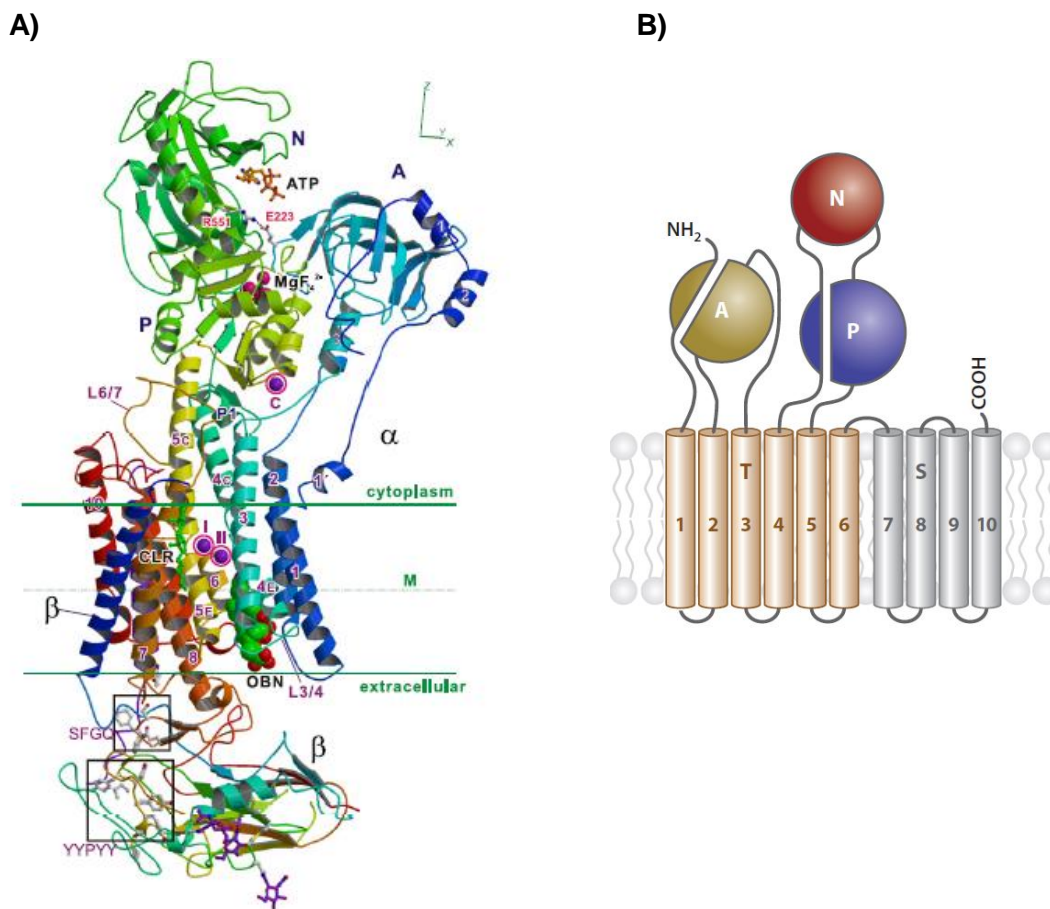
Dominio de fosforilación (P): Es el dominio catalítico de la enzima y a su vez el más conservado de los 4 ya que contiene la secuencia característica DKTGTLT (sitio de fosforilación en Asp). En cada ciclo es fosforilado por el dominio N y desfosforilado por el dominio A. Existen otras dos secuencias conservadas en este dominio: TGDN y GDGXND que están involucrados en la coordinación de Mg^{2+} (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Dominio de unión al nucleótido (N): Solo el 20% de los residuos son conservados y están relacionados con el sitio de unión al nucleótido. Solo la base adenosina del ATP encaja en el sitio de unión gracias a las interacciones hidrofóbicas facilitadas por un

residuo de fenilalanina. Por otro lado, el grupo trifosfato sobresale hacia el solvente, de esta forma el γ - fosfato (γ -P) alcanza en el dominio P el Asp que es fosforilado. Actúa como una proteína quinasa sobre el dominio P (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Dominio actuador (A): A diferencia de los otros dominios, éste no contiene sitios de unión a un ion o cofactor. Al parecer su función durante el ciclo catalítico es facilitar el contacto del sitio de fosforilación y el ATP durante el ciclo de bombeo del ion. Actúa como una fosfatasa sobre el sustrato dominio P (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Figura 2-5: Dominios conservados para las ATPasas tipo P. **A)** Diagrama de la estructura de la Na^+/K^+ ATPasa de la glándula rectal de tiburón (obtenida por difracción de rayos X 2.4 Å). El color cambia gradualmente desde N- terminal (azul) hasta C- terminal (rojo). Se identifican los dominios N, P y A en el dominio citoplasmático. El ATP se ubica en el dominio N. Los iones K^+ unidos se marcan como círculos I, II y C. A su vez se distingue la subunidad α catalítica de la subunidad β extracelular. (Tomado de Toyoshima *et. al.* (2011)) **B)** Esquema de los dominios presentes en las ATPasas tipo P. En el dominio citoplasmático se encuentra el dominio A, P y N. En el dominio de membrana se encuentran las hélices transmembranales del dominio T y el dominio S. (Tomado de Palmgren y Niseen (2011)).



- Dominios de membrana (M)

Este dominio es el más grande de los 4 y consiste de las hélices transmembrana que rodean los sitios de unión al ion. En estos últimos, los iones son coordinados por cadenas laterales iónicas y polares. La conservación de residuos en la membrana es baja, debido a la adaptación del sitio de unión al ion a diferentes iones sustrato y porque hay poca presión evolutiva por conservar residuos hidrofóbicos no importantes en la bicapa lipídica (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Dominio de transporte (T): Es flexible y consiste de 6 hélices transmembrana que poseen el sitio de unión al ion. El número de sitios de unión depende del tipo de ATPasa y puede variar entre 1 y 3 (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Dominio de soporte (S): Es una unidad auxiliar que provee soporte estructural al dominio T y en algunos casos sitios de unión a ion adicionales (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

Dominio de regulación (R): Las ATPasas pueden tener este dominio o no y por lo general está presente en N- o C- terminal. Actúan autoinhibiendo el resto de la molécula ya sea al restringir sus movimientos o porque son reguladores de la afinidad por los cationes (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

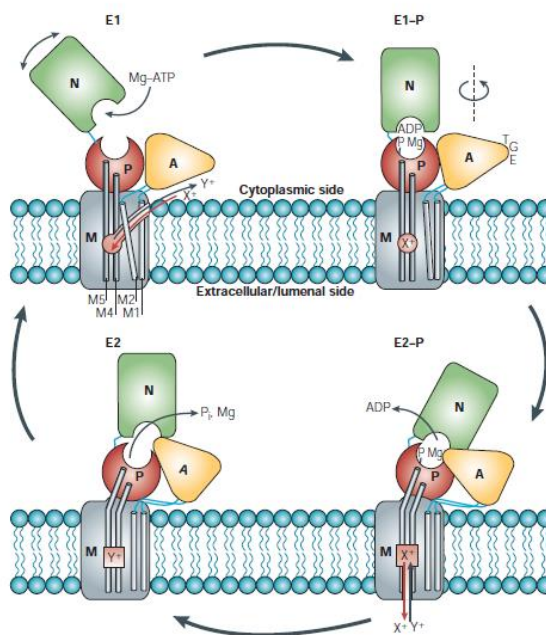
2.6.1 Ciclo Post- Albers de las ATPasas tipo P

Se ha establecido que las ATPasas tipo P sufren grandes cambios conformacionales con el fin de transportar iones a través de la membrana. El ciclo general se basa en el esquema de Post-Albers para la Na^+/K^+ ATPasa, durante el cual la enzima opta principalmente 2 estados: E1 y E2 (enzima 1 y enzima 2, respectivamente) cada uno de los cuales tiene diferente afinidad por el nucleótido y los iones transportados; mientras que en E1 el sitio de unión al ion enfrenta el lado citoplasmático, en E2 este se ubica de cara al lado extracelular (Kühlbrandt, 2004; Palmgren y Niseen, 2011).

El ciclo inicia cuando el ion 1, X^+ , alcanza el sitio de unión de alta afinidad en el estado E1 a través de un canal de acceso. La unión de Mg^{2+} - ATP al dominio N provoca su aproximación al dominio P y de esta forma se asegura que el γ -Pi del ATP alcance el sitio de fosforilación en el estado E1-P. Durante la reacción de fosforilación, el ion Mg^{2+} facilita el ataque nucleofílico del Asp del dominio P en el γ -Pi reduciendo la repulsión electrostática y estabilizando el estado de transición pentavalente. En la transición entre los estados E1-P y E2-P el dominio A rota con el fin de que el loop TGE se acerque al sitio de fosforilación y así las cadenas laterales polares replacen el Asp fosforilado en la esfera de coordinación del ion Mg^{2+} ; en este punto también se disocia el ADP. La proteína entonces sufre un nuevo cambio conformacional que resulta en la liberación del ion X^+ al lado extracelular. La entrada de un segundo ion Y^+ en E2- P parecería estimular la hidrólisis del residuo de Asp; como resultado el Mg^{2+} y el ion fosfato podrían escapar. Por último la enzima desde el estado E2 retorna al estado E1 en el que el sitio de unión

al ion se abre en el lado citoplasmático y otro ciclo puede comenzar (Kühlbrandt, 2004) (Figura 2-6).

Figura 2- 6: Ciclo de Post- Albers para las ATPasas tipo P. El ion 1, X^+ , alcanza el sitio de unión en el estado E1. La unión de Mg^{2+} - ATP al dominio N provoca su aproximación al dominio P y se fosforila la enzima alcanzando el estado E1-P. Durante la transición entre los estados E1-P y E2-P el dominio A rota y las cadenas laterales polares remplazan el Asp fosforilado en la esfera de coordinación del ion Mg^{2+} ; en este punto también se disocia el ADP. La proteína sufre un nuevo cambio conformacional que resulta en la liberación del ion X^+ al lado extracelular. La entrada de un segundo ion Y^+ en E2- P estimula la hidrólisis del residuo de Asp; como resultado el Mg^{2+} y el ion fosfato escapan. Por último la enzima desde el estado E2 retorna al estado E1. (Tomado de Kühlbrandt, 2004)



2.6.2 Na^+ ATPasas tipo P

Este tipo de enzimas se consideran independientes de K^+ , insensibles a ouabaina pero inhibidas por furosemida, esto con el fin de distinguirlas de las bien conocidas Na^+/K^+ ATPasas, a la cual se le atribuye el principal transporte activo primario de Na^+ (Rocafull *et. al*, 2011; Almeida, 2008). La Na^+ ATPasa o "segunda bomba de sodio" ha sido implicada en la regulación del volumen celular y al igual que la Na^+/K^+ ATPasa forma un intermediario fosforilado desde ATP en presencia de Mg^{2+} y es inhibida por vanadato (Pinoni y Lopez, 2009).

Importancia del ion sodio (Na^+)

Debido a que el Na^+ es el catión metálico más abundante en el plasma humano y otras fuentes ambientales, no es de extrañar que muchas enzimas posean sitios de unión a Na^+ para aumentar su actividad, entre las que se encuentra la β - galactosidasa, Trp sintasa y algunas proteasas (trombina). Los cationes monovalentes pueden participar en

el aumento de la velocidad de reacción o la regulación alostérica de estas enzimas (Page y Di Cera, 2006). Estas funciones se suman a las más conocidas del Na^+ como son la generación y el mantenimiento del potencial de membrana y el acople de su gradiente de concentración con el transporte de otros nutrientes.

Ciertamente, existen muchos otros organismos que toleran mayores concentraciones de Na^+ que el ser humano, siendo el ejemplo extremo los organismos halotolerantes (como algunas arqueas, bacterias y hongos). En estos ambientes de alta fuerza iónica, se requieren importantes adaptaciones celulares para la supervivencia; por ejemplo, métodos alternativos para alcanzar el balance osmótico que permiten incrementar los niveles de K^+ intracelular y el empleo del Na^+ como ion de acoplamiento en la síntesis de ATP, conocido como ciclo del sodio (Page y Di Cera, 2006).

En el caso de algunas bacterias patógenas, emplear el ciclo de sodio le da la versatilidad al organismo para tener nuevas formas de sintetizar ATP (fuente de energía), moverse, regular el pH o tomar nutrientes, lo que le facilitaría la colonización y su supervivencia en el hospedero (Häse et.al. 2001):

- Síntesis de ATP: La mayoría de bacterias emplean la fuerza protonmotriz como fuente de energía. Sin embargo, también se encuentran numerosos reportes acerca de organismos extremófilos como termófilos y alcalófilos que emplean el ion Na^+ en cambio de, o además de H^+ , en un ciclo en el cual el bombeo de iones Na^+ a través de la membrana se da por una bomba primaria como Na^+ ATP sintetasa y otros transportadores de Na^+ . El ciclo del Na^+ , se ha verificado en bacterias como *Vibrio alginolyticus*, *Propionigenium modestum* y *Clostridium fervidus*. Este ciclo también se ha sugerido en bacterias marinas debido a su requerimiento de Na^+ para el crecimiento y la respiración. Interesantemente, en el caso de *Escherichia coli* (*E. coli*), también se ha reportado que el ciclo es necesario para sobrevivir bajo condiciones de estrés en altas concentraciones de Na^+ .

- El transporte dependiente de Na^+ en el caso de bacterias parasíticas obligadas (*Enterococcus faecalis*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella entérica*, entre otras) en el que los aminoácidos y nutrientes alanina, prolina, glutamato, aspartato, serina, treonina, citrato, malato y lactato son transportados al interior celular por medio de transporte secundario gracias a la fuerza motriz generada por H^+ o Na^+ . Otros estudios han evidenciado el cotransporte de Na^+ con melobiosa, prolina y glutamato en varias bacterias incluyendo *E. coli* y *Bacillus subtilis*.

-También se ha propuesto el eflujo de drogas dependiente de Na^+ relacionado con la resistencia a antibióticos en algunas bacterias; y por último la movilidad para ciertos microorganismos que poseen flagelos y la fuerza motriz depende de Na^+ como en el caso de *V. alginolyticus*.

Se ha reconocido la importancia del ciclo del Na^+ para algunos patógenos humanos y por tanto se sugiere que las bombas primarias de Na^+ son potenciales blancos terapéuticos. Hasta el momento se han identificado algunos inhibidores como la korormicina,

monensina, amilorida y los iones Ag^+ y Li^+ que inhiben algunos transportadores como los antiporter Na^+/H^+ y sistemas NQR (Häse *et. al.*, 2001).

Por otro lado, la distribución en la naturaleza del transportador de membrana NQR aparentemente es limitado a bacterias marinas y algunos patógenos de animales y humanos; por tanto, las subunidades de esta proteína se han convertido en candidatos a vacuna. El transportador NqrA de *Actinobacillus pleuropneumoniae* (agente causante de infección pulmonar en cerdos) ha resultado inmunogénico en cerdos infectados; de hecho, en el suero de los animales, se encontraron anticuerpos anti- NqrA que presumiblemente ayudaron al hospedero a combatir la infección (Häse *et. al.*, 2001). Aunque estos estudios son preliminares, se podría dar una nueva dirección a futuras investigaciones de las bombas de Na^+ en infecciones bacterianas (Häse *et. al.*, 2001).

A pesar de que los iones Na^+ asisten la función de diferentes macromoléculas, para la mayoría de células una concentración elevada de Na^+ es deletérea, probablemente porque interfiere con el funcionamiento correcto de ciertos blancos celulares. Debido a la abundancia de Na^+ en diferentes ambientes naturales, las células han desarrollado mecanismos para mantener bajos los niveles de Na^+ intracelular. Uno de ellos es la inhibición del transportador de membrana para impedir la entrada de estos metales al citoplasma, sin embargo, cuando la concentración de estos cationes en el medio extracelular es igual o un poco mayor a la tolerada por la célula, esto no es suficiente. Por ello, también se encuentran diferentes tipos de sistemas de exportación del ion que ayudan a balancear la concentración de los cationes evitando que alcancen una concentración tóxica a nivel intracelular (Benito *et. al.*, 2002; Ruiz y Ariño, 2007). En principio, todas las células exportan Na^+ desde el citoplasma por transporte activo. En células animales este es el trabajo de la Na^+/K^+ ATPasa y en plantas ocurre un intercambio de Na^+ por H^+ (Heefner, 1982). Las bacterias emplean mecanismos de transporte primario y secundario.

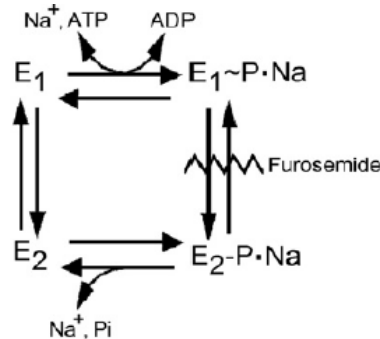
Na^+ ATPasas tipo P de eucariotas

Se han caracterizado en organismos tan diversos como cangrejos, truchas, algunos parásitos, levaduras y cobayos. El estudio llevado a cabo por Rocafull *et. al.* (2011) logró demostrar que la Na^+ ATPasa independiente de K^+ e insensible a ouabaina, presente en las células epiteliales del intestino de cobayo, es una entidad molecular, bioquímica y antigénica diferente de la Na^+/K^+ ATPasa. La caracterización de la enzima permitió establecer que está compuesta por al menos 2 subunidades (90 kDa α , 50 kDa β), una de las cuales es glicosilada (β) e interactúa de modo distinto a la subunidad β de la Na^+/K^+ ATPasa con la Concanavalina A. Esto se concluyó a partir de los resultados obtenidos por cromatografía de afinidad, la Na^+ ATPasa no se asoció a la matriz, mientras que la Na^+/K^+ ATPasa se unió a la columna y se eluyó en presencia de glucosa. Esto sugiere que los patrones de oligosacáridos son diferentes en ambas proteínas.

Los estudios realizados por Ventrella *et. al.* (2010) con extractos de tejidos de riñón de rata y branquias de trucha, empleando ^{32}P , permitieron seguir la formación y

comportamiento del intermediario fosforilado de la enzima en función de la concentración de Na^+ . Gracias a estas observaciones los investigadores proponen el ciclo catalítico para la Na^+ ATPasa. En este caso E1 y E2 se refieren a los 2 estados conformacionales de la proteína a medida que el Na^+ atraviesa la membrana. El primer paso, la formación del intermediario fosforilado $\text{Na}^+ \cdot \text{E1} \sim \text{P}$, es estimulado por Na^+ , dependiente de Mg^{2+} y reversible en presencia de furosemida. El paso de $\text{Na}^+ \cdot \text{E1} \sim \text{P}$ a la conformación $\text{Na}^+ \cdot \text{E2} \sim \text{P}$ es inhibido por furosemida. Durante la desfosforilación se liberan al medio el Na^+ y Pi . Por último, la enzima retoma la configuración inicial de E2 a E1. Sin embargo, es necesaria mayor evidencia experimental para asegurar que este es el ciclo de reacción de la Na^+ ATPasa (Figura 2- 7).

Figura 2-7: Ciclo catalítico propuesto para la Na^+ ATPasa. E1 y E2 se refieren a los 2 estados conformacionales de la proteína a medida que el Na^+ atraviesa la membrana. La formación del intermediario fosforilado $\text{Na}^+ \cdot \text{E1} \sim \text{P}$, es estimulado por Na^+ . El paso de $\text{Na}^+ \cdot \text{E1} \sim \text{P}$ a la conformación $\text{Na}^+ \cdot \text{E2} \sim \text{P}$ es inhibido por furosemida. Durante la desfosforilación se liberan al medio el Na^+ y Pi . Por último, la enzima retoma la configuración inicial de E2 a E1. (Tomado de Ventrella *et. al.*, 2010)



Por otro lado, un interesante reporte se hizo en el estudio con invertebrados, específicamente con cangrejos *Neohelice granulata*. Pinoni *et. al.* (2009) encontraron 2 tipos de Na^+ ATPasas insensibles a ouabaina pero solo una de las isoformas es inhibida por furosemida. La actividad Na^+ ATPasa de cada una de estas isoformas, no se ve afectada de la misma manera al cambiar el pH o condiciones de salinidad en los ensayos, lo que sugiere la existencia de una regulación diferencial de ambas enzimas.

Las Na^+ ATPasas tipo P también han sido bien caracterizadas y ampliamente reportadas en levaduras, donde se conocen comúnmente como sistema ENA. Los estudios de Benito *et. al.* (2002) han permitido concluir que las ENA son un grupo de enzimas pertenecientes a una subfamilia de ATPasas con actividad similar que participan en el transporte de Na^+ , Li^+ y K^+ al exterior celular. Al parecer, el sistema ENA se encuentra en todos los hongos y algunas plantas como briofitas. Los genes de ENA se han identificado en más de 20 especies, especialmente en levaduras como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schwanniomyces occidentalis*, *Neurospora crassa*, *Candida albicans* y *Debaryomyces hansenni*. En el caso de la levadura *S. cerevisiae* se han reportado dos mecanismos de extrusión de Na^+ : el primero, es un sistema antiporter H^+/Na^+ , capaz de intercambiar iones Na^+ , Li^+ y K^+ por H^+ . El segundo, se trata de una ATPasa tipo P codificada por el

sistema ENA, el cual parece ser el más importante en las condiciones normales de crecimiento.

S. cerevisiae posee varias copias del gen ENA, aunque su número puede variar entre cepas. En el caso de la cepa FY1679 (cuyo genoma ha sido secuenciado) se encuentran 3 copias del gen: ENA1, ENA2 y ENA5. El transporte de cada catión es determinado por la especificidad de la proteína o por las concentraciones intra- o extracelulares de los iones. Bajo condiciones normales de crecimiento, las 3 proteínas se expresan en niveles bajos y similares. Sin embargo, la expresión de ENA1 se incrementa como respuesta al estrés salino o pH alcalino. El gen también es capaz de responder a señales nutricionales como disponibilidad de glucosa o de nitrógeno. La expresión heteróloga de ENA1 en otras levaduras o células de plantas incrementa marcadamente la tolerancia a los iones Na^+ y Li^+ disminuyendo el contenido intracelular de estos iones, mostrando así la importancia de esta ATPasa en la destoxificación (Ruiz y Ariño, 2007).

Na^+ ATPasas tipo P de procariotas

Hasta el momento en procariotas solo se ha reportado la presencia de una Na^+ ATPasa tipo P en la bacteria *Exiguobacterium aurantiacum*, cuyo pH óptimo de crecimiento es 9 y además exhibe una toma de leucina dependiente de Na^+ tanto a pH 7,5 y 10 (Koyama, 1999; Ueno *et. al* 2000; Suzuki *et. al.* 2005)

Los estudios realizados por Koyama (1999) permitieron identificar por primera vez una Na^+ ATPasa tipo P en procariotas. Estos ensayos, se llevaron a cabo inicialmente con vesículas de membrana plasmática de *E. aurantiacum* donde se detectó actividad ATPasa estimulada por Na^+ y sensible a vanadato. La identificación de un polipéptido de aproximadamente 100 kDa que formaba un intermediario fosforilado sugirió fuertemente que se trataba de una ATPasa tipo P. La purificación de la proteína fue llevada a cabo por Ueno *et. al.* (2000) lo que permitió caracterizar los parámetros cinéticos de la enzima y establecer que la toma de aminoácidos como leucina y serina por parte de la bacteria es dependiente de Na^+ . De hecho no se detecta crecimiento bacteriano de *E. aurantiacum* cuando el medio de cultivo no contiene Na^+ .

En los últimos estudios realizados por Suzuki *et. al.* (2005) lograron identificar, clonar y expresar en *E. coli* el gen que codifica para la Na^+ ATPasa. La secuenciación del gen y los posteriores estudios bioinformáticos alcanzaron resultados muy interesantes. La Na^+ ATPasa está compuesta por 876 aminoácidos y el análisis de hidrofobicidad reveló que posee al menos 10 regiones transmembranales, segmentos que son muy similares a los de la Na^+/K^+ ATPasa y la Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoplásmico (SERCA). También se encontraron en el loop citoplasmático las regiones conservadas para ATPasas tipo P: DKTGTLT (sitio de fosforilación) y TGDGVND (sitio de coordinación Mg^{2+}). Corriente abajo de esta última secuencia, se reportó la región DDNFNTI, la cual ha sido asociada a Na^+ (ENA) y Ca^{2+} ATPasas. Otros alineamientos mostraron que hay una mayor identidad con Ca^{2+} ATPasa que con H^+ ATPasa en regiones transmembranales. De igual forma dicha similitud no fue mayor con ENA que con Na^+/K^+ ATPasa. Todos estos estudios

podrían sugerir que la principal diferencia entre las secuencias de estas ATPasas podría encontrarse en el sitio de unión al ion.

2.7 Técnicas electrofisiológicas empleadas en estudios de transporte

Existen diferentes técnicas para el estudio de los procesos de transporte en las proteínas de membrana, siendo las medidas electrofisiológicas las más comunes. Sin embargo, medidas directas empleando *Patch clamp* o *Voltage clamp* no pueden ser usadas para los transportadores bacterianos debido al pequeño tamaño de estas células y a la dificultad de expresar dichas proteínas en células eucariotas (por ejemplo en oocitos) (Tadini *et. al.* 2008, Schulz *et. al.* 2008). Por otro lado, la caracterización eléctrica de diferentes proteínas transportadoras incluídas las ATPasas tipo P, se ha llevado a cabo por medio de las técnicas: **Bicapas lipídicas planares** (BLM, por sus siglas en inglés *Black or Bilayer Lipid Membranes*) y más recientemente por **Membranas soportadas en sólido** (SSM, por sus siglas en inglés *Solid Supported Membranes*). Ambas técnicas permiten una medida directa de las corrientes eléctricas generadas por el transportador debidas a una activación química (un “salto” o cambio rápido en la concentración de sustrato). Las medidas de corriente incluso pueden proveer información acerca del mecanismo de reacción de la enzima. Experimentalmente, BLM y SSM permiten trabajar con fragmentos de membrana enriquecidos con la proteína de interés o proteoliposomas reconstituidos; ambos tipos de muestras son adsorbidos espontáneamente a la membrana y las medidas de traslocación de carga se obtienen por medio de acoplamiento capacitivo (ver abajo) (Tadini *et. al.* 2008, Schulz *et. al.* 2008).

2.7.1 Modelo eléctrico de la membrana

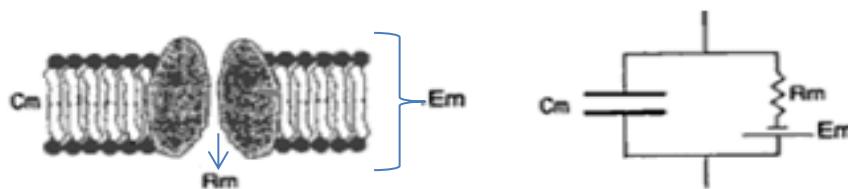
La membrana celular o bicapa lipídica puede representarse por medio de un circuito eléctrico RC, es decir, que está compuesto por una resistencia conectada en paralelo con un capacitor (Figura 2-8). La membrana lipídica actúa como una capa de material no conductor o aislante eléctrico (interior hidrofóbico), rodeada por soluciones de electrolitos en el medio intra- y extracelular (conductores eléctricos); dicha combinación es representada por un capacitor capaz de almacenar carga eléctrica. La cantidad de carga que un capacitor puede almacenar o capacitancia (C) depende de la constante dieléctrica del material entre las placas (κ , 2,1 para cadenas de hidrocarburos) y el espesor del aislante (δ) relacionadas por medio de la Ecuación 1 donde ϵ_0 es una constante eléctrica ($8,85 \times 10^{-12} \text{ C V}^{-1} \text{ m}^{-1}$ de permitividad en el vacío) (Latorre R. *et. al.* 1996, Elmslie K., 2005):

Ecuación 1
$$C = \frac{\kappa \epsilon_0 A}{\delta}$$

Debido a que la membrana es capaz de separar carga eléctrica, en este caso debido a una diferencia de concentración de cationes y aniones entre ambos lados de la membrana, se genera una diferencia de potencial (V_m) o potencial de membrana.

Por otro lado, los iones no pueden atravesar una bicapa lipídica a menos que posean vías especializadas para hacerlo; en el caso de las membranas biológicas los canales y transportadores facilitan el paso de iones entre el medio intra- y extracelular constituyendo así una conductancia eléctrica (recíproco de resistencia). En el circuito equivalente, estas proteínas transportadoras conforman la Resistencia de la membrana (R_m).

Figura 2-8: Circuito RC de la membrana plasmática. A la izquierda la representación de un canal embebido en una bicapa lipídica. A la derecha, el circuito equivalente. C_m : Capacitancia de la membrana, R_m : Resistencia de la Membrana y E_m (V_m) Potencial de membrana. (Tomado de Latorre *et. al.* (1996))

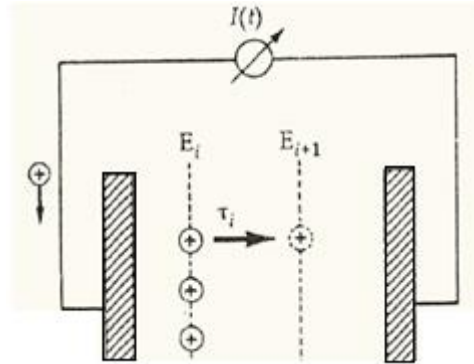


Las bombas electrogénicas, como en el caso de algunas ATPasas tipo P, contribuyen a la generación de corrientes transmembranales que modifican el potencial de membrana, que de otra forma estaría solo determinado por la permeabilidad selectiva de los canales (difusión o transporte pasivo) (Läuger P., 1991).

En principio, se puede considerar una bomba embebida en la membrana que se encuentra en un estado estacionario E_i . Si el sistema es perturbado en un tiempo $t=0$ por un cambio repentino de un parámetro externo, por ejemplo la temperatura, el voltaje o la concentración de sustrato de manera que la bomba se active, el sistema se aproxima a un nuevo estado estacionario E_{i+1} produciendo así una corriente transitoria o de estado preestacionario I_p (corriente de la bomba); dicha corriente esta asociada a los parámetros microscópicos del ciclo de transporte; I_p decae a 0 con una constante de tiempo τ_i y es igual al tiempo de relajación del paso de $E_i \rightarrow E_{i+1}$ (Figura 2-9). (Läuger P., 1991).

Si el anterior proceso está acoplado a un circuito de medida (como en el caso de BLM o SSM por acoplamiento capacitivo, ver abajo) y si el proceso de decaimiento de la corriente está asociado con un proceso de traslocación de carga, un movimiento de carga compensatorio debe ocurrir en el circuito externo. La activación de la bomba lleva a la generación de una corriente transitoria $I_p(t)$ y en el circuito de medida externo una corriente dependiente del tiempo $I(t)$ es registrada (Läuger P., 1991).

Figura 2-9: Esquema general de la generación de corriente por las bombas electrogénicas. Una bomba embebida en la membrana que se encuentra en un estado estacionario E_i es perturbada por un cambio repentino de un parámetro externo, la bomba se activa y el sistema se aproxima a un nuevo estado estacionario E_{i+1} produciendo así una corriente I_p (corriente de la bomba); dicha corriente esta asociada a los parámetros microscópicos del ciclo de transporte y decae a 0 con una constante de tiempo τ_i . El anterior proceso está acoplado a un circuito de medida externo. (Modificado de Läger (1991)).



2.7.2 Acoplamiento capacitivo

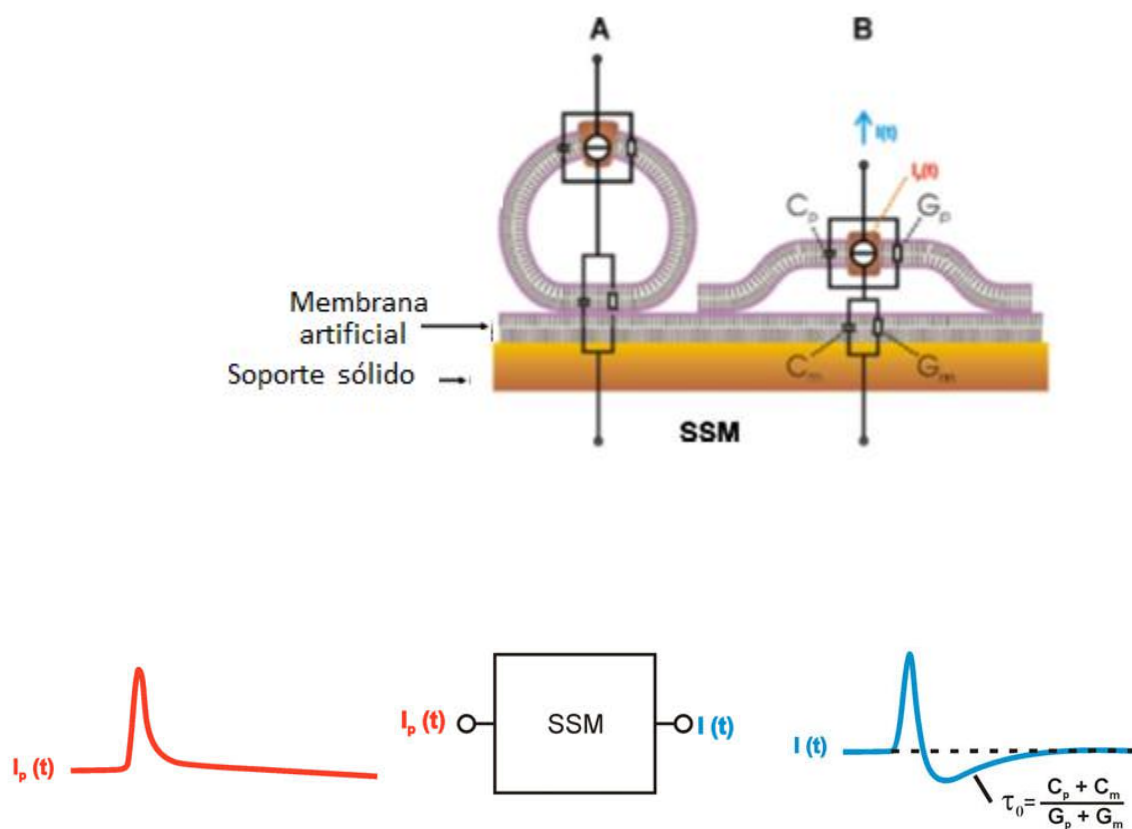
En experimentos de BLM o SSM, las vesículas de membrana o proteoliposomas enriquecidos con la proteína de transporte iónico en estudio, son adsorbidos espontáneamente a la BLM o SSM formando así una “membrana compuesta” la cual provee un espacio acuoso en ambos lados de la proteína embebida en la membrana. El comportamiento eléctrico de la membrana compuesta puede ser descrito y analizado por un circuito equivalente, como el mostrado en la Figura 2-10 para el caso de experimentos de SSM (Tadini *et. al.* 2008, Schulz *et. al.* 2008).

En la Figura 2-10 se representa el transportador (incorporado en la membrana adsorbida) como una fuente de corriente (Θ). La vesícula de membrana o proteoliposoma a su vez se caracteriza por una capacitancia y conductancia específica (C_p y G_p , respectivamente). El desplazamiento de carga en el transportador es transmitido al circuito de medida por medio de la capacitancia de la membrana planar o soportada en sólido (C_m). Este principio de medida se llama acoplamiento capacitivo. La activación de la bomba lleva a la generación de una corriente transitoria $I_p(t)$, esta señal es distorsionada por el circuito (la constante del sistema es introducida en la señal, y una corriente dependiente del tiempo $I(t)$ es registrada (Läger P., 1991, Tadini *et. al.* 2008, Schulz *et. al.* 2008)

La corriente medida después del salto de concentración de sustrato es caracterizada por tres partes: un aumento rápido, decaimiento lento y un componente lento con amplitud negativa. Las dos primeras fases proveen información acerca del ciclo catalítico de la enzima como la identificación de pasos electrogénicos y constantes de velocidad. La tercera fase se asocia con la constante del sistema τ_0 y es determinada por los componentes del circuito. En general, el valor del pico de la corriente medida es usado para cuantificar la actividad transportadora de la proteína bajo estudio. Este pico de

corriente representa una amplitud de corriente inicial registrada cuando el sustrato alcanza el sitio de unión y el transporte inicia. (Fendler K., 1993, Schulz *et. al.* 2008).

Figura 2-10: Esquema de la adsorción de proteoliposomas (A) y fragmentos de membrana (B) sobre SSM (Arriba). Cp y Gc: Capacitancia y Conductancia de la membrana que contiene la proteína de interés. Cm y Gm: Capacitancia y Conductancia de la membrana soportada sobre la superficie de oro. Ip(t) Corriente debida a la bomba, I(t) corriente registrada en el circuito de medida externo. **Abajo**, se muestra la señal de la corriente transitoria Ip(t) de la bomba, la cual es distorsionada por el circuito, y una corriente dependiente del tiempo I(t) es registrada. τ_0 es una constante de tiempo de decaimiento de corriente del sistema cuyo valor es determinado por los componentes del circuito (Modificado de Schulz *et. al.* 2008).



3. Hipótesis Experimental

Las ATPasas tipo P son enzimas fundamentales para mantener los gradientes iónicos y la homeostasis celular. Específicamente en las micobacterias, las ATPasas tipo P podrían conferir versatilidad a los bacilos para colonizar y sobrevivir en el hospedero. Aparentemente, la familia de ATPasas tipo P podría jugar un rol importante en la patogénesis de *M.tuberculosis* y por tanto, sería de gran interés identificar la especificidad iónica de estas enzimas (Botella *et. al.* 2012). La caracterización de estas bombas, permitiría en el futuro utilizarlas como dianas terapéuticas en el desarrollo de nuevos medicamentos antituberculosos.

En la actualidad no existen reportes acerca del transporte iónico del Na⁺ mediado por ATPasas tipo P en las micobacterias. Al respecto, nuestro grupo de investigación ha sugerido mediante estudios *in silico* la presencia de un transportador de Na⁺ codificado por el gen *ctpE* (*Rv0908*), tanto en el genoma de la cepa virulenta como de la cepa no virulenta de *M. tuberculosis*: H37Rv y H37Ra, respectivamente (Novoa . *et.al.*, 2012). También, nuestro grupo ha determinado el nivel de actividad ATPasa en vesículas de membrana de *M. tuberculosis* H37Ra estimulada por el aumento en la concentración de Na⁺, en ausencia de K⁺, la cual es inhibida por vanadato (Cuesta J., 2010).

De acuerdo con estos antecedentes se propone que el gen *ctpE* (*Rv0908*) presente en el genoma del bacilo tuberculoso, codifica una bomba de Na⁺.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Establecer la posible especificidad iónica de la proteína CtpE codificada por el gen *ctpE* (*Rv0908*) de *M. tuberculosis*, posible Na⁺ ATPasa tipo P.

4.2 Objetivos Específicos

- Construir un plásmido recombinante de expresión del gen *ctpE* (*Rv0908*) de *M. tuberculosis*.
- Optimizar las condiciones de la expresión heteróloga en *Escherichia coli* de la proteína CtpE de *M. tuberculosis*.
- Estudiar la especificidad iónica de la proteína CtpE, expresada en vesículas de membrana, por medio de ensayos bioquímicos y medidas electrofisiológicas preliminares.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

En el desarrollo de este trabajo se emplearon diferentes cepas de la bacteria *E. coli*, sus genotipos se muestran en la Tabla 5-1. *E. coli* fue cultivada en medio Luria Bertani (LB) líquido con agitación constante a 250 rpm o LB - agar a 37°C. En caso de ser necesario estos medios fueron suplementados con ampicilina (Amp) 100 µg/mL, carbenicilina (Car) 100 µg/mL o cloranfenicol (Cam) 34 µg/mL.

Tabla 5-1: Descripción de las cepas de *E. coli* empleadas en el presente estudio.

Cepa de <i>E. coli</i>	Uso	Genotipo relevante	Característica
DH5α	Clonación, propagación y mantenimiento de plásmido.	<i>endA</i>	deficientes en endonucleasa
XL1 Blue		<i>recA</i>	deficientes en recombinación
TOP10	Clonación y expresión.	<i>endA</i>	deficientes en endonucleasa
		<i>recA</i>	deficientes en recombinación
Rosetta 2	Expresión	<i>araBADC⁻</i>	capaz de transportar L-arabinosa pero no metabolizarla.
		<i>pRARE</i>	Plásmido con genes para tRNA poco comunes en <i>E. coli</i>

5.2 Recombinantes de clonación y expresión

5.2.1 Primera estrategia

Esta estrategia consistía en la amplificación del gen *ctpE* (*Rv0908*) a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y clonación en el vector pGEMT easy; seguido por la liberación del fragmento de interés por digestión con enzimas de restricción y su clonación en el vector de expresión pET 19b.

5.2.1.1 Amplificación del gen *ctpE* por PCR

Se diseñó una primera pareja de iniciadores “*mismatch*” que tuvieran el sitio de restricción C[^]TCGAG reconocido por la enzima *XhoI* (Tabla 5-2). El gen *ctpE* fue amplificado por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*) empleando como plantilla DNA genómico de la cepa *M. tuberculosis* H37Rv y la DNA polimerasa Dream Taq (Fermentas).

Se optimizaron las condiciones de reacción empleando las siguientes concentraciones finales de buffer de reacción 1x (Fermentas), dNTPs 333 µM cada uno, iniciadores 2,0 µM, MgCl₂ 1,5 mM, DNA genómico 6,2 -7,7 ng/ µL y Dream Taq 1,5 u. El ciclo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94,0°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94,0 °C por 1 minuto, temperatura de hibridación 62,0

°C por 1 minuto, extensión a 72,0 °C por 3 minutos y una extensión final a 72,0 °C por 10 minutos. Los productos de reacción fueron separados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE (Tris acetato 40mM, EDTA 1 mM, pH 8), y visualizados con tinción de bromuro de etidio y radiación UV (254 nm). Posteriormente, los productos obtenidos del tamaño esperado, fueron purificados con el kit de purificación de banda de Axygen y cuantificados midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop.

Tabla 5-2: Iniciadores diseñados para amplificar el gen *ctpE* a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv (Primera estrategia). En rojo se indica el sitio de restricción *XhoI* incluido en los iniciadores. Las bases no complementarias al gen se resaltan en rojo oscuro.

Iniciador	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Tamaño del Producto esperado
CtpEFw1	CCCGGCTCGAGTTCCAAGGC	60	2522 pb
CtpERev1	GGATTGCTCGAGCTGCGGGC	60	

5.2.1.2 Clonación del gen *ctpE* en el vector pGEMT easy

El producto de PCR de 2522pb fue empleado como inserto para la clonación en el vector pGEMT-easy (Anexo A). La ligación se llevó a cabo en relación molar 3:1 inserto: vector, en buffer de reacción 1x (Tris HCl 30 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM, ATP 1 mM, PEG 8000 5%) T4 DNA ligasa 1u (Promega) durante 1 hora a temperatura ambiente y toda la noche a 4°C. El producto de la ligación fue empleado directamente para transformar células termocompetentes de *E. coli* TOP10. Brevemente, las células fueron incubadas durante 30 minutos en hielo con 5 µL del producto de ligación, y sometidas a un choque térmico manteniendo las células 40 segundos a 42°C y enfriadas rápidamente a 0°C durante 15 minutos. Luego se incubaron las células en medio líquido LB durante 1 hora a 37°C, se sembraron en placas de LB - agar suplementadas con Amp, X-Gal e IPTG, y se incubaron nuevamente a 37°C entre 12 y 16 horas. Posteriormente se seleccionaron algunas colonias para verificar la presencia del inserto (en el recombinante pGEMT easy CtpE) por PCR en colonia y análisis de restricción.

5.2.1.3 Clonación del gen *ctpE* en el vector de expresión pET19b

Tanto el producto de PCR como el vector de expresión pET 19b (Anexo A) fueron digeridos con la enzima de restricción *XhoI* 1 u (Fermentas), en buffer R 1x (Fermentas, Tris HCl 10 mM pH 8,5, MgCl₂ 10 mM, KCl 100 mM, BSA 0,1 mg/mL), durante 2 h a 37°C. Los productos de la digestión fueron separados en gel de agarosa al 1% y purificados, después se emplearon en la reacción de ligación en diferente relación molar inserto: vector, 3:2, 3:1, 2:1 y 1:1, en buffer de reacción 1x (Tris HCl 40 mM pH 7,8, MgCl₂ 10 mM, DTT 10 mM ATP 0,5 mM), T4 DNA ligasa 1u (Fermentas) durante toda la noche a 4°C. El producto de la ligación fue empleado directamente para transformar células termocompetentes de *E. coli* TOP10 como se describió anteriormente. Luego, las células se incubaron en medio líquido LB durante 1 hora a 37°C, y se sembraron en placas de LB - agar suplementadas con Amp, las que se incubaron a 37°C entre 12 y 16

horas. Posteriormente se seleccionaron algunas colonias para verificar la presencia del inserto (en el recombinante pET19b CtpE) por PCR en colonia.

5.2.1.4 PCR en colonia

Las colonias seleccionadas fueron resuspendidas en 100 μ L de agua y empleadas directamente como DNA plantilla, en las reacciones de PCR para determinar la presencia del inserto *ctpE* en cada uno de los vectores. Los iniciadores empleados para el posible recombinante pGEMT –easy CtpE fueron SP6 (5' TAGGTGACACTATAGAATACTC3') y T7 (5' TAATACGACTCACTATAGGG 3') que hacen parte de la secuencia del vector. En el caso del posible recombinante pET 19b- CtpE se usaron los iniciadores pET comp down (5' TAGTTATTGCTCAGCGGTGG 3'), pET comp up (5' ACAGCAGCGGCCATATCG3') y RT *ctpE* dir (5' ACAACGAGCGGGCCTATCCG3'). Se emplearon las siguientes condiciones de reacción: buffer de reacción 1x (Fermentas), dNTPs 333 μ M cada uno, iniciadores 0,5 μ M, MgCl₂ 1,5 mM, y Dream Taq 1,5 u. El ciclo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 94,0°C por 10 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 94,0 °C por 1 minuto, temperatura de hibridación entre 47-52°C por 1 minuto, extensión a 72,0 °C por 30 segundos y una extensión final a 72,0 °C por 10 minutos. Los productos de la reacción se separaron en gel de agarosa al 1% y fueron visualizados por tinción con bromuro de etidio bajo radiación UV (254 nm).

5.2.2 Segunda estrategia

La segunda estrategia de clonación se dividió en 2 pasos: Primero, la clonación del gen *ctpE* amplificado por PCR desde DNA genómico en un vector de clonación pJET 1.2 (Fermentas); seguida de una subclonación dirigida en el vector de expresión pBAD-A2 (Invitrogen, modificado).

5.2.2.1 Amplificación del gen *ctpE* por PCR

Para amplificar nuevamente el gen *ctpE* de *M. tuberculosis* se diseñó una nueva pareja de iniciadores empleando el programa Clone Manager. Estos iniciadores son totalmente complementarios a las regiones presentes en los extremos 5' y 3' del gen y tienen un contenido GC entre 50- 60% (Tabla 5-3).

Tabla 5-3: Iniciadores diseñados para amplificar el gen *ctpE* a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Ra (Segunda estrategia) y DNA plasmídico de pJET1.2- CtpE. En rojo se indican los sitios de restricción insertados en los iniciadores, las secuencias AGATCT y GAATTC son reconocidas por las enzimas *Bgl*III y *Eco*RI, respectivamente. Las bases resaltadas en negrilla y rojo no son complementarias al gen.

Iniciador	Secuencia 5'→3'	Tm (°C)	Tamaño del Producto esperado
EFw1	GCACTGGGACGGCGACACTTTTCACGTT	74	2616 pb
ERev1	GCCATCAATGGCCGCTGGATGCACTAC	75	
E BglIII Fw	GAAGATCT CGATGACCCGTTTCGGCTTCG	72	2411 pb
EEcoRI Rev	CGGAATTC CGTCGCCCACTCTCGGTTTC	74	

El gen *ctpE* fue amplificado por PCR empleando como plantilla DNA genómico de la cepa *M. tuberculosis* H37Ra (ATCC 25177) y la DNA polimerasa *Phusion High – Fidelity* (Thermo Scientific). Se optimizaron las condiciones de reacción empleando las siguientes concentraciones finales de buffer GC 1x (Thermo Scientific), dNTPs 200 µM cada uno, iniciadores 0,5 µM, MgCl₂ 1,5 mM, DNA genómico 2 ng/ µL, Phusion 1u y DMSO 3%.

El ciclo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 98,0°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 98,0 °C por 20 segundos, hibridación probando diferentes temperaturas entre 64,9 °C- 72,0 °C por 30 segundos, extensión a 72,0 °C por 1 minuto 40 segundos y una extensión final a 72,0 °C por 10 minutos.

Los productos de reacción fueron separados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE, y visualizados con tinción de bromuro de etidio y radiación UV (254 nm). Posteriormente, los productos obtenidos del tamaño esperado, fueron purificados con el kit de purificación de banda QIAquick (QIAGEN) y cuantificados midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop.

5.2.2.2 Clonación del gen *ctpE* en el vector de clonación pJET 1.2

El producto de PCR de 2616 pb fue empleado como inserto para la clonación en el vector pJET 1.2 (Anexo A). La ligación se llevó a cabo en relación molar 3:1 inserto: vector, en buffer de reacción 1x (Thermo Scientific), T4 DNA ligasa 5u (Thermo Scientific) durante 15 minutos a temperatura ambiente (25°C). El producto de la ligación fue empleado directamente para transformar células termocompetentes de *E. coli* DH5α. Brevemente, las células fueron incubadas durante 5 minutos en hielo con 5 µL del producto de ligación, y sometidas a un choque térmico manteniendo las células 90 segundos a 42°C y enfriadas rápidamente a 0°C durante 15 minutos. Luego se incubaron las células en medio líquido LB durante 1 hora a 37°C, se sembraron en placas de LB - agar suplementadas con Amp, y se incubaron nuevamente a 37°C entre 12 y 16 horas.

Posteriormente se seleccionaron algunas colonias para verificar la presencia del inserto por medio de mapeo de restricción y secuenciación del fragmento de interés. Para esto se hizo extracción “Midiprep” de plásmido por lisis alcalina empleando el kit HiSpeed (QIAGEN). El recombinante de clonación se identificó como **pJET 1.2- CtpE**.

5.2.2.3 Subclonación del gen *ctpE* en el vector de expresión pBAD A2

A partir del recombinante **pJET1.2 -CtpE**, se amplificó nuevamente el gen *ctpE* por PCR. En este caso se diseñaron los iniciadores de tal forma que insertaran los sitios de restricción adecuados en los extremos 5´ de acuerdo con el sitio múltiple de clonación (MCS) del vector de expresión pBAD -A2 (los sitios de restricción presentes en este vector en el MCS son: *NcoI*, *BglII*, *NaeI* y *EcoRI*). La secuencia de los iniciadores empleados se muestran en la Tabla 5-3, el iniciador directo incluye el sitio de restricción A[^]GATCT mientras que el iniciador reverso tiene la secuencia G[^]AATTC, reconocidos por las enzimas de restricción *BglII* y *EcoRI* respectivamente.

El vector pBAD –A2 ha sido modificado desde pBAD (Invitrogen) e incluye una secuencia de nucleótidos que codifica un tag de 10 histidinas en el extremo C- terminal de la proteína recombinante expresada. El vector fue amablemente proveído en el Instituto Max Planck de Biofísica, Frankfurt, Alemania (Anexo A).

La nueva PCR fue llevada a cabo empleando el plásmido recombinante pJET1.2-CtpE como plantilla y la DNA polimerasa *Phusion High – Fidelity* (Thermo Scientific). Se optimizaron las condiciones de reacción empleando las siguientes concentraciones finales de buffer GC 1x o buffer HF 1x (Thermo Scientific), dNTPs 200 μ M cada uno, iniciadores 0,5 μ M, MgCl₂ 1,5 mM, DNA plasmídico 3 ng/ μ L, Phusion 1u y DMSO 3%. El ciclo de amplificación consistió de una desnaturalización inicial a 98,0°C por 2 minutos, seguida de 35 ciclos de desnaturalización a 98,0 °C por 20 segundos, hibridación probando diferentes temperaturas entre 60,1 °C- 67,7 °C por 30 segundos, extensión a 72,0 °C por 1 minuto 40 segundos y una extensión final a 72,0 °C por 10 minutos.

Los productos de reacción del tamaño esperado fueron separados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE, y visualizados con tinción de bromuro de etidio y radiación UV (254 nm). Posteriormente, los productos esperados fueron purificados con el kit de purificación de banda *ZymoClean DNA gel recovery* (Epicenter) y cuantificados midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop.

Posteriormente se llevó a cabo la digestión doble tanto del inserto como del vector con las endonucleasas de restricción *Bgl*I y *Eco*RI (NewEngland Biolabs) empleando las siguientes condiciones de reacción: buffer *Eco*RI 1x (Tris HCl 100 mM pH 7,5, NaCl 50 mM, MgCl₂ 10 mM Triton X-100 0,025%), *Bgl*I 1 u, *Eco*RI 1u y aproximadamente 614 – 640 ng de DNA. Se incubó la reacción por 1 hora a 37°C y los productos de reacción fueron purificados con el kit de purificación QIAquick PCR (QIAGEN) y cuantificados midiendo la absorbancia a 260 nm en Nanodrop.

Para la reacción de ligación se usó el kit *Fast-Link DNA Ligation Kit* (Epicentre). Se ajustaron las condiciones de reacción de tal forma que la relación molar inserto: vector fuera 2:1, buffer 1x (Tris acetato 33 mM pH 7,5, acetato de potasio 66 mM, de acetato de magnesio 10 mM, DTT 0,5 mM), ATP 10 mM y Fast Link DNA ligasa 2u. Se incubó la reacción por 15 minutos a temperatura ambiente (25°C) y se inactivó la enzima por calentamiento a 70°C durante 15 minutos. El producto de ligación se empleó directamente para la transformación de células termocompetentes de *E. coli* TOP10 y *E. coli* XL1 Blue como se describió anteriormente.

Finalmente se seleccionaron algunas colonias para verificar la presencia del inserto por medio de mapeo de restricción y secuenciación del fragmento de interés. Para esto se hizo extracción “Midiprep” de plásmido por lisis alcalina empleando el kit HiSpeed (QIAGEN). El recombinante de expresión se identificó como **pBADA2-CtpE**.

5.2.2.4 Preparación de células termocompetentes

Las diferentes cepas de *E. coli* termocompetentes empleadas para la transformación con los recombinantes obtenidos durante la presente investigación, fueron preparadas por métodos químicos. Se inocularon 5 mL de medio LB con una colonia de *E. coli* y el cultivo fue incubado a 37°C, 250 rpm durante toda la noche. Después 1 mL del cultivo fue empleado para inocular 50 mL de medio LB fresco y se siguió el crecimiento bacteriano hasta alcanzar la fase logarítmica en OD₆₀₀ 0,35-055. En este punto se enfriaron las células sobre hielo durante 30 minutos y luego se recolectaron por centrifugación a 4000 rpm (rotor SN291, Megafuge 16R Thermo Scientific), durante 10 minutos a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió en medio frío TSS el cual consiste de medio LB, PEG 8000 10% p/v, DMSO 5%, 20-50 mM MgSO₄. Las células se guardaron en alícuotas de 100µL a -70°C (Mülhardt, 2006).

5.2.2.5 Análisis de colonias obtenidas por mapeo de restricción

El análisis de restricción se llevó a cabo para los plásmidos recombinantes pJET1.2 - CtpE y pBAD A2 - CtpE. En el caso de pJET 1.2-CtpE se emplearon las enzimas *HindIII*, *BglII*, *PvuI* y *PstI* y para el recombinante pBAD A2- CtpE, las enzimas *BamHI*, *EcoRI*, *NdeI*, *HindIII* y *BglII* (New England Biolabs). En cada caso se prepararon reacciones de 20 µL empleando siempre el buffer recomendado por el fabricante en una concentración final 1x, entre 400-600 ng de DNA plasmídico y 1u de enzima. Todas las reacciones se incubaron durante 1 hora a 37°C. Los productos de reacción fueron separados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE y visualizados con tinción de bromuro de etidio y radiación UV (254 nm).

5.2.2.6 Secuenciación de recombinantes obtenidos

Para la secuenciación de los plásmidos recombinantes se optó por el servicio de la compañía Eurofins MWG Operon en Ebersberg, Alemania. Con el fin de secuenciar el gen *ctpE* se diseñó un par de iniciadores (Clone Manager) de tal manera que hibridaran al interior del gen y además se utilizaron iniciadores que hibridan en el vector en las regiones cercanas al MCS (Tabla 5-4). Los resultados se muestran en el Anexo B.

Tabla 5-4: Iniciadores diseñados para la secuenciación de los recombinantes pJET 1.2 CtpE y pBADA2- CtpE.

Iniciador	Secuencia 5'→3'
SeqE1fw	TGACCATCTACACCCAGTTG
SeqE2rev	GTATGCCCGTGTGATTGC
pBAD fw	ATGCCATAGCATTTTTATCC
pBAD rev	GATTTAATCTGTATCAGG
pJET 1.2 fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGC
pJET 1.2 rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG

5.3 Expresión heteróloga de la proteína CtpE en *E. coli*

Con el fin de determinar las condiciones óptimas de la expresión de la proteína CtpE en *E. coli* primero se hicieron ensayos a pequeña escala, evaluando la expresión de la proteína en diferentes cepas, variando el tiempo y la temperatura de inducción y la concentración de inductor (L-arabinosa). La detección de CtpE se siguió por medio de SDS-PAGE (electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones denaturantes) y western blot.

5.3.1 Optimización de la expresión

Cepa de *E. coli*: La expresión de la proteína recombinante CtpE se evaluó en las cepas de *E. coli* TOP10 (Invitrogen) y Rosetta 2 (Novagen). En el caso de TOP10 se trabajaron 2 variables: 1) transformación de las células con el recombinante pBADA2-CtpE y 2) cotransformación de las células con pBADA2 – CtpE y el plásmido pRARE que codifica para tRNAs poco comunes en *E. coli* (este plásmido tiene un gen de resistencia a Cam, el mapa de este vector se puede consultar en el Anexo A).

En cada caso, se inoculó una colonia de *E. coli* transformada con el (los) plásmido(s) en 2 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de Amp y si era necesario 34 µg/mL Cam, y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm). Al día siguiente 200 µL del cultivo anterior se emplearon para inocular 10 mL de medio fresco conteniendo el antibiótico adecuado y se continuó el crecimiento bacteriano a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica (OD_{600} aprox 0,5- 0.6). En este punto se indujo el cultivo con L- arabinosa en una concentración final de 0,2% (concentración mas alta recomendada). Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo en tiempo 0 h (preinducción), a 2h, 4h, 5h y 6h de inducción, y se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga por 1 minuto. Los pellets se guardaron a -20°C para su posterior análisis por SDS-PAGE y western blot.

Temperatura de inducción: Luego se evaluó el efecto de la temperatura de inducción en la expresión de proteína CtpE en las 3 cepas de *E. coli*: TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE y Rosetta 2 pBADA2 CtpE. En cada caso, se inoculó una colonia de *E. coli* transformada con el (los) plásmido(s) en 2 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de Amp y si era necesario 34 µg/mL Cam, y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm). Al día siguiente 200 µL del cultivo anterior se emplearon para inocular 10 mL de medio fresco conteniendo el antibiótico adecuado y se continuó el crecimiento bacteriano a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica (OD_{600} aprox 0,5- 0.6). En este punto se indujo el cultivo con L- arabinosa en una concentración final de 0,2%. Para cada colonia se prepararon 3 cultivos de 10 mL y cada uno se incubó a una temperatura diferente: 37°C, 30°C y 25°C. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo tiempo 0h (preinducción) y en 2 puntos de tiempo a 4h y 6h de inducción; después se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga por 1 minuto. Los pellets se guardaron a -20°C para su posterior análisis por SDS-PAGE y western blot.

Concentración de inductor L-arabinosa: A partir de los resultados anteriores, se inoculó una colonia de *E. coli* TOP10 transformada con pBADA2- CtpE en 2 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de Amp, y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm). Al día siguiente 200 µL del cultivo anterior se emplearon para inocular 10 mL de medio fresco y se continuó el crecimiento bacteriano a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica (OD₆₀₀ aprox 0,5- 0.6). En este punto se indujo el cultivo con diferentes concentraciones finales de L- arabinosa: 0,00002%, 0,0002%, 0,002%, 0,02% y 0,2%. Después se tomaron alícuotas de 1 mL a tiempo 0h (preinducción) y en 2 puntos de tiempo a 4h y 6h de inducción; después se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga por 1 minuto. Los pellets se guardaron a -20°C para su posterior análisis por SDS-PAGE y western blot.

5.3.2 Determinación de la cinética de crecimiento para las tres cepas de *E. coli* transformadas con pBADA2 CtpE e inducidas con L-arabinosa

Durante los ensayos de expresión de la proteína CtpE en *E. coli* se siguió el crecimiento bacteriano luego de la inducción con L- arabinosa para las tres cepas de *E. coli*: TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE y Rosetta 2 pBADA2 CtpE con el fin de evaluar el efecto de la expresión de esta proteína en *E. coli*, ya que se ha reportado que la expresión heteróloga de proteínas de membrana inhibe fuertemente el crecimiento bacteriano (Wagner S, *et. al.*, 2007, 2006; Miroux y Walker, 1996). Como control se tomaron las cepas de Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE transformadas pero sin inducir.

En cada caso, se inoculó una colonia de *E. coli* transformada con el (los) plásmido(s) en 2 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de Amp (junto a 34 µg/mL Cam cuando fuese necesario), y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm). Al día siguiente 200 µL del cultivo anterior se emplearon para inocular 10 mL de medio fresco conteniendo el antibiótico adecuado, los que se incubaron a 37°C hasta alcanzar la fase logarítmica (OD₆₀₀ aprox 0,5- 0.6). En este punto se indujo el cultivo con L- arabinosa en una concentración final de 0,2%. Se tomaron alícuotas de 1 mL de cada cultivo en tiempo 0 h (preinducción), a 2h, 4h y 6h de inducción y se midió el OD₆₀₀ por duplicado.

5.3.3 Obtención de vesículas de membrana de *E. coli*

Con el fin de identificar la localización celular de la proteína recombinante CtpE expresada en *E. coli*, y posteriormente realizar los ensayos funcionales de actividad ATPasa y especificidad iónica en la membrana plasmática sobreexpresando CtpE, se obtuvieron diferentes fracciones celulares a partir de *E. coli* TOP10 pBADA2-CtpE. La estrategia se basó en el fraccionamiento por centrifugación diferencial a partir de lisados celulares.

Teniendo presente los resultados de optimización de la sección 5.3.1, una colonia de *E. coli* TOP10 transformada con pBADA2- CtpE se inoculó en 100 mL de medio LB suplementado con Car 100 µg/mL, y se incubó durante toda la noche a 37°C con agitación (250 rpm). Al día siguiente el precultivo obtenido se utilizó para inocular 6 L de medio LB + Car 100 µg/mL, el cual fue incubado a 37°C con agitación hasta alcanzar un OD₆₀₀ aproximadamente 0,5. En este punto el cultivo fue inducido con L-arabinosa 0,2% y se continuó con la incubación durante 4 horas. Después las células fueron recolectadas por centrifugación a 4200 rpm (rotor JS4,2, Beckman), durante 35 minutos a 4°C. El pellet fue resuspendido en buffer de lavado (Tris 25 mM pH 7,0 a 4°C, KCl 100 mM, 10% glicerol) y centrifugado nuevamente a 4200 rpm (rotor JS4,2, Beckman), durante 35 minutos a 4°C. El pellet se podía guardar a -70°C o ser resuspendido nuevamente en buffer de lisis (Tris 50 mM pH 7,0 a 4°C, glicerol 10%, KCl 200 mM, PMSF 1 mM, DNAsal 0,02 mg/mL, EDTA 5 mM) para continuar con el rompimiento de las células. Las células se resuspendieron en relación 1:5 en buffer de lisis y se rompieron por presión mecánica en un Microfluidizador M-110L (4 veces, 18000 psi).

El lisado celular, se centrifugó a 9000 rpm (rotor SS34, Sorvall) durante 15 minutos a 4°C para separar el pellet (células no rotas, detrito celular) y el sobrenadante fue centrifugado nuevamente a 45000 rpm (rotor Ti60, Beckman) durante 1 hora a 4°C con el fin de obtener las membranas celulares. El segundo sobrenadante corresponde a las proteínas solubles y el citosol. Los fragmentos de membrana (pellet) fueron resuspendidos en buffer de lavado (Tris 50 mM pH 7,0 a 4°C, glicerol 10%, KCl 200 mM) y centrifugados a 45000 rpm (rotor Ti60, Beckman) durante 1 hora a 4°C. Finalmente los fragmentos de membrana se resuspendieron en el mínimo volumen de buffer de lavado (aproximadamente 7 mL) y la proteína total se cuantificó por el método de Bradford. Las membranas se guardaron a -70°C. En cada uno de los pasos de centrifugación una alícuota de los pellets y sobrenadantes se guardó para analizar por dot blot la localización de la proteína expresada (Mandal *et.al.* 2002, Sharma *et.al.* 2000).

5.3.4 Detección de la proteína CtpE por SDS- PAGE y western blot

Los pellets de células obtenidos en cada uno de los ensayos de expresión fueron resuspendidos y/o diluidos en solución de SDS al 1% y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente; luego se adicionó buffer carga (5x: SDS 10%, Tris HCl 200 mM pH 6,8, glicerol 20%, de azul de bromofenol 0,05%, β- mercaptoetanol 25% o DTT 200 mM) hasta una concentración final 1x y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos y los sobrenadantes se cargaron en geles SDS-PAGE 10% (TGX Biorad). La electroforesis se llevó a cabo a 100 V durante 1 hora empleando como buffer de corrida Tris 25 mM pH 8,3, glicina 192 mM, SDS 0,1%. Una vez finalizada la electroforesis, los geles se tiñeron con solución de Coomassie (coomassie R250 0,1%, ácido acético 10%, metanol 40%) o se empleó directamente para western blot.

Para la electrotransferencia de las proteínas desde el gel de poliacrilamida a las membranas de polifluoruro de vinilideno, PVDF, (0,45 μ m) se empleó un sistema semi seco Trans-Blot SD Cell (Biorad). En este caso, se ensambló el montaje: papel filtro/membrana de PVDF/gel / papel filtro, sobre el dispositivo de transferencia. El papel filtro era previamente humedecido en buffer de transferencia (Tris 25 mM pH 8,3, glicina 150mM, metanol 10%) y la membrana de PVDF activada en metanol y lavada en el mismo buffer. Se ajustó el sistema a corriente constante 145 mA y voltaje 24V durante 1 hora. Al finalizar se separó el gel de la membrana para la inmunodetección de la proteína.

Después de la electrotransferencia, la membrana de PVDF se incubó con solución de bloqueo (leche 5% en buffer TBS (Tris HCl 10 mM pH 7,5, NaCl 150 mM)), durante 30-45 minutos a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces con buffer TBS 1x durante 5 minutos. Luego la membrana se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. En este caso se emplearon anticuerpos monoclonales anti-His de ratón (SC-8036, Santa Cruz), en una dilución 1:1000 en solución de leche 1% en buffer TBS. Al día siguiente se hicieron 3 lavados con buffer TBS 1x y se incubó la membrana con anticuerpos secundarios durante 2 horas a 4°C. Se emplearon anticuerpos policlonales anti-ratón obtenidos en conejo y acoplados a fosfatasa alcalina (A4312Sigma) en una dilución 1:1000 en solución de leche al 1% en buffer TBS. Finalmente la membrana se lavó 3 veces con buffer TBS 1x y se procedió a la detección cromogénica de la proteína con la adición de la solución del sustrato BCPI/NBT (SigmaFast, Sigma) sobre la membrana.

5.3.5 Análisis por Dot Blot

Los pellets de células, los sobrenadantes y las vesículas de membrana recolectados durante el fraccionamiento por centrifugación diferencial de los lisados celulares (sección 5.3.2), fueron resuspendidos y/o diluidos en solución de SDS al 1% hasta una concentración de 7-8 μ g/ μ L de proteína y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. Luego se centrifugaron a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos y 5 μ L de los sobrenadantes se adsorbieron sobre la membrana de PVDF junto con el control positivo (proteína Nha de *E. coli* marcada con 6xHisTag en C- terminal (Mager *et. al.* 2011) y el control negativo (vesículas de membrana de *E. coli* sin transformar). Para la detección de la proteína recombinante se siguió el mismo protocolo de inmunodetección descrito en la sección 5.3.4.

5.3.6 Experimentos de solubilización de proteína CtpE a pequeña escala

Los experimentos de dot blot indicaron que la proteína recombinante CtpE se localizó en las membranas plasmáticas de *E. coli*, por lo tanto se realizaron ensayos a pequeña escala (200 μ L) de solubilización de CtpE utilizando diferentes detergentes: iónicos como SDS (dodecilsulfato de sodio, aniónico) y Cholate (colato de sodio, aniónico); no iónicos como Triton X 100, DM (n-decil- β -maltosido), OG (n-octil- β -piranosido), NG (neopentil

glicol) y DM (n-dodecil- β -maltopiranosido); y zwitteriónicos como PhosK, Zwittergent y LDAO (óxido de laurildimetilamina). Los fragmentos de membrana (5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ concentración final) fueron incubados con soluciones de cada detergente al 1% (concentración final), a temperatura ambiente durante 1 hora con agitación constante. El material insoluble fue separado por centrifugación a 13000 rpm en una microcentrífuga durante 5 minutos, y los sobrenadantes fueron analizados por dot blot (Lewinson *et.al.*, 2008).

5.3.7 Cuantificación de proteína

La cuantificación de proteína se llevó a cabo por el método de Bradford. Brevemente, en placas de 96 pozos se adicionaron 200 μL de solución de Coomassie R (Biorad) y 5 μL de muestra, se incubó a temperatura ambiente durante 5 minutos para desarrollar el color y se hicieron lecturas de absorbancia a 562 nm. Para la curva de calibración se empleó como patrón solución de BSA entre 0,125 mg/mL-1,000 mg/mL (Bradford, 1976; Ventrella *et. al.* 2010).

5.4 Ensayos de actividad ATPasa

Los ensayos de actividad ATPasa se llevaron a cabo siguiendo la metodología propuesta por Lanzetta *et. al.* (1979), cuantificando colorimétricamente el fosfato inorgánico (Pi) liberado en la hidrólisis enzimática de ATP. Para esto, se realizó una curva de calibración de fosfatos con concentraciones entre 5 – 300 μM de NaH_2PO_4 en la que se interpolaron los resultados obtenidos.

Inicialmente, se determinó la actividad ATPasa basal en las vesículas de membrana, lo que significa que es estimulada únicamente por Mg^{2+} en el medio de reacción. Esta actividad es debida a la presencia de Mg^{2+} ATPasas en la membrana plasmática de *E. coli* y esta implícita en estos ensayos debido a que el Mg^{2+} es un cofactor de las ATPasas tipo P. Los ensayos se llevaron a cabo en placas de ELISA de 96 pozos. En un volumen final de reacción de 25 μL compuesto por: HEPES 20 mM pH 7,2, glicerol 15% EGTA 0,25 mM y MgCl_2 2 mM, se añadieron 0,2 mg/mL de proteína (vesículas de membrana) y Tris ATP hasta una concentración final de 1 mM, lo que da inicio a la reacción. A continuación, las muestras se incubaron a 25°C durante 10 minutos, tiempo en el que la reacción enzimática se detuvo por la adición de 175 μL de solución de H_2SO_4 20 mM. Una vez finalizada la reacción, se añadieron a cada muestra 15 μL de solución de 14 mM verde malaquita/ 40% H_2SO_4 y 0,02% molibdato de amonio/Tween 0,4%, lo que lleva a la formación de un complejo coloreado, que se mantiene estable al incubar a 25°C durante 30 minutos. Finalmente, la concentración de complejo se midió determinando la absorbancia a 645 nm e interpolando en la curva de calibración. Las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo por triplicado, y la actividad ATPasa se reportó como μmol de Pi liberado/mg de proteína*minuto a 25 °C y pH 7,2.

Una vez determinada la actividad basal, en experimentos independientes, se determinó la actividad ATPasa específica en las vesículas de membrana, estimulada por los cationes: Ca^{2+} , Na^+ y K^+ . Para este caso se siguió el mismo protocolo descrito anteriormente, pero las reacciones se suplementaron individualmente con alguna de las siguientes sales CaCl_2 30 μM , NaCl 130 mM y KCl 40 mM, concentración final.

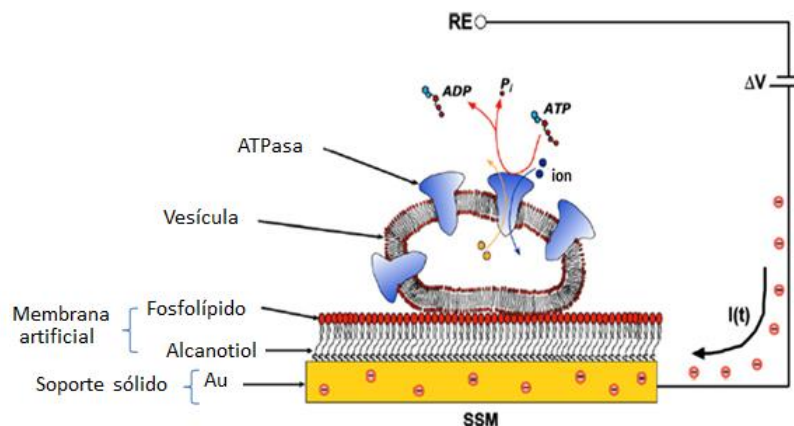
En todos los experimentos, la actividad ATPasa medida en las vesículas de membrana de *E. coli* expresando CtpE (*E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE) se comparó con la actividad determinada en vesículas de membrana de *E. coli* sin transformar utilizado como control.

Finalmente, la actividad ATPasa tipo P se determinó suplementando las reacciones con el inhibidor específico vanadato (VO_4^{3-}). Para estos ensayos, específicamente a cada muestra se agregó vanadato de sodio (Na_3VO_4) al medio de reacción a una concentración final de 50 μM , justo antes de añadir la proteína, y el protocolo se continuó como lo descrito anteriormente.

5.5 Medidas electrofisiológicas del transporte iónico en membranas soportadas en sólido (SSM)

En la técnica de membranas soportadas en sólido (SSM), las vesículas de membrana que contienen la proteína de interés son adsorbidas sobre SSM y activadas por un cambio rápido (o “salto”) en la concentración de sustrato. La traslocación de carga es medida por acoplamiento capacitivo de la membrana soportada (sección 2.7.2), la cual esta conectada a un circuito de medida externo (Figura 5-1).

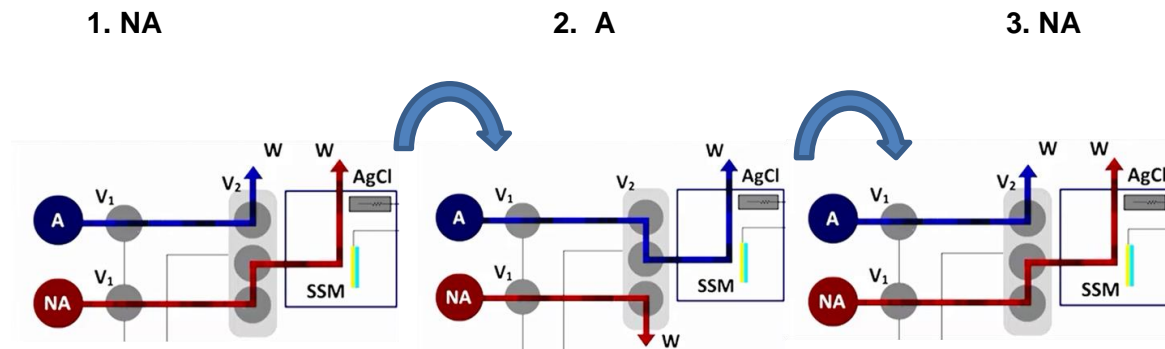
Figura 5-1: Esquema de una vesícula de membrana que es adsorbida sobre una membrana soportada en sólido (SSM). En el caso de ATPasas tipo P, la proteína es activada por ATP. La SSM esta soportada sobre el electrodo de oro (Au), el cual a su vez esta conectado a un circuito de medida externo. RE es el electrodo de referencia de Ag/AgCl (Modificado de Tadini *et.al*, 2008).



Experimentalmente un “salto” en la concentración de sustrato se logra gracias a un intercambio rápido entre las soluciones activadora (A) y no activadora (NA) que están en

contacto con SSM. Las soluciones A y NA tienen exactamente la misma composición, sin embargo la solución A también contiene el sustrato para la proteína transportadora, que en el caso de las ATPasas tipo P es el ATP. Una vez la ATPasa es activada en presencia del ion transportado, se genera una corriente eléctrica que puede ser medida (Figura 5-2).

Figura 5-2: Esquema del protocolo de intercambio de soluciones activadora (A) y no activadora (NA) en un experimento típico de SSM. Las dos soluciones son secuencialmente conducidas a través de la cubeta que contiene la SSM en tres pasos: NA/A/NA. V1 y V2 conjunto de válvulas que controla el flujo de soluciones. W desecho, (*waste*). SSM, membrana soportada en sólido. AgCl (electrodo de referencia). (Modificado de Bazzone *et.al.* 2012)



La configuración general del sistema SSM consiste de: 1) cámara faradéica con una vía para el intercambio de soluciones y 2) circuitos externos para la amplificación de la señal y la adquisición y análisis de datos (Figura 5-3). La cámara faradéica incluye los contenedores de las soluciones A y NA (botellas de polietileno presurizadas con gas nitrógeno a una presión de 0,5 bar), válvulas y tubos requeridos para el control del flujo de soluciones (controladas por computador), así como la cubeta donde se encuentra la SSM sobre el electrodo de oro (Figura 5-4). La cubeta se conecta a un amplificador y un generador en el circuito externo.

Figura 5-3: Configuración general del sistema SSM. 1) cámara faradéica. 2) sistema de adquisición y análisis de datos. 3) manómetro digital para controlar la presión en el flujo de soluciones A/NA. 4) amplificador 5) generador 6) osciloscopio.

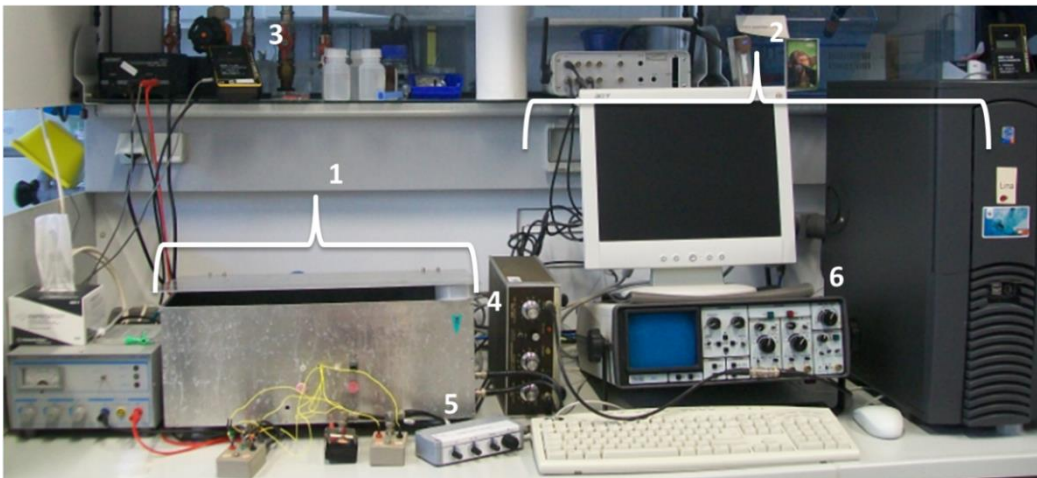
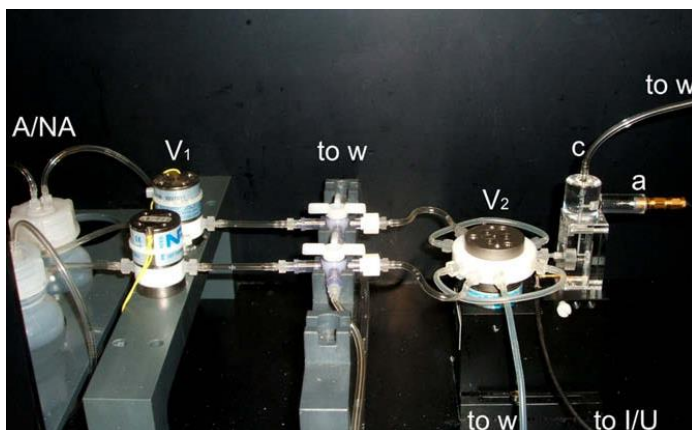


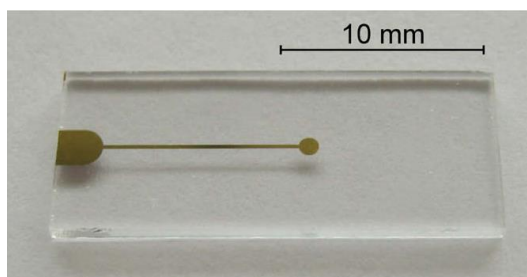
Figura 5-4: Interior de la cámara faradéica del sistema SSM. Se incluye el sistema completo de flujo de soluciones A /NA sobre SSM. Está compuesto por válvulas (V1 y V2), contenedores de las soluciones (A/NA) y la cubeta **c** conteniendo el electrodo de oro sobre el que se forma la SSM. **to w** (desecho), **a** (conexión al amplificador), **to I/U** (conexión al generador). (Tomado de Schulz *et. al.* 2008).



5.5.1 Preparación del montaje

El electrodo de oro sobre el cual se ensambla la SSM se ubica sobre una lámina de vidrio como se muestra en la Figura 5-5, el conjunto se conoce como chip sensor. La película de oro se compone de dos partes conectadas por un delgado filamento. La parte que tiene la mayor área superficial es la que será conectada al amplificador, mientras que la parte circular hacia el centro, es el lugar donde se forma la SSM.

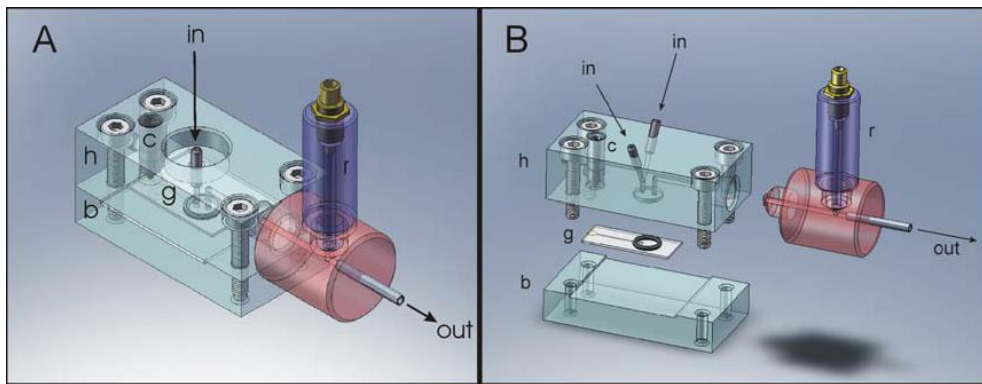
Figura 5-5: Chip sensor que contiene el electrodo de oro sobre el cual se ensambla la SSM. La parte circular es el sitio donde se ensambla la SSM tiene un área de 1mm^2 . La parte de mayor área superficial es el sitio de contacto con el amplificador (Tomado de Schulz *et. al.* 2008).



El chip sensor es incubado previamente por un periodo de 6 horas en solución etanólica de octadecanotiol 1mM con el fin de que una primera monocapa de octadecilmercaptano se autoensamble sobre la superficie de oro (Pintschovius y Fendler 1999). Luego, el chip se seca bajo una corriente de nitrógeno gaseoso. Posteriormente, se adicionan $2\mu\text{L}$ de una solución de lípidos (15mg /mL difitanoilfosfatidilcolina disuelto en n-decano) sobre el electrodo de oro, de esta manera, se autoensambla una segunda monocapa para dar lugar a la bicapa lipídica o SSM.

Este chip con la SSM formada, se dispuso en una cubeta como la que se observa en la Figura 5-6. Esta cubeta hecha de "Plexiglass", consta de una parte superior y una parte inferior (h y b, respectivamente) entre las que se encuentra el chip sensor ubicado de tal manera que la parte circular del electrodo de oro quede justo debajo del orificio de entrada de soluciones (in). En el orificio de salida (out) se conecta el electrodo de referencia. Este electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl el cual se separa de la vía por donde fluyen las soluciones mediante un puente salino de acrilamida saturado con 100mM de KCl.

Figura 5-6: Cubetas utilizadas como soporte para el chip sensor con la SSM. La cabeza (h) y base (b) de las cubetas están hechas de "Plexiglass". El chip sensor (g) está ubicado justo debajo del orificio de entrada (in). En el orificio de salida (out) se conecta el electrodo de referencia (r) (Tomado de Schulz *et. al.* 2008).



El montaje de la cubeta junto con el chip sensor se coloca en la cámara faradéica (Figura 5-4) y se conectan los electrodos; mientras que el electrodo de oro se conecta al amplificador de corriente (10^9 V/A), el electrodo de referencia se conecta a un generador.

Una vez la válvula V_2 es conectada al orificio de entrada de solución de la cubeta (Figura 5-4), la SSM se lava con solución no activadora (NA) y se miden los parámetros de la membrana (capacitancia y conductancia) hasta que permanezcan constantes después de aproximadamente 1 hora. Para la medición de la capacitancia se aplicó un potencial de onda triangular de 50mV mientras que para la conductancia se aplicó un pulso de voltaje positivo de 100mV y se midió la corriente después de 1 s de aplicado el pulso. Se aceptaron valores de 300-500nF/cm² para la capacitancia y 100-200nS/cm² para la conductancia. Las señales fueron registradas con el software SurfE R One Control Version 3.5.2 (2004).

5.5.2 Adición de las vesículas de membrana *E. coli* TOP10 CtpE

Las vesículas de membrana fueron diluidas a una concentración de 10 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ con buffer de lavado (sección 5.3.2) y sonicadas tres veces (50 W, 30 kHz) durante 10 s con intervalos de enfriamiento de 20 s en hielo.

Una vez los parámetros de la SSM eran adecuados (capacitancia y conductancia), se desconectó el electrodo de referencia momentaneamente para aplicar 30 μL de la suspensión de vesículas de membrana a la SSM por medio del orificio de salida (out) de la cubeta (Figura 5-6). El electrodo de referencia se conectó nuevamente y se permitió que las vesículas de membrana se adsorbieran a la SSM durante 1 hora. Después de este tiempo la SSM fue lavada con solución no activadora.

5.5.3 Protocolo de intercambio de soluciones

Todas las medidas eléctricas en SSM se llevaron a cabo mediante un protocolo de intercambio sencillo de soluciones. Esto significa que las dos soluciones, A /NA son secuencialmente conducidas a través de la cubeta que contiene la SSM en tres pasos: NA/A/NA. Durante el experimento se asegura que se establezca un continuo flujo de soluciones. Este protocolo produce un salto en la concentración de ATP en la SSM iniciando el desplazamiento de carga (Schulz *et. al.* 2008).

En la Tabla 5-5 se indica la composición de las soluciones utilizadas para las medidas del transporte en SSM. Para cada catión a ser probado sobre las vesículas de membrana que contienen a CtpE, se preparó una pareja de soluciones A/NA. Cada conjunto de soluciones corresponde a un experimento diferente. Las señales fueron registradas con el software SurfE R One Control Version 3.5.2 (2004).

Tabla 5-5: Composición de las soluciones preparadas para las medidas electrofisiológicas en vesículas de membrana de *E. coli* TOP10 CtpE adsorbidas a la SSM. Todas las soluciones contenían 25 mM MOPS pH 7,0, 2 mM MgCl_2 y 0,2 mM DTT, además de la concentración de iones a ser probados y la cantidad de cloruro de colina (CholCl) necesaria para mantener la fuerza iónica constante en todas las medidas.

Sistema a ser medido	Salto en la concentración de ATP	
	A	NA
K^+	KCl 50mM CholCl 80mM TrisATP 300 μM	KCl 50mM CholCl 80mM
Na^+/K^+	NaCl 80mM KCl 50mM TrisATP 300 μM	NaCl 80mM KCl 50mM
Na^+	NaCl 80mM CholCl 50mM TrisATP 300 μM	NaCl 80mM CholCl 50mM
Ca^{2+}	0,25mM EGTA 0,5mM Ca^{2+} (50 μM libre) 129,5mM CholCl TrisATP 300 μM	0,25mM EGTA 0,5mM Ca^{2+} (50 μM libre) 129,5mM CholCl
Mg^{2+} (Basal)	Tris ATP 300 μM	

6. Resultados y Discusión

Las ATPasas tipo P son proteínas integrales de membrana, ubicuas en la naturaleza, que cumplen funciones importantes a nivel celular. Estas proteínas están involucradas en el proceso de transporte de iones y lípidos a través de la membrana, y por tanto contribuyen al mantenimiento de los gradientes iónicos y la homeostasis celular.

En el caso de las micobacterias, durante los últimos años ha surgido un gran interés en la caracterización de estas bombas, especialmente las transportadoras de metales pesados, las cuales podrían jugar un papel importante en la virulencia de la especie patógena *M. tuberculosis*. La regulación de la concentración de iones metálicos es fundamental en la fisiología de la interacción hospedero- patógeno. Una vez el bacilo es fagocitado, durante la maduración del fagosoma se produce una gran variación en las concentraciones de iones como Ca^{2+} , K^+ y Cl^- , que indirectamente está relacionado con su acidificación (Soldati y Neyrolles, 2012). Además, la micobacteria debe soportar concentraciones tóxicas de metales pesados como Zn^{2+} y Cu^{2+} . Un mecanismo de defensa que utiliza el macrófago para restringir a la micobacteria y facilitar su eliminación (Botella H. *et.al.* 2011).

M. tuberculosis posee en su genoma 12 genes que codifican para ATPasas tipo P, el mayor número reportado hasta el momento para una bacteria, (*ctpA*, *ctpB*, *ctpC*, *ctpD*, *ctpE*, *ctpF*, *ctpG*, *ctpH*, *ctpl*, *ctpJ*, *ctpV* y *kdpB*), lo que se presume daría una gran versatilidad a la micobacteria para sobrevivir dentro del macrófago (Agranoff, 2004). Sin embargo, la especificidad de sustrato para estas ATPasas solo ha sido establecida experimentalmente para tres de ellas.

Estudios realizados por Raimunda *et. al.* (2012) en *M. smegmatis* permitieron identificar que el gen *ctpD* codifica una $\text{Co}^{2+}/\text{Ni}^{2+}$ - ATPasa, lo que permitió extrapolar los resultados a su contraparte en *M. tuberculosis* también anotado como *ctpD*. Por otro lado, mediante la construcción de mutantes de *M. tuberculosis* también se pudo establecer que los genes *ctpV* y *ctpC* codifican para ATPasas transportadoras de Cu^{2+} y Zn^{2+} , respectivamente. (Ward S. *et.al.* 2010 y Botella H. *et.al.* 2011). Los reportes anteriores, concuerdan con las predicciones bioinformáticas realizadas por parte de nuestro grupo de investigación (sección 6.1; Novoa. *et.al.*, 2012), en las que también se propone a CtpE como una Na^+ ATPasa tipo P, la enzima que es el objeto de la presente investigación.

6.1 Antecedentes

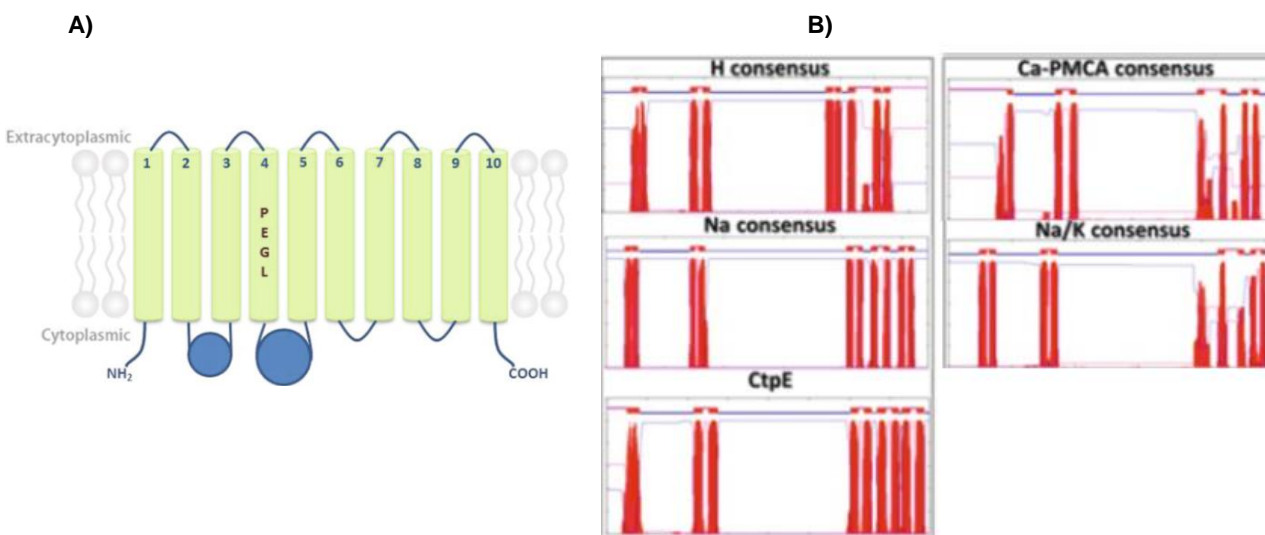
La presencia de una posible Na^+ ATPasa tipo P en la membrana plasmática de *M. tuberculosis* se ha propuesto en nuestro grupo de investigación desde dos aproximaciones diferentes: Primero, por medio de estudios bioinformáticos, los cuales sugieren la presencia de un transportador de Na^+ .

Inicialmente, las bombas identificadas en *M. tuberculosis* CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI, CtpJ, CtpV y KdpB, fueron clasificadas en tres grupos: 1. transportadores de metales pesados, 2. transportadores de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos y 3. KdpB que corresponde a la subunidad β de una ATPasa multimérica procarionota transportadora de K^+ (Novoa . *et. al.* 2012).

El grupo de transportadores de metales pesados esta compuesto por CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV y podrían transportar Cu^+/Cu^{2+} (CtpA, CtpB y CtpV), Zn^{2+} (CtpC) y Co^{2+}/Ni^{2+} (CtpD, CtpG y CtpJ). Por otro lado, CtpE, CtpF, CtpH y CtpI son transportadores de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos como: Na^+ , K^+ , Ca^{2+} y Mg^{2+} ; finalmente KdpB, la cual a pesar de contener los motivos característicos de fosforilación de las ATPasas tipo P, no posee sitios de unión a ion, esta proteína tiene una alta identidad con la subunidad β de una ATPasa multimérica transportadora de K^+ de *E. coli* (Novoa *et. al.* 2012).

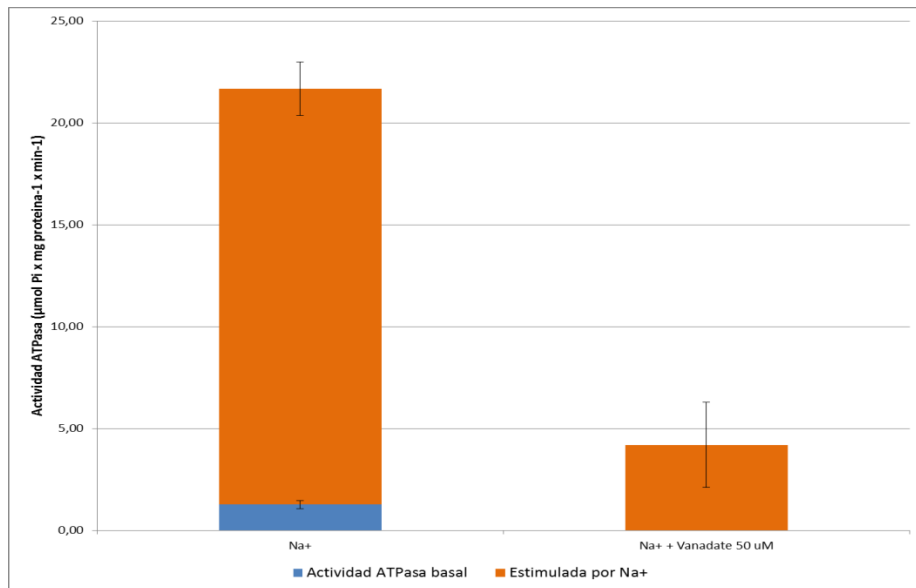
Los transportadores de iones de metales alcalinos y alcalinotérreos (CtpE, CtpF, CtpH y CtpI), poseen 10 segmentos transmembranales (Figura 6-1), y dos loops citoplasmáticos que incluyen los sitios de fosforilación [DKTGTLT] y sitios de unión a ATP [DARE] y [VISGD]. También poseen el sitio [PEGL] el cual ha sido asociado a transportadores de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ (Thever y Saier, 2009). Estudios adicionales a partir de los perfiles de hidrofobicidad y “agrupamiento topológico” permitieron proponer a CtpE como una posible Na^+ ATPasa tipo P (Novoa *et. al.* 2012, Lewinson O. *et.al.* 2009). Dicha proteína esta codificada por el gen *ctpE* (*Rv0908*), tanto en el genoma de la cepa virulenta como de la cepa no virulenta de *M. tuberculosis*: H37Rv y H37Ra, respectivamente.

Figura 6-1: Predicciones bioinformáticas de la topología y perfil de hidrofobicidad de CtpE. A) Topología de las ATPasas tipo P del grupo de metales alcalinos y alcalinotérreos. **B)** Perfil de hidrofobicidad de la proteína CtpE y agrupamiento topológico con los consensos de otras ATPasas tipo P. (Tomado de Novoa *et.al.* 2012)



Segundo, experimentalmente se detectó la actividad ATPasa en vesículas de membrana de *M. tuberculosis* H37Ra estimulada por el aumento en la concentración de Na⁺ y en ausencia de K⁺ (Figura 6-2). Estos resultados evidencian que efectivamente *M. tuberculosis* H37Ra expresa en su membrana una enzima que transporta Na⁺ a expensas de la hidrólisis de ATP; además, debido a que dicha actividad es inhibida por vanadato, se puede asociar a una actividad ATPasa tipo P (Cuesta J., 2010).

Figura 6-2: Detección de la actividad ATPasa estimulada por Na⁺ (40 mM) y en ausencia de K⁺ sobre las vesículas de membrana de *M. tuberculosis* H37Ra. La segunda columna evidencia la disminución en dicha actividad sobre las vesículas en presencia del inhibidor (vanadato 50 μM). En naranja, actividad ATPasa estimulada por Na⁺ y en azul, actividad ATPasa basal (Cuesta J., 2010).



6.2 Construcción de los recombinantes de clonación y de expresión.

6.2.1 Primera estrategia

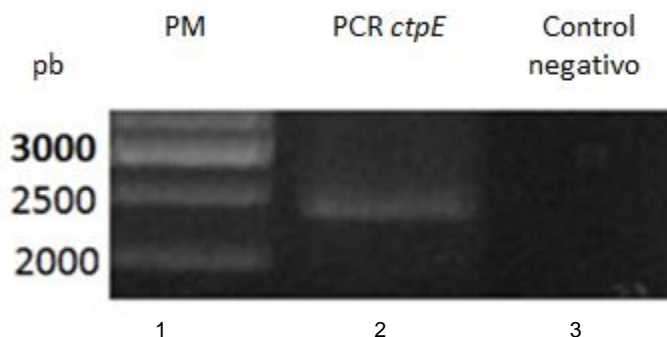
El gen *ctpE* de *M. tuberculosis* tiene una longitud de 2394 pb y codifica un polipéptido de aproximadamente 83 kDa, el cual corresponde a una única subunidad para la posible Na⁺ ATPasa tipo P (Tuberculist <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>).

Al iniciar este trabajo se planteó una estrategia de clonación del gen *ctpE* en el vector de clonación pGEMT- easy, seguida por la liberación del fragmento de interés por digestión con enzimas de restricción y subclonación en el vector de expresión pET 19b (Anexo A). El vector pET 19b solo tiene 3 secuencias de restricción en su MCS reconocidas por las enzimas *Bam*HI, *Nde*I y *Xho*I. Los sitios de restricción de las enzimas *Bam*HI y *Nde*I se encuentran en la secuencia del gen *ctpE*, por tanto, los iniciadores CtpEFw1 y CtpERev1 diseñados para amplificar el gen desde DNA genómico, solo incluían el sitio de

restricción *Xho*I, de esta manera se esperaba insertar la misma secuencia de restricción (C[^]TCGAG) en los extremos 5' y 3' del fragmento amplificado.

Empleando DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv como plantilla, se logró amplificar por PCR un fragmento del tamaño esperado, aproximadamente 2500 pb (Figura 6-3). La banda obtenida no es muy intensa, indicando la baja eficiencia de la reacción debido probablemente al tamaño del fragmento y al alto contenido de G + C en la región de interés (%GC 63,5), y por tanto la presencia de estructuras secundarias en el DNA que impiden el progreso de la DNA polimerasa (Kolmodin L y Birch D., 2002). Sin embargo, el incremento en la concentración de Mg²⁺ o la adición de DMSO al medio de reacción, no tuvieron ningún efecto en la cantidad de producto obtenido.

Figura 6-3: Amplificación por PCR del gen *ctpE* (*Rv0908*) a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv. En el carril 1 se observa el patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, producto de amplificación obtenido (2522 pb); 3, control negativo de la reacción (reacción sin DNA plantilla). (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE y teñido con bromuro de etidio).



La Dream Taq DNA polimerasa empleada, genera extremos 3' - dA, por lo que es posible clonar el producto de la reacción en vectores T como el pGEMT-easy. En este caso, el fragmento *ctpE* podría insertarse en dos orientaciones diferentes como se observa en la Figura 6-4; sin embargo, esto no representaría ningún inconveniente para la liberación del fragmento por digestión con la enzima de restricción *Xho*I.

La identificación de colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el recombinante de interés, se basó en la selección blanco/azul (α - complementación). Para confirmar la presencia del recombinante en las colonias de color blanco, se llevó a cabo PCR en colonia empleando los iniciadores T7 y SP6 que hibridan en el vector en los extremos del inserto, gen *ctpE*, (52 pb corriente arriba y 136 pb corriente abajo del sitio de clonación, respectivamente). El tamaño del producto de PCR esperado era de 2697 pb. En principio se logró identificar una posible colonia positiva (colonia b3), es decir, que estuviera transformada con alguno de los recombinantes esperados (Figura 6-5 A). Sin embargo, análisis posteriores con la enzima de restricción *Xho*I sobre el plásmido extraído, evidenciaron que no se trataba de un clon positivo pGEMT easy- CtpE, ya que no se obtuvo el patrón de bandas esperado, el que correspondería a la liberación del fragmento *ctpE* de 2505 pb desde el vector (Figura 6-5 B).

Figura 6-4: Mapa de los posibles recombinantes de clonación pGEMT easy- CtpE. A) Inserto *ctpE* (flecha naranja) clonado en marco de lectura correcto y **B)** en sentido opuesto. Gen de resistencia a ampicilina (incluido el promotor) en morado y origen de replicación en rojo. En verde se muestran los promotores T7 y *lac*. (Imágenes creadas con la herramienta BVTech Plasmid 5.1).

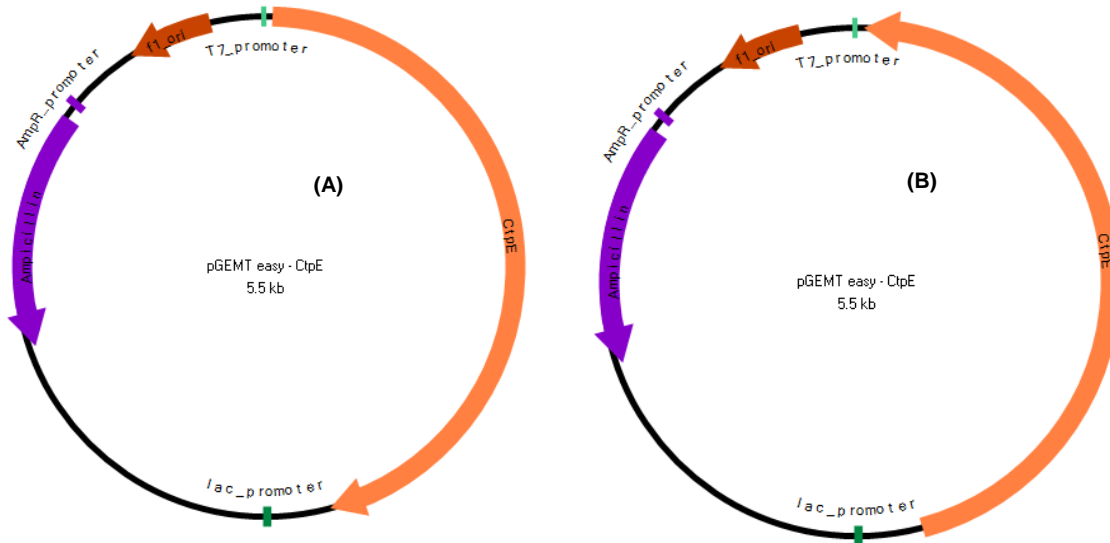
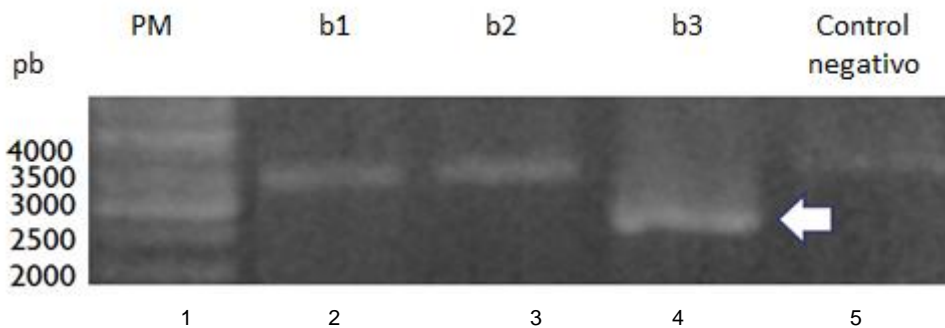
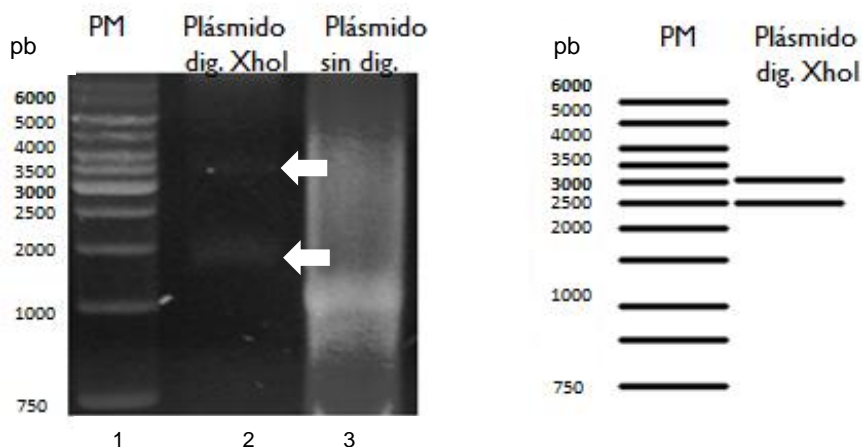


Figura 6-5: Tamizaje de colonias mediante PCR y mapeo de restricción para la identificación de los posibles clones pGEMT easy – CtpE. A) La PCR en colonia se realizó sobre 3 colonias blancas de *E. coli* TOP10 (b1, b2, b3). Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, colonia b1; 3, colonia b2; 4, colonia b3; 5, control negativo (colonia de *E. coli* TOP10 sin transformar). La flecha indica un producto de amplificación en el tamaño esperado (2797 pb) únicamente para la colonia b3 (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio) **B)** Mapeo de restricción de la colonia b3. A la izquierda, gel de agarosa: Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, digestión con la enzima de restricción XhoI del plásmido extraído a partir de la colonia b3; 3, DNA plasmídico de la colonia b3 sin digerir. Las flechas indican la posición de las bandas observadas alrededor de 3500 pb y 2000 pb, que no corresponden con el tamaño esperado. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio). A la derecha, diagrama representativo de los resultados esperados (fragmentos de 3035 pb y 2505 pb), realizado con la herramienta ApEA plasmid editor v2.0.4.

A)

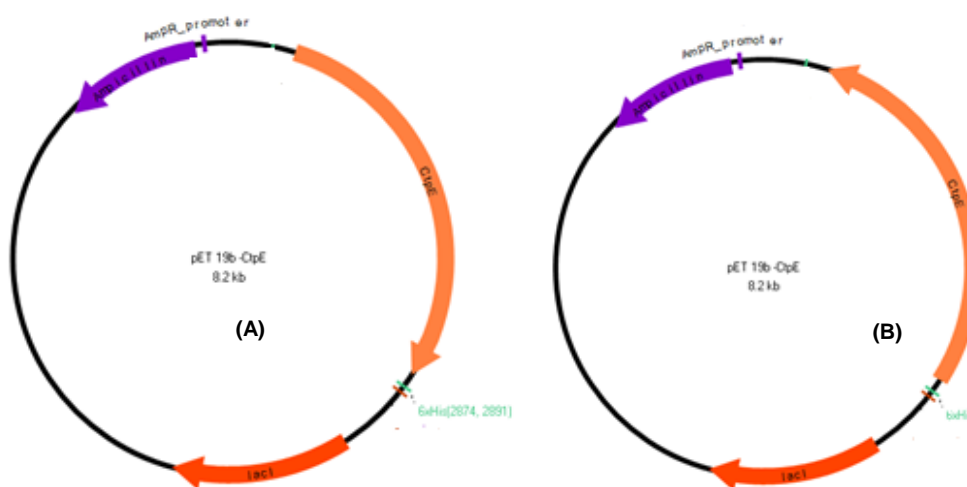


B)



Paralelamente se intentó clonar el fragmento *ctpE* en el vector pET 19b. Una vez digerido el producto de PCR y el vector de expresión con *XhoI*, después de la ligación, existía la posibilidad de obtener dos tipos de recombinantes: *ctpE* podría quedar en marco de lectura correcto, o en sentido opuesto con respecto al sitio de inicio de la transcripción en el vector de expresión, pET 19b-CtpE (A) y pET 19b-CtpE (B), respectivamente, como se esquematiza en la Figura 6-6. En este experimento de clonación, solo se obtuvieron colonias de *E. coli* TOP10 transformadas con el recombinante producto de la reacción de ligación en proporción inserto:vector de 3:1 y 3:2.

Figura 6-6: Mapa de los posibles recombinantes de expresión pET19b- CtpE . A) Inserto *ctpE* (flecha naranja) clonado en marco de lectura correcto y **B)** en sentido opuesto. Gen de resistencia a ampicilina (incluido el promotor) en morado y secuencia codificante *lacI* en rojo. En verde el tag de 6 histidinas (Imágenes creadas con la herramienta BVTech Plasmid 5.1).

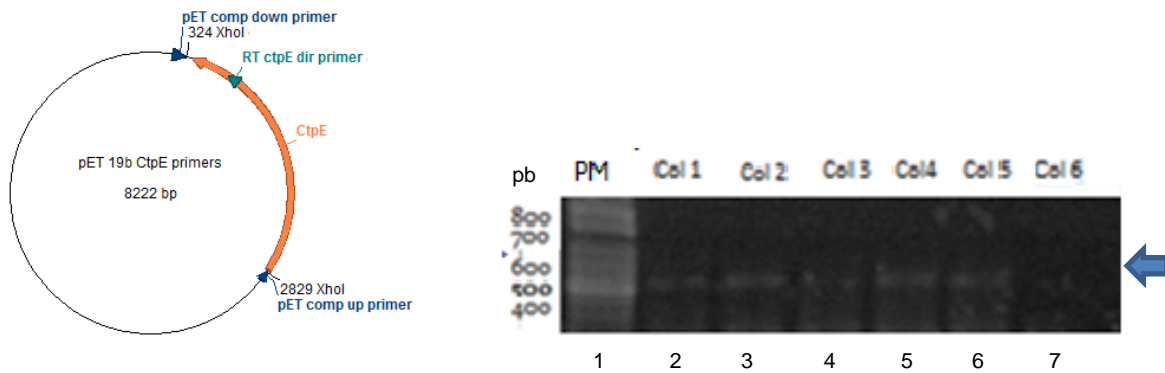


Con el fin de identificar el recombinante correcto por PCR en colonia, se diseñaron iniciadores que hibridaran tanto en el vector (pET comp down, 67 pb corriente arriba y

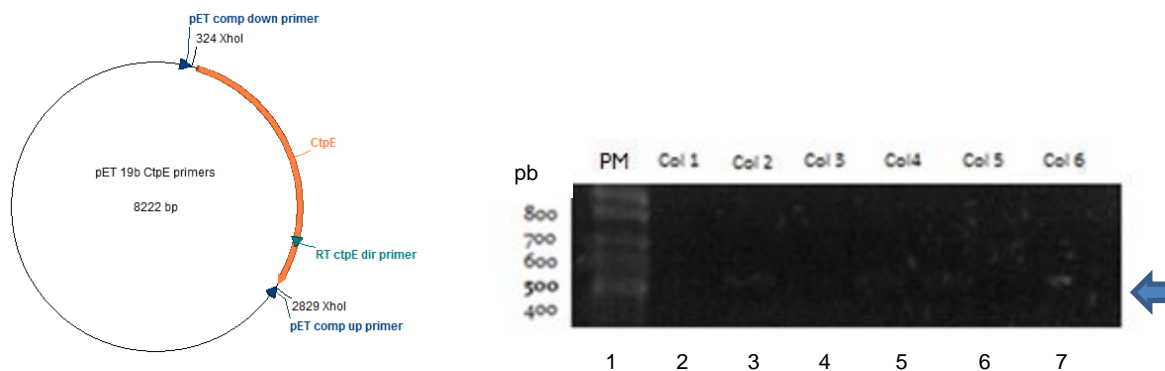
pET comp up, 43 pb corriente abajo del sitio de clonación) como en la secuencia del gen (RT *ctpE* dir entre 2398 -2387 pb del gen). De esta manera, para el recombinante pET 19b-CtpE (A) se esperaba un producto de 492 pb y en el caso de pET 19b-CtpE (B) un fragmento de 516 pb (Figura 6-7). Los resultados de PCR en colonia fueron sorprendentes; al parecer los 40 clones seleccionados correspondían al recombinante pET19b – CtpE (B). En efecto, en la Figura 6-7 solo se observa un producto del tamaño esperado para el plásmido en el cual el inserto está en marco de lectura opuesto al sitio de inicio de la transcripción.

Figura 6-7: PCR en colonia para los posibles clones pET 19b-CtpE. A la izquierda se muestran los mapas de los posibles recombinantes de expresión: inserto *ctpE* (naranja), iniciadores pET comp down y pET comp up (azul oscuro), iniciador RT *ctpE* dir (azul claro). A la derecha se muestran los productos de amplificación por PCR para 6 colonias de *E. coli* TOP10 (Col1 –Col6) (Geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE teñidos con bromuro de etidio. PM: Patrón de peso molecular Axygen 100pb). **A)** Recombinante pET 19b-CtpE(B) y resultado de la PCR con los iniciadores pET comp down y RT *ctpE* dir, la flecha indica la posición del producto obtenido en aproximadamente 500 pb. **B)** Recombinante pET 19b-CtpE(A) y resultado de la PCR con los iniciadores pET comp up y RT *ctpE* dir, la flecha indica la posición esperada del producto (492 pb), no se observa ninguna banda. Los resultados demuestran que todos los recombinantes presentaban la orientación en marco de lectura opuesto del inserto en el vector.

A)



B)



Este intento de construir el recombinante de expresión evidenció la dificultad de continuar con la primera estrategia planteada; se esperaba que la ligación del inserto y el vector digeridos con solo una enzima de restricción, produjera proporciones equivalentes de los recombinantes pET19b - CtpE (A) y (B), sin embargo, se ha reportado que en estos casos, cuando se obtiene solo uno de los posibles productos, es debido a que el recombinante en la orientación contraria es inviable (Boyd, 1993).

Los resultados anteriores permitieron identificar las principales fallas en la primera estrategia de clonación para la obtención de los dos constructos. Primero, la baja eficiencia de la PCR en la obtención del fragmento *ctpE*, y la posible degradación de los extremos 3' dA del amplicón o dT en el vector, que impidieron la clonación del gen en el vector pGEMT-easy (Guo y Bi, 2002). Así mismo, los problemas surgidos durante la clonación del inserto en el vector pET 19b, que habrían favorecido la obtención del recombinante de expresión incorrecto.

Por estas razones y para facilitar la obtención del recombinante de expresión se decidió plantear una nueva estrategia de clonación dirigida. Esta vez se optó por seguir la metodología empleada por Raimunda *et.al.* (2012), quien durante el transcurso de esta investigación, reportó por primera vez la expresión heteróloga de una ATPasa tipo P de *M. smegmatis* en *E. coli* empleando el vector de expresión pBAD.

6.2.2 Segunda estrategia

Los resultados anteriores evidenciaron que una de las principales dificultades para obtener el recombinante de clonación o de expresión esperado, era la baja eficiencia de la PCR en amplificar el fragmento *ctpE* desde DNA genómico. Por tanto, fue necesario establecer nuevas condiciones de reacción para mejorar su rendimiento.

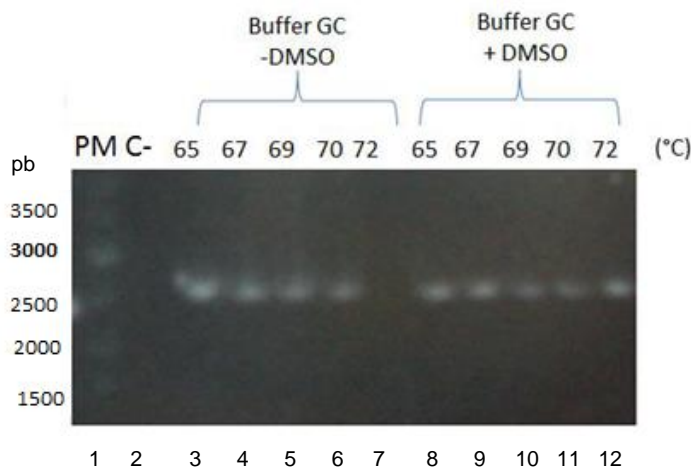
Para esta etapa del trabajo se diseñaron nuevos iniciadores EFW1 y EREV1, los cuales son totalmente complementarios a los extremos 5' y 3' del gen. Los nuevos iniciadores fueron más largos, cada uno de 28 nucleótidos, lo que aumenta su especificidad para amplificar el producto *ctpE* (Grunenwald, 2003). También se empleó una nueva enzima de alta fidelidad y procesividad, *Phusion DNA Polymerase*, lo que minimiza la inserción de mutaciones y aumenta la eficiencia de la reacción. Por último, es importante anotar que a pesar de emplear como plantilla DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Ra, esto no implica modificación alguna en el gen *ctpE*, porque la secuencia es exactamente igual en la cepa virulenta H37Rv (100% de identidad) y por tanto la proteína codificada es la misma. Esto se confirmó mediante alineamientos de la secuencia nucleotídica del gen *ctpE* de ambas cepas (Anexo C).

Los resultados de esta PCR se observan en la Figura 6-8. Simultáneamente se probaron dos condiciones de reacción empleando el Buffer GC con y sin DMSO (recomendado por el fabricante de la enzima al trabajar con plantillas ricas en G+C). Además, también se compararon los resultados cuando se variaba la temperatura de hibridación de los iniciadores entre 65 - 72°C. Para cada reacción se obtuvo una banda del tamaño

esperado 2616 pb. Al adicionar DMSO al medio de reacción, las bandas obtenidas son mas intensas; y cuando la temperatura de hibridación es muy alta (72°C) solo se obtiene el producto de reacción en presencia de DMSO. Es decir, que la adición de este cosolvente contribuye positivamente en la reacción.

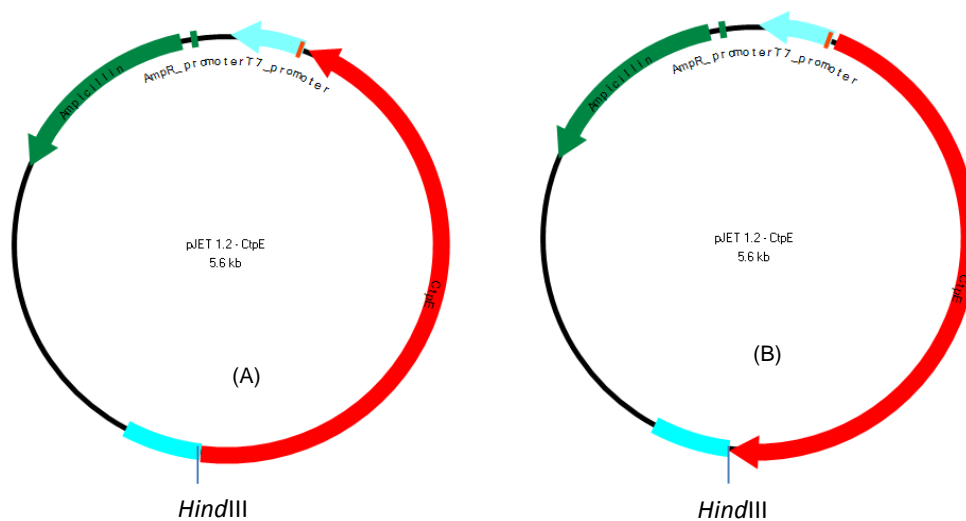
Con todas estas modificaciones realizadas se logró obtener una mayor cantidad de inserto *ctpE* a partir de DNA genómico, casi 10 veces más con respecto a la primera estrategia (1,4 - 3,0 ng/μL, con respecto a 10 – 12 ng/ μL), y empleando como material de partida solo una cuarta parte del DNA genómico. De esta forma, se produjo suficiente inserto *ctpE* para proseguir con la clonación.

Figura 6-8: Amplificación por PCR del gen *ctpE* (*Rv0908*) a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Ra. Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, control negativo (C-) de la reacción (sin DNA plantilla). Se comparan dos condiciones de reacción de PCR: empleando buffer GC sin DMSO (carriles 3-7) y buffer GC con DMSO (carriles 8-12). Adicionalmente en cada caso se prueban diferentes temperaturas de hibridación (65- 72°C). Las bandas obtenidas se encuentran en el tamaño esperado del producto, 2616 pb. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio)



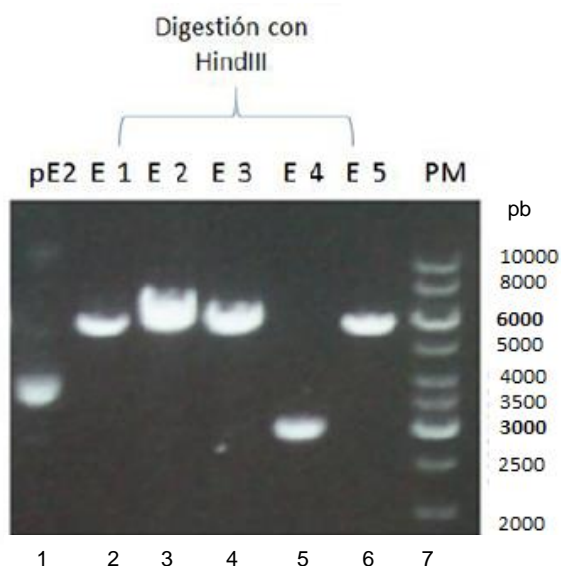
La DNA polimerasa *Phusion* genera extremos romos en los productos de amplificación. Por tanto, se decidió clonar el fragmento *ctpE* en el vector pJET 1.2 el cual es un vector de clonación cuyos extremos también son romos (Anexo A). En este caso, la eficiencia de la transformación de *E. coli* DH5 α fue muy alta y se obtuvieron mas de 500 colonias que posiblemente contenían el plásmido recombinante ($2,6 \times 10^5$ cfu/μg DNA). Para verificar la identidad de los clones, se seleccionaron 5 colonias al azar (nombradas E1-E5) para extraer plásmido y hacer un análisis de restricción. A pesar de que el recombinante tiene la posibilidad de contener el inserto en dos sentidos pJET 1.2 –CtpE (A) y pJET 1.2- CtpE (B) (Figura 6-9), el corte con solo una enzima de restricción, *HindIII*, produce el plásmido linealizado en el tamaño esperado 5590 pb.

Figura 6-9: Mapa de los posibles recombinantes pJET 1.2- CtpE(A) y pJET 1.2- CtpE(B). Inserto *ctpE* en rojo, gen de resistencia a ampicilina en verde oscuro y gen letal *eco47IR* en verde claro. (Imágenes creadas con la herramienta BVTech Plasmid 5.1)



Los resultados de la digestión sencilla se muestran en la Figura 6-10. El control negativo es el plásmido E2 sin cortar, el cual aparece cerca de 3500 pb pues migra más rápido que los fragmentos linealizados a su derecha, debido a los superenrollamientos característicos del DNA plasmídico. Cuatro de los cinco plásmidos digeridos aparecen en un tamaño aproximadamente de 6000 pb: E1, E2, E3 y E5, y muy probablemente corresponden al recombinante esperado.

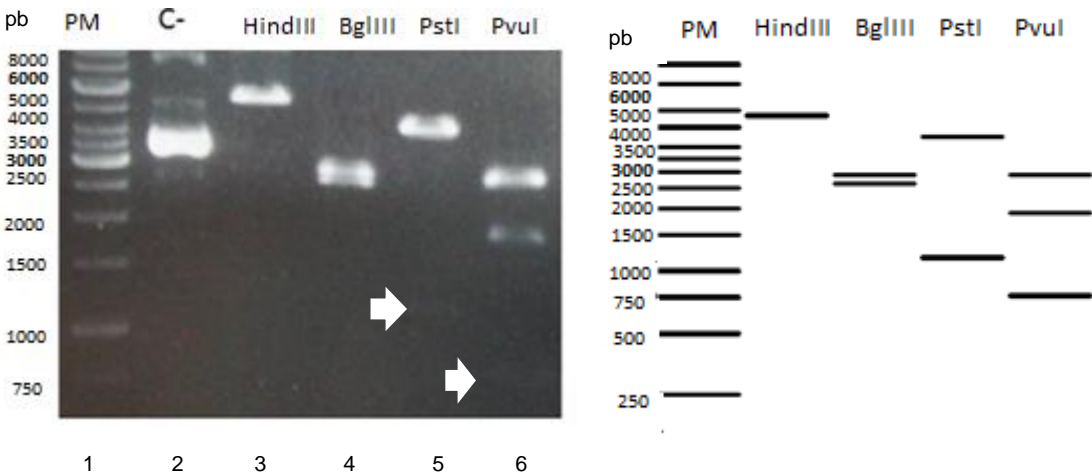
Figura 6-10: Análisis de restricción para 5 posibles clones de pJET 1.2 -CtpE. Los plásmidos extraídos (E1-E5) fueron digeridos con la enzima *HindIII*. Carril 1, control negativo plásmido E2 sin cortar (pE2); y digestión con *HindIII* de : 2, plásmido E1; 3, plásmido E2; 4, plásmido E3; 5, plásmido E4; 6, plásmido E5; 7, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas). En la digestión de los plásmidos E1, E2, E3 y E5 se obtiene una banda en el tamaño esperado 5590 pb. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio).



Debido a que la recircularización del pJET 1.2 sin inserto *ctpE* tiene un efecto letal sobre la bacteria (debido a la presencia del gen *eco47IR* en el plásmido), se esperaba que solo las colonias positivas fueran capaces de propagar el recombinante. Por esta razón, el plásmido E4 debió haber sufrido alguna modificación o mutación sobre el gen *eco47IR*, que le permitió recircularizarse y propagarse en *E. coli*.

El plásmido E2 fue analizado por mapeo de restricción y secuenciación para confirmar la obtención del recombinante pJET 1.2 –CtpE. El patrón de bandas generado por cada una de las digestiones con enzimas de restricción correspondieron a lo esperado (Figura 6-11) y el resultado de secuenciación indicó que el recombinante obtenido fue pJET 1.2 –CtpE (B), el fragmento *ctpE* estaba completo y no se presentó ningún tipo de mutación (Anexo B).

Figura 6-11: Mapeo de restricción del recombinante pJET 1.2 – CtpE. A la izquierda, gel de agarosa mostrando la digestión del plásmido con las enzimas de restricción *HindIII*, *BglII*, *PstI* y *PvuI*. Carril 1, Patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, control negativo es el plásmido sin digerir (C-); 3-6, digestión con las enzimas *HindIII*, *BglII*, *PstI* y *PvuI*, respectivamente. Las flechas indican la posición de las bandas menos intensas (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio). A la derecha, diagrama representativo de los resultados esperados. Digestión con *HindIII* (1 corte, 5590pb), *BglII* (2 cortes, 2928 pb, 2662 pb), *PstI* (2 cortes, 4440 pb, 1150pb) y *PvuI* (3 cortes, 2913pb, 1918 pb, 759pb) , realizado con la herramienta ApEA plasmid editor v2.0.4.

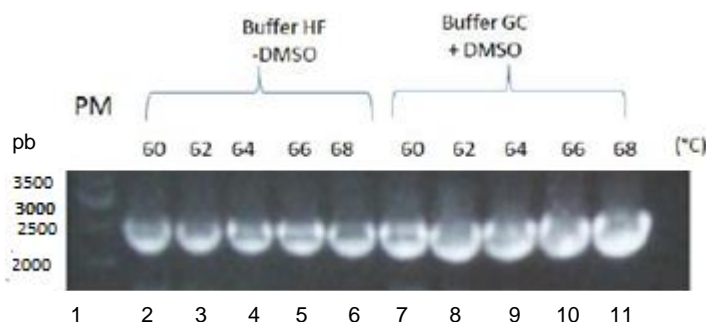


Una vez obtenido y comprobado el recombinante de clonación pJET 1.2 –CtpE, se contó con una fuente constante y abundante de DNA. El nuevo plásmido representó menor complejidad para ser usado como DNA plantilla en el siguiente paso de subclonación del gen *ctpE* en el vector de expresión pBAD. Este vector fue modificado del original (pBADA) para incluir nuevos sitios de restricción en el MCS y una secuencia 10xHis Tag que codifica una cola de 10 histidinas en el extremo C-terminal de la proteína expresada (Grupo de Biología Molecular de la Membrana, Instituto Max Planck de Biofísica, Frankfurt, Alemania). El mapa de esta versión del vector pBAD- A2 se puede consultar en el Anexo A.

En este caso, el diseño de iniciadores tuvo que ser más cuidadoso con el fin de hacer una clonación dirigida y evitar los problemas presentados en la primera estrategia. Primero, se determinó que las secuencias de restricción reconocidas por las enzimas *Bgl*II y *Eco*RI no están presentes en *ctpE* y por lo tanto podían ser insertadas en los extremos 5' de los iniciadores. Luego, fue necesario asegurar que dichos sitios de restricción permitieran la inserción del gen en marco de lectura correcto con respecto al ATG o sitio de inicio de la transcripción en el extremo 5' y la secuencia 10xHisTag en el extremo 3'. Además el codón de terminación del gen, TAA, tenía que sustituirse por un codón codificante, en este caso CGG, con el fin de que la traducción de la proteína no se interrumpiera prematuramente antes de insertar el 10 x His Tag. De esta manera se debían incluir algunos pares de bases en ambos extremos del gen, lo que representaría un aumento de 31 aminoácidos en el tamaño de la proteína expresada lo que equivale a cerca de 3 kDa.

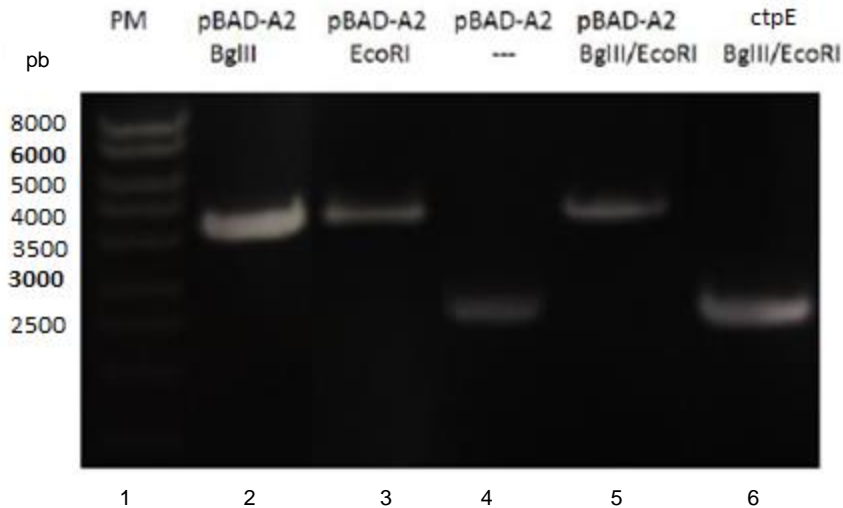
Se probaron diferentes condiciones para la reacción de PCR empleando los iniciadores E- *Bgl*II Fw y E- *Eco*RI Rev, y nuevamente la enzima de alta fidelidad *Phusion*. Los resultados de la amplificación se pueden observar en la Figura 6-12. Debido a que los iniciadores no son totalmente complementarios al DNA plantilla, se empleó un gradiente de temperatura de hibridación más bajo (60-68°C). En todas las reacciones se observó una banda aproximadamente en el tamaño esperado de 2411 pb la cual es mucho más intensa cuando se emplea el buffer GC en presencia de DMSO, con respecto al uso del buffer HF sin DMSO, condiciones recomendadas por el fabricante de la enzima al emplear DNA plasmídico como plantilla.

Figura 6-12: Amplificación por PCR del gen *ctpE* a partir DNA plasmídico del recombinante pJET 1.2 – CtpE. Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas). Se comparan dos condiciones de reacción de PCR: empleando buffer HF sin DMSO (carriles 2-6) y buffer GC con DMSO (carriles 7-11) . En cada caso se prueban diferentes temperaturas de hibridación (60- 68°C). Las bandas obtenidas se encuentran en el tamaño del fragmento esperado, 2411 pb. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio)



Posteriormente para la clonación, se llevó a cabo la digestión doble tanto del inserto *ctpE* como del vector pBAD –A2 con las enzimas *Bgl*II y *Eco*RI. En la Figura 6-13 se muestra el resultado de esta digestión; el corte del vector con las enzimas individuales es el control positivo de la digestión, comparado con el vector sin cortar (control negativo). Ambos fragmentos se emplearon directamente en la reacción de ligación.

Figura 6-13: Digestión doble del vector pBAD A2 y el fragmento *ctpE* con las enzimas de restricción *Bgl*II y *Eco*RI. Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas). Como control se utilizó plásmido pBAD -A2 cortado individualmente con *Bgl*II (carril 2) y *Eco*RI (carril 3), las bandas en aproximadamente 4000 pb corresponden al vector linealizado. Carril 4, vector pBADA2 sin cortar, cerca de 2500 pb; carriles 5 y 6, digestión doble de pBAD A2 y *ctpE* con *Bgl*II y *Eco*RI, se generan fragmentos alrededor de 4000 pb y 2400 pb, respectivamente. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio)



Se decidió transformar el producto de la ligación en las cepas de *E. coli* XL 1 Blue y TOP10. Mientras que la cepa XL 1 Blue es estrictamente una cepa de clonación y mantenimiento de plásmido, la cepa TOP10 está diseñada para la expresión de proteínas que se encuentran bajo la regulación del promotor *araBAD* como en el caso del vector pBAD -A2. La eficiencia de la transformación fue muy diferente entre ambas cepas, mientras que en XL 1 Blue se obtuvieron 87 colonias ($2,1 \times 10^4$ cfu/ μ g DNA), en el caso de TOP10 se obtuvo solo 1 colonia ($2,1 \times 10^2$ cfu/ μ g DNA); en este último caso probablemente se debió a una expresión basal de la proteína en ausencia de inductor que podría resultar tóxica para la bacteria. Para comprobar la identidad de los clones se escogieron 3 colonias de *E. coli* XL 1 Blue (eEa, eEb y eEc) y la única colonia de TOP10 (eEd) para extraer plásmido y hacer un análisis de restricción. El corte con la enzima de restricción *Eco*RI produce el plásmido linealizado en el tamaño esperado 6441 pb. En la Figura 6-14 se muestran los resultados de esta digestión sencilla, el control negativo es el plásmido eEd sin cortar. Tres de los cuatro recombinantes eEa, eEb y eEd se observan como una sola banda entre 6000 y 8000 pb y probablemente corresponden a un clon positivo. Por otro lado, el plásmido eEc aparece alrededor de 4500 pb y podría ser el vector vacío ya sea porque se recircularizó o porque no fue digerido apropiadamente durante la digestión doble y permaneció en la muestra como un contaminante.

Debido a que el plásmido eEd provenía de la colonia TOP10, se decidió hacer su análisis por mapeo de restricción y secuenciación para verificar la identidad del recombinante. Los resultados del mapeo de restricción se muestran en la Figura 6-15 y concuerdan muy bien con el patrón esperado.

Figura 6-14: Análisis de restricción para 4 posibles clones de pBADA2 –CtpE. Los plásmidos extraídos de *E. coli* XL1 Blue (eEa, eEb y eEc) y TOP10 (eEd) fueron digeridos con la enzima EcoRI. Carril 1, patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, control negativo (C-) plásmido eEd sin cortar; y digestión con EcoRI de: 3, plásmido eEa; 4, plásmido eEb; 5, plásmido eEc; 6, plásmido eEd. En la digestión de los plásmidos eEa, eEb y eEd se obtiene una banda en el tamaño esperado 6441 pb. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio)

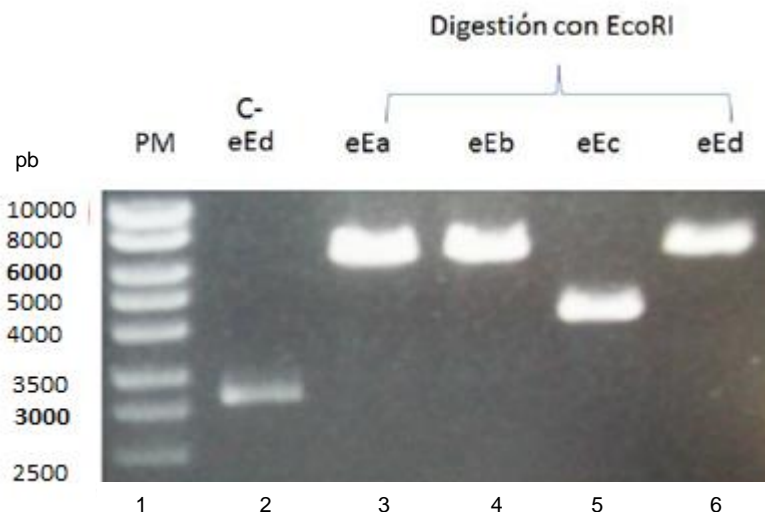
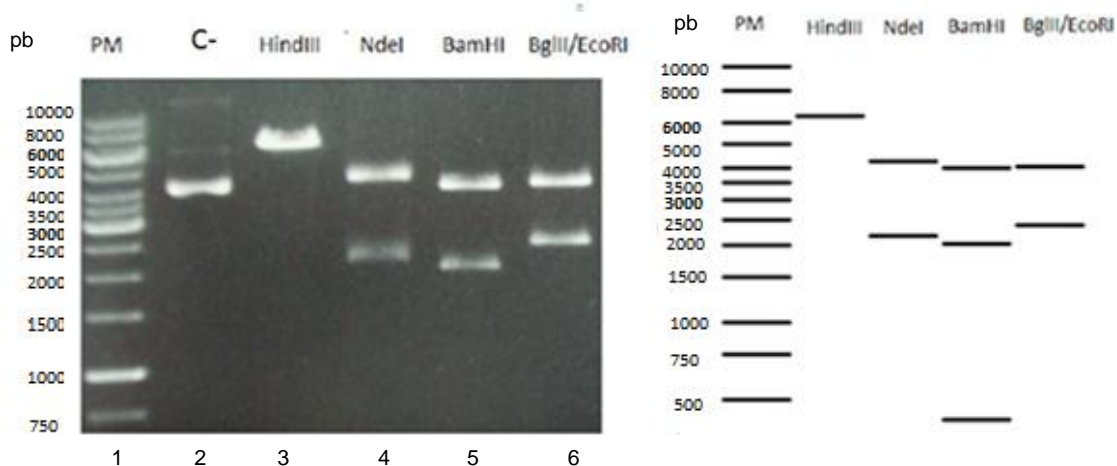
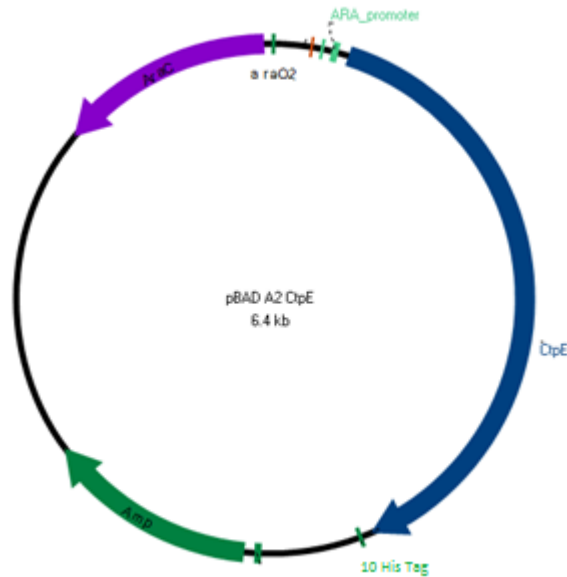


Figura 6-15: Mapeo de restricción del recombinante pBADA2 – CtpE. A la izquierda, gel de agarosa mostrando la digestión con las enzimas de restricción *HindIII*, *NdeI*, *BamHI* y *BglII/EcoRI*. Carril 1, Patrón de peso molecular (PM) Generuler 1 kb (Fermentas); 2, control negativo es el plásmido sin digerir (C-); 3-6, digestión con las enzimas *HindIII*, *NdeI*, *BamHI* y *BglII/EcoRI*, respectivamente. (Gel de agarosa al 1% preparado en buffer TAE teñido con bromuro de etidio). A la derecha, diagrama representativo de los resultados esperados. Digestión con *HindIII* (1 corte, 6441 pb), *NdeI* (2 cortes, 4276 pb, 2165 pb), *BamHI* (3 cortes, 3993 pb, 2031 pb, 417 pb) y *BglII/EcoRI* (2 cortes, 4040 pb, 2401 pb) realizado con la herramienta ApEA plasmid editor v2.0.4.



Por último, los resultados de secuenciación comprobaron que el gen *ctpE* fue clonado exitosamente en el vector de expresión pBAD- A2, el gen estaba completo, no presentó ninguna mutación y se encontraba en perfecto marco de lectura con respecto a los extremos 5´ y 3´ del vector como se describió anteriormente (Anexo B). Finalmente se obtuvo el recombinante pBAD A2- CtpE (Figura 6-16).

Figura 6-16: Mapa del recombinante de expresión pBAD A2- CtpE. Inserto *ctpE* en azul, gen de resistencia a ampicilina en verde y secuencia codificante *araC* en morado. En verde la secuencia codificante del tag de 10 histidinas (Imágenes creadas con la herramienta BVTech Plasmid 5.1)



6.3 Expresión heteróloga de la proteína CtpE en *E. coli*

6.3.1 Optimización de las condiciones de expresión de CtpE en *E. coli*

En la actualidad, la producción heteróloga de proteínas de membrana con el fin de realizar estudios funcionales y/o estructurales continúa representando un gran reto. Debido a que se trata de proteínas muy hidrofóbicas, es difícil alcanzar altos niveles de expresión de proteína funcional sin llegar a ser tóxico para la célula. Se han reportado varias estrategias para lograr la sobreexpresión de proteínas de membrana en bacterias, en las que la selección del sistema de expresión ha sido un parámetro fundamental (Padan *et. al.*, 2003).

En el caso de *M. tuberculosis*, Korepanova *et. al.* (2007, 2005) ha reportado altos niveles de expresión de un gran número de proteínas de membrana de diferentes pesos moleculares entre 12 -70 kDa, empleando como sistema de expresión *E. coli* BL21 y

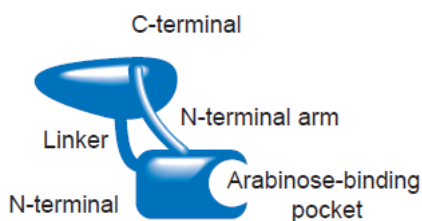
vectores basados en el promotor T7 (pET); sin embargo, ninguna de ellas corresponde a ATPasas tipo P. Solo recientemente Raimunda *et. al.* (2012) reportó por primera vez la expresión de una ATPasa tipo P funcional de una especie relacionada (*M. smegmatis*) en *E. coli*, empleando un vector basado en el promotor araBAD (pBAD) el cual es inducible por L-arabinosa.

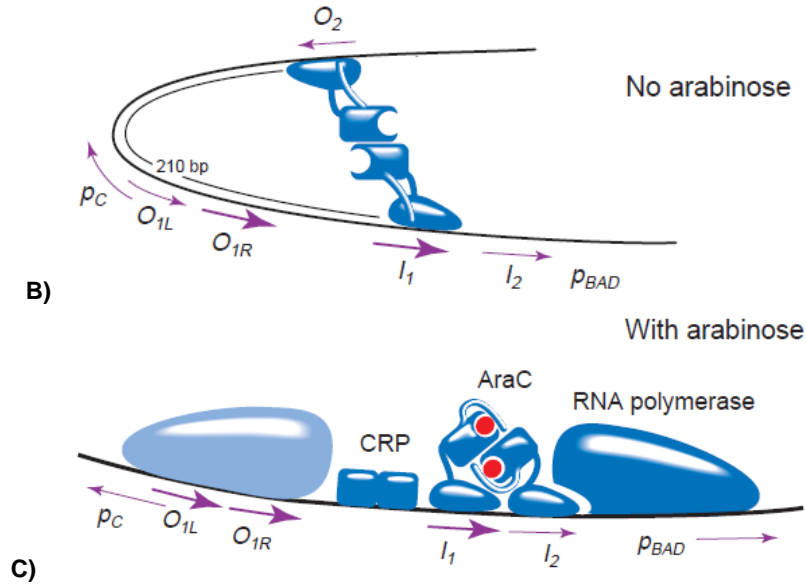
Por otro lado, estudios llevados a cabo por Lewinson *et. al.* (2008) en los que se compara los sistemas pET y pBAD para la expresión de ATPasas tipo P de diferentes organismos en *E. coli*, mostraron que al utilizar el sistema pBAD existe una mayor correlación entre los niveles de expresión de la proteína en los lisados celulares, y su presencia en la membrana plasmática. Además, debido a que el control transcripcional del promotor T7 resulta en una mayor expresión con respecto al promotor araBAD, es probable que la proteína sobreexpresada empleando el sistema pET forme agregados insolubles o cuerpos de inclusión (Lewinson *et. al.*, 2008, Korepanova *et. al.*, 2005). En este caso, la proteína difícilmente mantendría su función, se harían necesarios protocolos de repliegamiento y la reconstitución de la misma sería mas compleja (Korepanova *et. al.*, 2005). Por estas razones se decidió emplear el sistema araBAD para probar la expresión heteróloga de CtpE.

El promotor araBAD presente en los vectores pBAD esta regulado positiva y negativamente por el producto del gen *araC*, un regulador transcripcional dimérico que forma un complejo con L-arabinosa. En ausencia de arabinosa, el dimero AraC entra en contacto con los sitios I_1 y O_2 del operon araBAD formando un loop de 210 pb en el DNA. Cuando L-arabinosa se une a AraC, esta proteína sufre un cambio conformacional, provoca la liberación del sitio O_2 y se une al sitio I_2 , adjacente a I_1 (Figura 6-17). De esta forma se permite la interacción de la RNA polimerasa para que la transcripción inicie (Schlief, 2000; Sørensen y Kusk, 2005).

Figura 6-17: Regulación del promotor araBAD por L-arabinosa. A) Estructura dimérica de AraC **B)** Regulación del promotor en ausencia de L-arabinosa. AraC está en contacto con los sitios I_1 y O_2 del operon araBAD formando un loop de 210 pb en el DNA **C)** Regulación del promotor en presencia de L-arabinosa. AraC se une al sitio I_2 , adjacente a I_1 (Tomado de Schlief, 2000)

A)



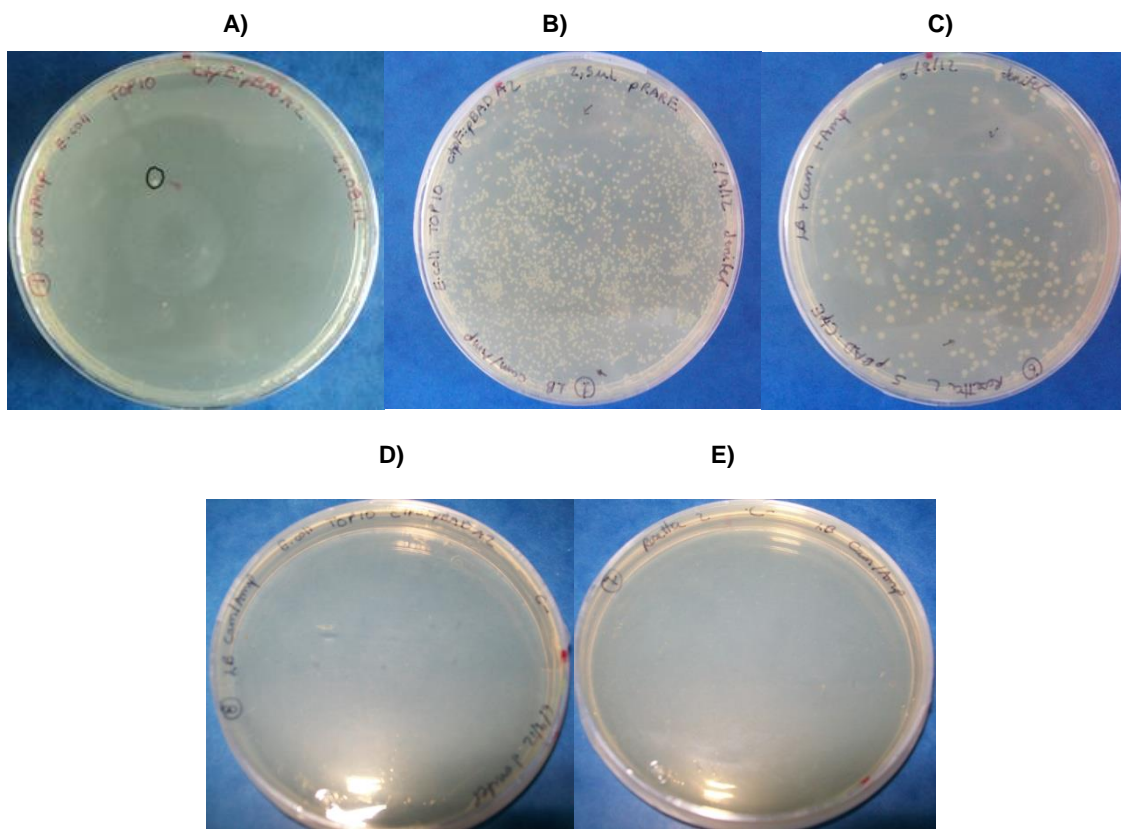


Una vez construido el recombinante pBAD A2- CtpE, se prosiguió con los ensayos de expresión de la proteína CtpE en *E. coli*. La proteína CtpE esta compuesta por 797 aminoácidos lo que equivale a un peso molecular de 84973 Da (aproximadamente 85 kDa) y de acuerdo con predicciones bioinformáticas, posee 10 segmentos transmembranales (SwissProt Tools: Protoscale <http://web.expasy.org/protoscale/> y ProtParam <http://web.expasy.org/protparam/>). Sin embargo, es importante anotar que la proteína recombinante es 31 aminoácidos más larga debido a la presencia del 10x His Tag y la secuencia TEV (secuencia que codifica sitio reconocido por la proteasa del virus del tabaco etch (Kapust *et. al.* 2001)) en el extremo C- terminal, lo que resulta en un total de 828 aminoácidos correspondientes a 88 kDa aproximadamente.

El primer parámetro evaluado para lograr la expresión heteróloga de la proteína CtpE, fue la selección de la cepa de *E. coli* adecuada teniendo en cuenta dos factores principales: las necesidades del promotor araBAD del vector pBAD-A2 y la diferencia en el uso codónico entre *E. coli* y *M. tuberculosis*. Para la primera variable, se decidió probar la cepa *E. coli* TOP10 la cual es capaz de transportar L-arabinosa pero no de metabolizarla, lo cual asegura que la concentración de este azúcar durante la inducción es constante en el interior celular. Respecto al uso codónico, la cepa *E. coli* Rosetta 2 que posee el plásmido pRARE (Anexo A), confiere resistencia a cloranfenicol y provee a la célula de los tRNA "raros" o poco comunes en *E. coli* (AUA: isoleucina; AGG, CGG y AGA: arginina; CUA: leucina, CCC: prolina, GGA: glicina) ya que mientras *E. coli* solo tiene un contenido de G+C del 50%, el de *M. tuberculosis* es de 65-70% (Korepanova *et. al.* 2005). También se investigó la expresión de la proteína CtpE en la cepa *E. coli* TOP10 cotransformada con el plásmido pRARE (TOP10+pRARE). Se verificó que ambas cepas: Rosetta 2 y TOP10 + pRARE hubieran sido cotransformadas con los 2 plásmidos ya que solo este tipo de contrasformantes pueden crecer en placas de medio LB suplementadas con ampicilina y cloranfenicol (Figura 6-18). Las 3 cepas de *E. coli*

empleadas en la expresión de CtpE se identificaron como: TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE y Rosetta 2 pBADA2 CtpE.

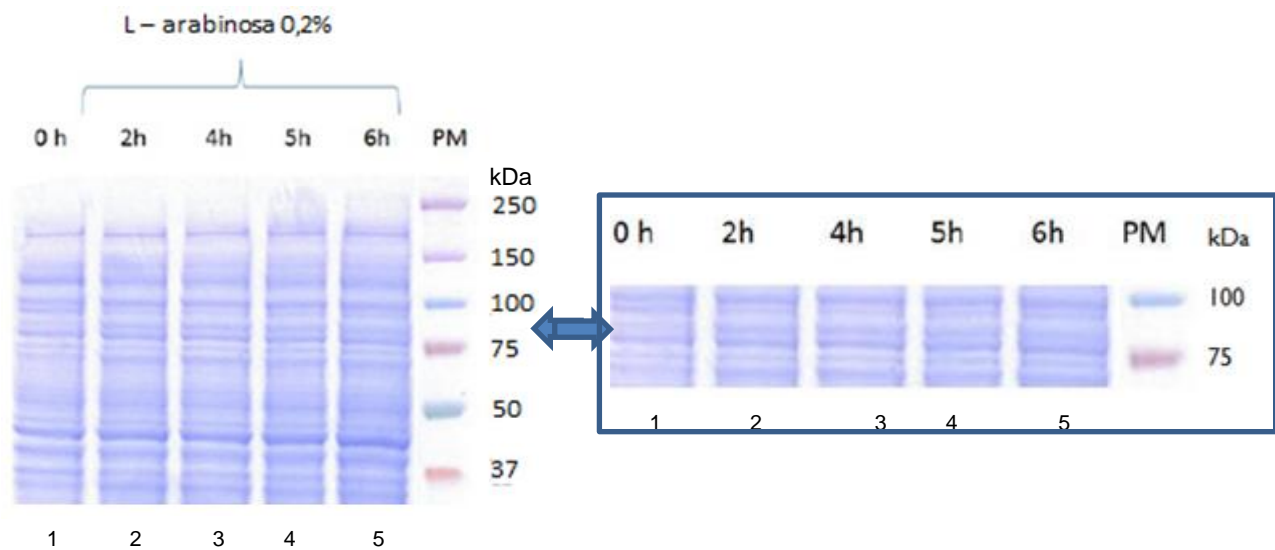
Figura 6-18: Placas de LB- agar-antibiótico mostrando colonias de *E. coli* transformadas con el recombinante pBAD A2 CtpE y el vector pRARE. A) Colonia de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE (LB+ Amp), B) Colonias de *E. coli* TOP10 pBAD A2 CtpE+pRARE (LB+ Amp +Cam), C) Colonias de *E. coli* Rosetta 2 pBAD A2 CtpE (LB+ Amp +Cam), D) Control negativo: colonia de *E. coli* TOP10 transformada únicamente con pRARE (LB+Amp), E) Control negativo: colonia de *E. coli* Rosetta 2 (LB+Amp)



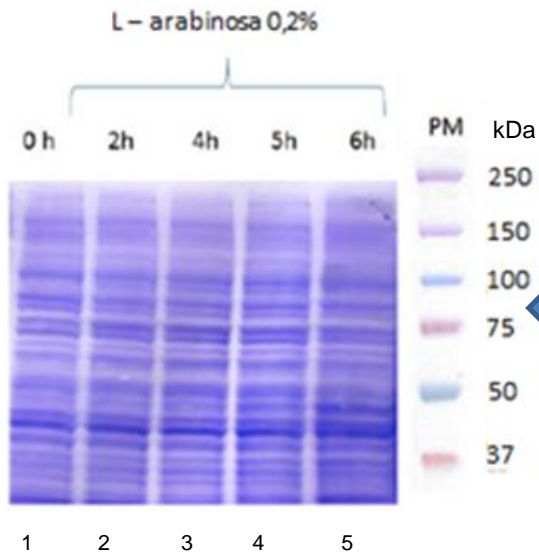
Inicialmente, se comparó la expresión de la proteína CtpE entre las tres cepas de *E. coli*, manteniendo las mismas condiciones de crecimiento a 37°C y la misma concentración de inductor: L-arabinosa 0,2%. Se siguió el crecimiento durante 2h, 4h, 5h y 6h de inducción. Los resultados se analizaron utilizando los lisados celulares mediante SDS-PAGE (Figura 6-19). Lo primero que se observó es que no existía sobreexpresión evidente de la proteína en el tamaño esperado (aproximadamente 88 kDa) para ninguna de las tres cepas TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE ni Rosetta 2 pBADA2 CtpE. Sin embargo, al examinar más de cerca los resultados de la cepa TOP10 pBADA2 CtpE, se observa una banda muy tenue entre 75-100 kDa, en el control negativo sin inductor (tiempo de inducción = 0h), que se vuelve un poco mas intensa al aumentar el tiempo de inducción y que podría corresponder a la proteína CtpE (Figura 6-19, recuadro).

Figura 6-19: Comparación de la expresión de la proteína recombinante CtpE entre las cepas de *E. coli* TOP10 y Rosetta 2. **A)** cepa *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE, a la derecha se muestra ampliación de la región entre 75 y 100 kDa. **B)** cepa *E. coli* TOP10 pBADA2 + pRARE. **C)** cepa *E. coli* Rosetta 2 pBADA2 CtpE. Los cultivos se indujeron con L-arabinosa 0.2% a 37°C durante diferentes tiempos de inducción: carril 1, tiempo 0 h corresponde a la preinducción; carriles 2-5, 2h, 4h, 5h y 6h de inducción. Las flechas indican el tamaño de banda esperado 88 kDa. (Geles de poliácridamida SDS al 10% teñidos con azul de coomassie, PM: Patrón de peso molecular preteñidos Precision Plus Dual Color Protein Standards (BioRAD))

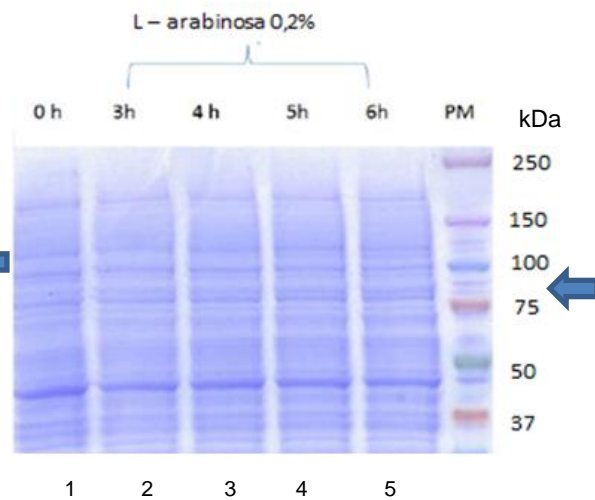
A) Cepa *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE



B) Cepa *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE

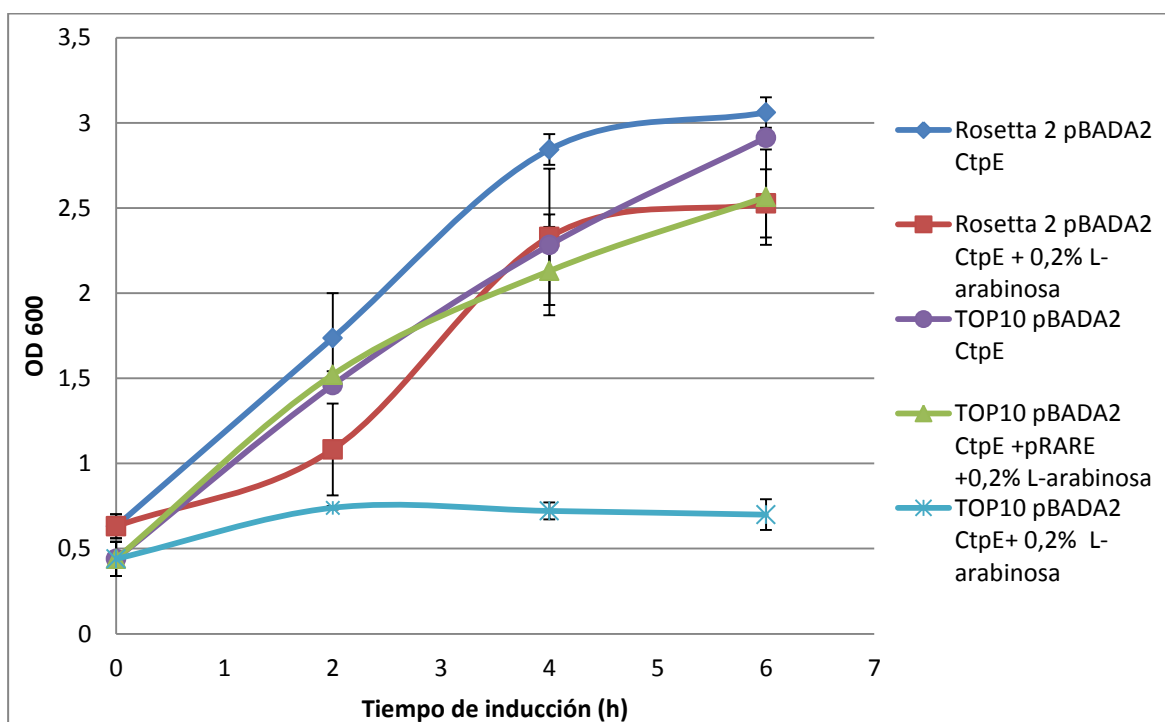


C) Cepa *E. coli* Rosetta 2 pBADA2 CtpE



Al comparar los valores de OD_{600} para las tres cepas de *E. coli* luego de la inducción (Figura 6-20), se observa que TOP10 pBADA2 CtpE detiene su crecimiento justo después de la adición de L- arabinosa ($OD_{600} \sim 0,7$), sin embargo, no ocurre lo mismo para Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE+ pRARE. Esto podría indicar que *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE efectivamente sintetiza la proteína, la cual podría ser tóxica aunque no necesariamente letal para la bacteria (Wagner S, *et. al.*, 2007, 2006). Se ha reportado que la sobreexpresión de proteínas de membrana inhibe fuertemente el crecimiento bacteriano en mas de un 50% comparado con las células control (bacterias sin inducir) después de 2 horas de inducción, con un máximo OD_{600} de 0,8 -1,3 con respecto a 2,5 (Wagner S, *et. al.*, 2007, 2006; Miroux y Walker, 1996). Se ha establecido también que proteínas de membrana sobreexpresadas en *E. coli* afectan la integridad de la membrana y saturan la maquinaria de traducción y traslocación dificultando la biogénesis de proteínas endógenas e inhibiendo así el crecimiento y la división celular, de esta forma disminuyendo la formación de biomasa y los rendimientos en la obtención de la proteína (Wagner *et.al.*, 2007). Esta observación por lo tanto podría explicar los resultados descritos en la Figura 6-19.

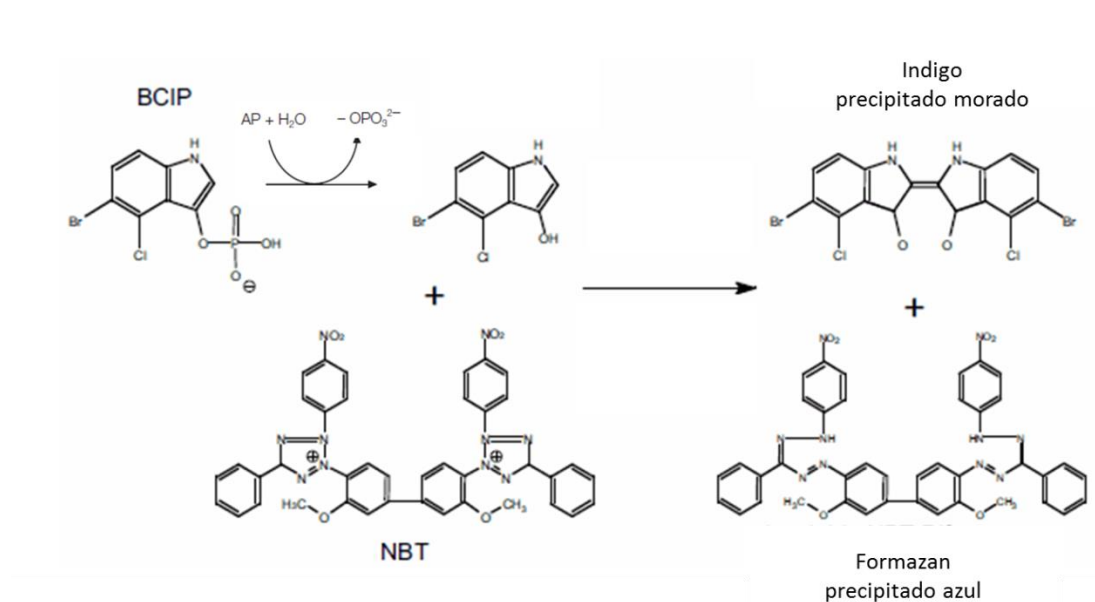
Figura 6-20: Cinética de crecimiento luego de la inducción de las 3 cepas recombinantes de *E. coli*: TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE y Rosetta 2 pBADA2 CtpE transformadas con el recombinante pBADA2 CtpE e inducidas con L-arabinosa 0,2% a 37°C. Las curvas se comparan con las cepas de Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE transformadas pero sin inducir. En cada punto se hicieron medidas por duplicado, las barras de error corresponden a la desviación estandar de los datos.



Por otro lado, se ha reportado para la expresión heteróloga de proteínas de membrana de *M. tuberculosis* en *E. coli*, que en algunos casos, no es posible detectar la proteína de interés por SDS- PAGE debido a los bajos niveles de producción de la misma, y por tanto se hace necesario emplear otras técnicas como inmunodetección (Korepanova *et. al.*, 2005); por tanto para corroborar si efectivamente CtpE había sido expresada en alguna de las 3 cepas de *E. coli*, se hizo un análisis subsecuente mediante western blot. Las proteínas fueron entonces electrotransferidas desde los geles de SDS-PAGE a membranas de PVDF empleando un sistema de transferencia semisecco. La inmunodetección se llevó a cabo por un método indirecto. Primero, se adicionó el anticuerpo primario (monoclonales anti His de ratón) para que reconociera el tag de 10xHis en el extremo C-terminal de la proteína recombinante CtpE. Después, se adicionó el anticuerpo secundario (policlonales anti ratón producidos en conejo), diseñado para reconocer el anticuerpo primario.

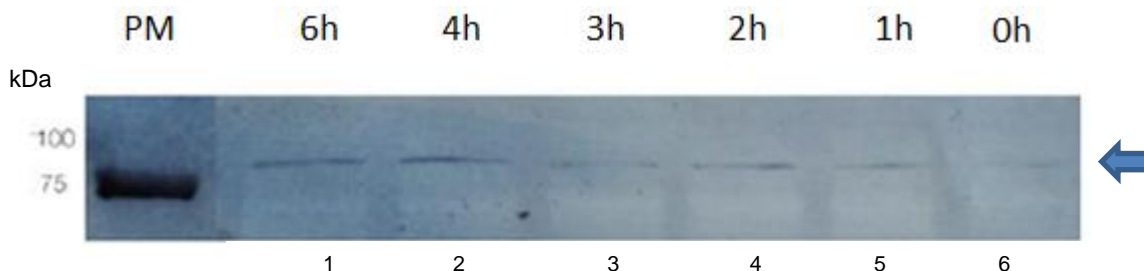
Los anticuerpos secundarios anti ratón utilizados estaban acoplados a la enzima fosfatasa alcalina. Para su detección se decidió emplear los sustratos cromogénicos solubles: nitroazul de tetrazolio (NBT) y 5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (BCPI), que al reaccionar con la enzima generan 2 productos coloreados insolubles (Kurien y Scofield, 2003); cuando la fosfatasa alcalina remueve el grupo fosfato del BCIP, la molécula resultante dimeriza bajo condiciones oxidantes para dar un precipitado azul (5,5'-dibromo-4,4'-dicloro-indigo) (Cheung Lab, 2013). Paralelamente el NBT es reducido a su forma coloreada (formazan); ambos productos forman un precipitado negro-morado insoluble en agua, que puede ser detectado sobre la membrana de PVDF (Figura 6-21).

Figura 6-21:Reacción de la hidrólisis enzimática del BCPI por fosfatasa alcalina y reducción de NBT para la producción de compuestos coloreados empleados en la inmunodetección por western blot. (Modificado de <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html> Fecha de consulta: 15 /2/2013)



Gracias a la técnica de western blot, en el caso de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE se logró detectar una proteína diferencial en la posición esperada (entre 75 -100 kDa), lo que evidenciaría que efectivamente CtpE fue expresada (Figura 6-22). La proteína se detectó incluso en ausencia de inductor lo que sugiere que la represión del promotor realmente no ha sido tan fuerte. Aunque las bandas observadas no son muy intensas, se pudo determinar que la mayor expresión se logró entre las 4 y 6 horas de inducción.

Figura 6-22: Detección de la expresión de la proteína recombinante CtpE en la cepa de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE por western blot. El cultivo se indujo con L-arabinosa 0.2% a 37°C durante diferentes tiempos: tiempo 0 h ó preinducción (carril 6), 2h, 4h, 5h y 6h (carriles 1-5). La flecha indica la posición de las bandas en el tamaño esperado 88 kDa. Las proteínas fueron electrotransferidas desde gel de poliacrilamida al 10% a membranas de PVDF (0,45 µm). La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos primarios anti His de ratón y anticuerpos secundarios anti ratón producidos en conejo, acoplados a fosfatasa alcalina y los sustratos cromogénicos NBT y BCPI. PM: Patrón de peso molecular preteñidos Precision Plus Dual Color Protein Standards (BioRAD))



La producción de proteína tampoco se detectó por western blot en el caso de las cepas Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE+ pRARE. En cuanto a la cepa de Rosetta 2 pBADA2 CtpE, es probable que metabolice rápidamente la L-arabinosa y por tanto no se mantengan constantes los niveles intracelulares de inductor necesarios para expresar la proteína, sin embargo, un estudio relacionado está fuera del alcance de este trabajo. Así mismo, se esperaría que la cotransformación de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE con pRARE incrementara los niveles de expresión de CtpE como fue reportado similarmente por Raimunda *et. al.* (2012), ya que el plásmido pRARE es compatible con vectores como pBAD (Novy R. *et. al.* 2001). Sin embargo, por razones todavía desconocidas la presencia de este plásmido tampoco tuvo el efecto esperado en la producción de proteína.

En un esfuerzo por determinar si realmente los resultados anteriores se debían a bajos niveles de expresión de la proteína CtpE en *E. coli* o a una transferencia ineficiente de la proteína desde el gel a la membrana de PVDF, paralelamente se probaron diferentes modificaciones al protocolo de western blot.

Debido a que CtpE es una proteína de membrana, para facilitar su análisis por SDS PAGE se consideró el tratamiento previo de las muestras (Reisinger y Eichacker, 2008). En principio, se decidió utilizar los protocolos estándar (Sambrook, 2001, Lewinson *et. al.* 2008), en los que la muestra es resuspendida en buffer carga y sometida a ebullición con

el fin de provocar la lisis celular y la denaturación de las proteínas; sin embargo, las proteínas de membrana por ser altamente hidrofóbicas tienden a agregarse bajo estas condiciones (Kaur y Bachhawat, 2009), lo cual se observó por la dificultad de cargar estas muestras en el gel. Después, se decidió resuspender las muestras en una solución de SDS 1 %, a temperatura ambiente por 10 minutos. Las muestras fueron centrifugadas a 13000 rpm y el sobrenadante que contenía las proteínas solubilizadas fue tratado con buffer carga (Lewinson *et.al.*, 2008). De esta manera, la muestra pudo ser cargada más fácilmente en el gel y se logró detectar la proteína por western blot Figura 6- 22.

Otro factor a considerar en la electrotransferencia, fue el relativamente alto peso molecular de CtpE (88 kDa), que puede resultar en bajos niveles de detección por western blot (Kurien y Scofield, 2003). Entre los factores que influyen en la transferencia se encuentran: el porcentaje de entrecruzamiento del gel y el tiempo de transferencia (MacPhee, 2010). En el primer caso se probaron diferentes geles de 4, 8 y 10 % de poliacrilamida, pero no se observó algún cambio significativo en la detección de CtpE (datos no mostrados). Por otro lado, al trabajar bajo condiciones semisecas, la transferencia de algunas proteínas grandes (>80kDa) esta limitada en cuanto al tiempo de transferencia, debido a la capacidad del buffer empleado. En este caso se prolongó el tiempo de transferencia durante 1 h, 1:30 h y 2 h pero tampoco se obtuvieron bandas mas intensas por inmunodetección.

Se decidió continuar con la optimización de la expresión de proteína CtpE, variando la temperatura de inducción. A pesar de que el crecimiento óptimo de *E. coli* se da a 37°C, esta temperatura no es necesariamente la mejor opción para la expresión heteróloga de proteínas. Por lo general, se emplean menores temperaturas de crecimiento que buscan disminuir la sobreproducción de proteína, aliviando así la sobrecarga en las maquinarias de traducción y traslocación (Gordon *et.al* 2008).

A pesar de que solo se detectó la proteína en la cepa de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE, se decidió probar diferentes temperaturas en las cepas de Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE. El nivel de producción de proteína fue evaluado a 25°C, 30°C y 37°C, con respecto a las células sin inducir, manteniendo constante la concentración de L-arabinosa 0,2%, después de 4 y 6 horas de inducción. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE y western blot y los resultados se resumen en la Tabla 6-1. Bajo estas nuevas condiciones, no se detecta la proteína de interés en Rosetta 2 pBADA2 CtpE ni en TOP10 pBADA2 CtpE +pRARE; tampoco se obtiene un aumento significativo en la producción de proteína en *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE. Estos resultados fueron bastante inesperados, ya que se ha comprobado que la disminución en la temperatura de crecimiento genera un aumento en los niveles de expresión de proteínas de membrana. De hecho, recientemente se reportó que en la expresión heteróloga de 4 ATPasas tipo P de *Legionella pneumophila* en *E. coli*, el hecho de disminuir la temperatura de 37°C a 30°C aumentó significativamente la producción de proteína (Gordon *et. al.* 2008). Es probable que en el caso de CtpE, el metabolismo reducido de *E. coli* disminuyera considerablemente la síntesis de proteínas, por lo que

hubiera sido necesario inducir el cultivo por periodos mas prolongados de tiempo (Terpe 2006; QUIAGUEN, 2003; Miroux y Walker, 1996).

Tabla 6-1: Resultados de la optimización de la temperatura de inducción para la expresión de la proteína recombinante CtpE en las cepas de *E. coli*: TOP10 pBADA2 CtpE, TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE y Rosetta 2 pBADA2 CtpE. Se probaron 3 temperaturas: 37°C, 30°C y 25°C, manteniendo constante la concentración de inductor L-arabinosa 0,2%, luego de 4h y 6h de inducción. Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE (S) y western blot (w) (como se describe en el texto). +/-: condiciones en las que se detectó o no la proteína.

Cepas de <i>E. coli</i>	Temperatura de inducción					
	37°C		30°C		25°C	
	4h	6h	4h	6h	4h	6h
TOP10 pBADA2 CtpE	+w	+w	-	-	-	-
TOP10 pBADA2 CtpE + pRARE	-	-	-	-	-	-
Rosetta 2 pBADA2 CtpE	-	-	-	-	-	-

Como solo se detectó la proteína CtpE en las células de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE, a 37°C luego de 4 - 6 horas de inducción, se decidió continuar con este clon para estudiar la variación de la concentración final de inductor L-arabinosa entre 0,00002 – 0,2% en el cultivo; este rango de concentraciones ha sido empleado exitosamente en la expresión de numerosas proteínas de membrana (Wang *et.al.* 2003). En principio, la producción de proteínas bajo la regulación del promotor araBAD puede ser inducida completamente con una concentración de 0,001% de L-arabinosa en células que no metabolizan este compuesto, como es el caso de *E. coli* TOP10 (Terpe, 2006). Sin embargo, los resultados obtenidos a partir de SDS –PAGE y western blot (Tabla 6-2), evidencian la necesidad de trabajar con altas concentraciones de inductor (0,2%) para que la proteína CtpE sea expresada. La variación en la concentración de L-arabinosa por varios órdenes de magnitud no mostró mejores resultados. En parte esto era de esperarse, ya que para el sistema basado en el promotor araBAD ocurre un aumento lineal en la expresión génica, al incrementar la concentración de inductor (Sørensen y Kusk, 2005). Por tanto, debido a que el nivel de expresión de la proteína CtpE es bajo en condiciones de máxima inducción, los niveles de expresión no aumentarían al disminuir la concentración de inductor.

Tabla 6-2: Resultados de la optimización de la concentración de inductor en la expresión de la proteína recombinante CtpE en la cepa de *E. coli* TOP 10 pBADA2 CtpE. Se varió la concentración de L-arabinosa entre 0,00002% y 0,2%, manteniendo constante la temperatura de crecimiento a 37°C, luego de 4h y 6h de inducción. Los extractos celulares se analizaron por SDS-PAGE (S) y western blot (w) (como se describe en el texto) +/-: condiciones en las que se detectó o no la proteína.

<i>E. coli</i> TOP 10 pBADA2 CtpE	Concentración de inductor (L-arabinosa)										
	0,00002%		0,0002%		0,002%		0,02%		0,2 %		
	4h	6h	4h	6h	4h	6h	4h	6h	4h	6h	
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+W	+W

Por otro lado, para eliminar la posibilidad de que los bajos niveles de expresión fueran debidos a que el recombinante no fuera mantenido en las células durante el crecimiento, se hizo una extracción de plásmido desde las colonias de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE, y un posterior análisis de restricción confirmó el mantenimiento del plásmido en las condiciones de crecimiento.

Durante los anteriores ensayos se probaron diferentes condiciones de inducción (variando temperaturas y concentraciones de inductor) para *E. coli* con el fin de superar las dificultades comunes en la expresión de proteínas de membrana como es la traducción, traslocación e inserción en la bicapa lipídica (Gordon, 2008). Sin embargo, dichas modificaciones no tuvieron un efecto significativo en los niveles de expresión de CtpE.

6.3.2 Localización celular de CtpE

A pesar de los niveles de expresión detectados en la cepa de *E. coli* TOP10 pBADA2 CtpE, se prosiguió con la identificación de la localización celular de la proteína recombinante CtpE; de acuerdo con la literatura (Raimunda *et. al.* 2012, Lewinson *et. al.* 2008) se esperaba que la proteína se expresara y plegara en la membrana de *E. coli*.

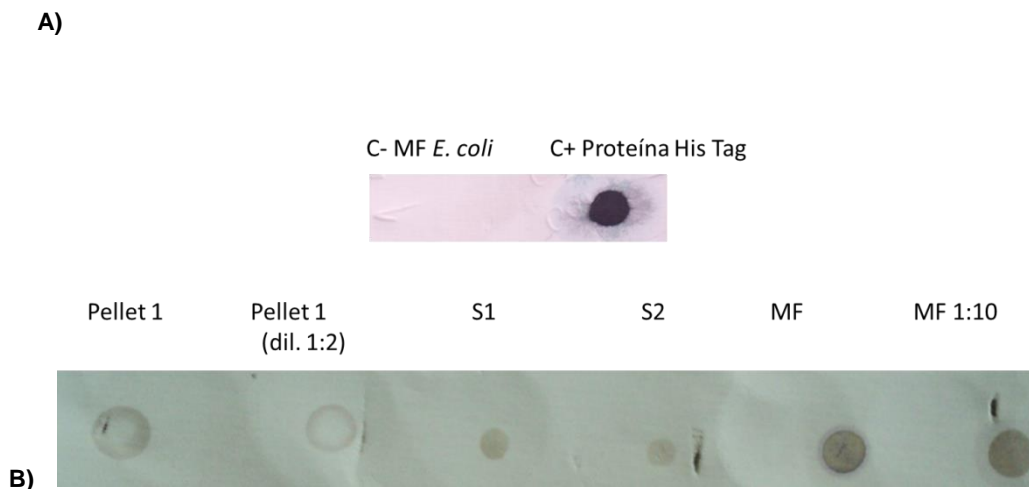
Para lograr este objetivo, las fracciones celulares se separaron por centrifugación diferencial y se tomaron alícuotas de cada etapa para evaluar mediante dot blot la posible ubicación de CtpE. Esta técnica ha sido utilizada anteriormente para identificar la localización celular de proteínas sobreexpresadas (Gordon *et. al.* 2008). Por lo tanto, cada una de las fracciones obtenidas en la centrifugación diferencial fue diluida a una concentración de proteína aproximadamente 7-8 µg/µL, de esta manera al sembrar 5 µL de muestra en la membrana de PVDF, se contaba con 35-40 µg de proteína para cada una de las fracciones analizadas. Para la identificación de la proteína recombinante se utilizó el mismo anticuerpo anti His descrito anteriormente.

Los resultados obtenidos a partir del dot blot se muestran en la Figura 6-23. El pellet 1 (P1) obtenido después de la lisis celular y centrifugación a baja velocidad (9000 rpm, rotor SS34, Sorvall) corresponde a células no lisadas y cuerpos de inclusión. El

sobrenadante 1 (S1) se centrifugó nuevamente (45000 rpm, rotor Ti60, Beckman) para separar el sobrenadante 2 (S2) comprendido por el citosol y proteínas solubles, de los fragmentos de membrana (MF) (Mandal *et.al.* 2002, Sharma *et.al.* 2000). Para estos ensayos se tomó como control negativo, las membranas de *E. coli* sin transformar las cuales no desarrollaron color.

Como se observa, todas las fracciones presentan una coloración positiva incluyendo el P1, lo cual podría deberse a la presencia de células no lisadas, ya que la formación de cuerpos de inclusión sería poco probable debido a los bajos niveles de expresión. Por otro lado, las señales mas intensas se observaron en la fracción de membrana plasmática de *E. coli*, lo que sugiere que la proteína CtpE fue expresada y se encuentra mayoritariamente insertada en la membrana plasmática de *E. coli* TOP10 pBAD A2 CtpE.

Figura 6-23: Dot blot de las fracciones celulares separadas por centrifugación y ultracentrifugación para determinar la localización celular de la proteína CtpE expresada en *E.coli*. **A)** Controles de dot blot, C-: control negativo, fragmentos de membrana de *E. coli* sin transformar, C+: control positivo, proteína recombinante antiporter Na^+/K^+ Nha de *E. coli* marcada con 6xHisTag en C- terminal (Mager *et. al.* 2011). **B)** Fracciones celulares: Pellet 1 (células no lisadas y cuerpos de inclusión); S1: (sobrenadante 1); S2: (sobrenadante 2) citosol y proteínas solubles; MF: Fragmentos de membrana. Las muestras (35-40 μg de proteína) se aplicaron directamente sobre la membrana de PVDF (0,45 μm). La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos primarios anti His de ratón y anticuerpos secundarios anti ratón producidos en conejo, acoplados a fosfatasa alcalina y los sustratos cromogénicos NBT y BCPI.



Adicionalmente, al trabajar con la muestra de la membranas de *E. coli* que expresaban la proteína CtpE, se probaron diferentes detergentes para intentar solubilizar la proteína recombinante: detergentes iónicos (SDS dodecilsulfato de sodio, Cholate colato de sodio), no iónicos (Triton X -100, DM n-decil- β -maltosido , OG n-octil- β -piranosido, NG neopentil glicol) y zwitteriónicos (PhosK Zwittergent, LDAO oxido de laurildimetilamina). Algunos como el LDAO, DDM y OG han sido empleados exitosamente en la purificación de ATPasas tipo P (Lewinson *et. al.*, 2008).

Luego de incubar los fragmentos de membrana (6-7 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de proteína) con soluciones al 1% de cada detergente a temperatura ambiente y centrifugar las muestras, se hizo un análisis por dot blot de los sobrenadantes. Si CtpE es soluble en alguno de los detergentes probados, debería ser posible detectarla en solución. Efectivamente, se logró detectar la proteína en las soluciones con SDS, Triton X 100, DM y OG (Tabla 6-3). La señal mas intensa se obtuvo para las muestras tratadas con SDS y Triton X -100, lo que cualitativamente indicaría que estos detergentes lograron solubilizar mayor cantidad de proteína, de hecho en la literatura se reporta que ambos detergentes se han empleado exitosamente en la solubilización de proteínas integrales de membrana, con SDS en condiciones denaturantes y Triton X-100 en condiciones no denaturantes (Applichem, 2008). El Triton X -100 también fue empleado posteriormente en el tratamiento de las muestras para el análisis por SDS PAGE y western blot, pero no se observó un aumento significativo en la detección de CtpE respecto al uso de SDS.

Los resultados anteriores son un buen punto de partida para emplear los detergentes Triton X 100, DM y OG en estudios futuros de purificación de CtpE, ya que no son tan denaturantes como el SDS.

Tabla 6-3: Experimentos de solubilización a pequeña escala de la proteína recombinante CtpE. Los fragmentos de membrana fueron disueltos en soluciones de detergentes al 2%: detergentes iónicos (SDS dodecilsulfato de sodio, Colato colato de sodio), no iónicos (Triton X -100, DM n-decil- β -maltosido , OG n-octil- β -piranosido, NG neopentil glicol) y zwitteriónicos (PhosK, Zwittergent, LDAO oxido de laurildimetilamina). Las muestras (25 μg de proteína) se analizaron por dot blot sobre membrana de PVDF (0,45 μm). La inmunodetección se llevó a cabo con anticuerpos primarios anti His de ratón y anticuerpos secundarios anti ratón de conejo, acoplados a fosfatasa alcalina y los sustratos cromogénicos NBT y BCPI. +/-: detección o no de la proteína en los sobrenadantes.

Detergente	Intensidad de la señal
Iónicos	
SDS	++++
Colato de sodio	-
No iónicos	
Triton X- 100	++++
DM	+++
OG	++
NG	-
Zwitteriónicos	
PhosK	-
Zwittergent	++
LDAO	+

Es importante reconocer que se podrían mejorar los niveles de expresión de CtpE en *E. coli*, especialmente con el fin de obtener suficiente cantidad de proteína para purificarla y emplearla en diferentes aproximaciones experimentales encaminadas a la caracterización de los parámetros enzimáticos, lo que será tema de una investigación posterior en nuestro grupo de investigación.

Existen aún varios factores que se pueden modificar y/o probar para mejorar el nivel de proteína expresada. Por ejemplo, se podría emplear medio de cultivo de auto inducción como lo realizó inicialmente Raimunda *et. al.* (2012), pues se ha reportado que mejoran significativamente los niveles de expresión. Las anteriores sugerencias también podrían aplicarse a los clones de Rosetta 2 pBADA2 CtpE y TOP10 pBADA2 CtpE +pRARE.

Otra opción, es intentar expresar la proteína en diferentes cepas de *E. coli* como C43(DE3), la cual ha sido desarrollada para la expresión de proteínas de membrana y también ha sido empleada para algunas proteínas de *M. tuberculosis* (Korepanova *et. al.* 2005).

También se ha reportado que la posición del His Tag puede ser determinante en la producción de proteína (Lewinson *et. al.* 2012); muchas proteínas solo se expresan dependiendo de la ubicación de dicha secuencia. En este caso podría reemplazarse el HisTag en C-terminal por N-terminal.

En este punto del trabajo, se consideró de acuerdo a la literatura (Wang *et.al.*, 2003) que los niveles de expresión de CtpE en la membrana plasmática de *E. coli* eran suficientes para realizar ensayos funcionales de la proteína para la identificación de la actividad ATPasa y la especificidad iónica.

6.4 Estudios de transporte iónico de la proteína CtpE

La funcionalidad de una proteína de membrana expresada en *E. coli*, puede ser estudiada directamente a partir de la fracción de membranas celulares, facilitando el estudio de sus propiedades (Wang *et.al.*, 2003).

Por lo tanto, una vez se comprobó la presencia de la proteína CtpE en los fragmentos de membrana de *E. coli*, se llevaron a cabo estudios iniciales acerca de la especificidad iónica de la proteína en vesículas de membrana. Para esto, se emplearon dos aproximaciones: ensayos de actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas empleando la técnica SSM.

Se ha reportado anteriormente que la actividad por un sustrato en particular de una proteína de membrana, puede ser medida sobre las vesículas de membrana siempre y cuando dichos resultados sean comparados con la actividad medida sobre vesículas de membrana de *E. coli* control (Wang *et.al.*,2003). En este caso, como control se emplearon células de *E. coli* no transformadas.

Además es importante aclarar que una vez las vesículas de membrana son preparadas, pueden obtenerse en dos orientaciones o configuraciones diferentes: con la porción citoplasmática hacia afuera (ISO, *inside out*) o hacia adentro (RSO, *right side out*); a pesar de que existen protocolos experimentales que permiten obtener preferencialmente una configuración o la otra (Mager *et. al.* 2011), en este trabajo, tanto para los ensayos de actividad ATPasa como para las medidas electrofisiológicas, la actividad medida se

debe a las vesículas en la forma ISO, es decir, con el sitio de unión a ATP del lado citoplasmático de la membrana en la célula, hacia la parte externa de las vesículas (Schulz *et. al.* 2008). Se ha reportado que al romper las células de *E. coli* por presión mecánica, entre el 60-80% de las vesículas producidas se obtienen en la configuración ISO (Altendorf y Staehelin, 1974).

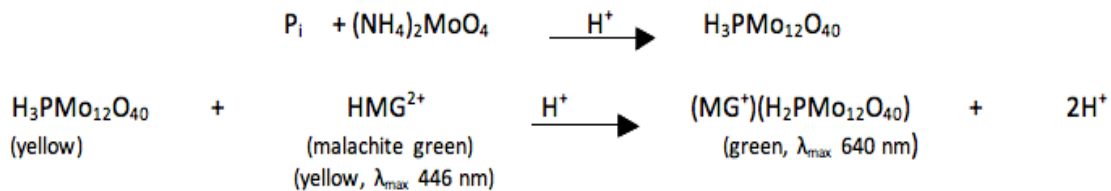
6.4.1 Ensayos de actividad ATPasa

Durante el ciclo catalítico de las ATPasas tipo P, la hidrólisis del ATP (actividad ATPasa) se produce una vez el ion a ser transportado ha alcanzado su sitio de unión en la proteína (sección 2.6.1); es decir, que sólo en presencia del ion sustrato, la enzima se fosforila. Por tanto, los ensayos de actividad ATPasa permitirían identificar el ion transportado por CtpE.

A pesar de que los estudios bioinformáticos sugieren que CtpE es una Na⁺ ATPasa, la caracterización de otras ATPasas tipo P ha evidenciado que el transporte catiónico por parte de una misma enzima no se restringe a un solo sustrato (Raimunda, 2012; Benito *et. al.* 2002). Debido a que CtpE ha sido clasificada como una bomba transportadora de metales alcalinos y alcalinotérreos (Novoa *et.al.* 2012), en este estudio también se probaron otros iones como K⁺ y Ca²⁺ en experimentos independientes.

La actividad ATPasa de las vesículas de membrana fue determinada colorimétricamente cuantificando el fosfato inorgánico (Pi) liberado en la hidrólisis enzimática de ATP siguiendo la metodología de Lanzetta *et.al.* (1979). El fosfato liberado forma un complejo con 12 moléculas de molibdato (fosfomolibdato) en presencia de ácido sulfúrico (H₂SO₄), que reacciona con el verde malaquita para formar un nuevo complejo verde cuya absorbancia es directamente proporcional a la concentración de Pi (Figura 6-24) y puede ser leída a 640 nm (Zuck *et.al.* 2005). La actividad ATPasa se reporta como μmol de Pi liberado/mg de proteína*minuto. La reacción se llevó a cabo a un pH de 7,2, para asegurar la actividad de las ATPasa tipo P en la membrana (Santos *et. al.* 2012).

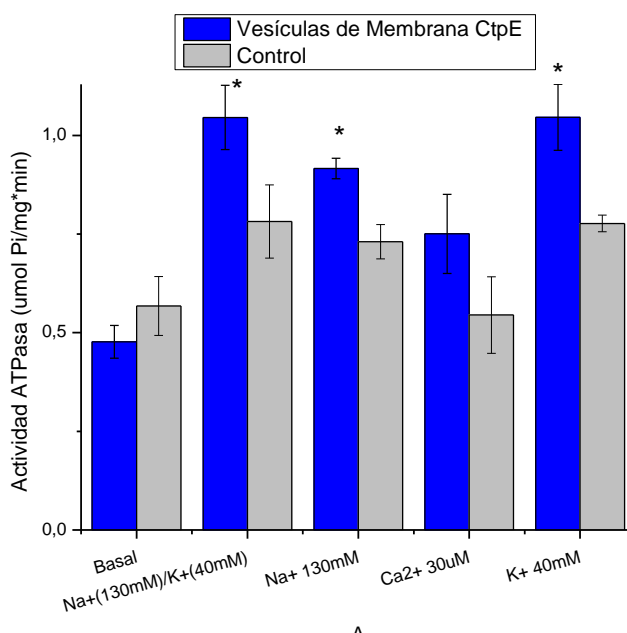
Figura 6-24: Reacción de fosfato inorgánico (Pi) con molibdato de amonio y formación de los complejos coloreados con verde malaquita. Ensayo colorimétrico para la detección de la actividad ATPasa sobre las vesículas de membrana. Tomado de <http://bitesizebio.com/articles/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/> Fecha de consulta: 12/11/2013



Las vesículas de membrana de *E. coli* tienen muchos otros tipos de transportadores e incluso se ha reportado la presencia de al menos 4 ATPasas tipo P transportadoras de K^+ (proteína KdpB), Zn^{2+}/Cd^{2+} y Mg^{2+} (Kühlbrandt 2004, Axelsen y Palmgren 1998). Por esta razón, la actividad ATPasa medida en las vesículas de membrana de *E. coli* donde se detectó la expresión de CtpE, fue comparada con la actividad ATPasa de las membranas de *E. coli* sin transformar (control).

En la Figura 6-25, se muestran los resultados obtenidos de la actividad ATPasa en vesículas de membrana de *E. coli* donde se expresó la proteína CtpE junto con las vesículas control. La actividad ATPasa fue medida por triplicado en cada caso, también se indica la desviación estándar para cada conjunto de datos. Los datos fueron analizados estadísticamente por la prueba t Student (empleando el programa Microsoft Excel 2010). Las diferencias con valores de $P < 0,05$ fueron considerados como significativas (Almeida *et. al.* 2008).

Figura 6-25: Ensayo de actividad ATPasa en vesículas de membrana de *E. coli* expresando la proteína CtpE de *M. tuberculosis*. En gris se representa la actividad ATPasa de las vesículas control de células de *E. coli* sin transformar y en azul la actividad ATPasa de las vesículas de membrana expresando la proteína CtpE. La actividad ATPasa fue medida por triplicado empleando el método colorimétrico de verde malaquita y se definió como μmol de Pi liberado/mg de proteína*minuto a 25°C y pH 7,2. Se probaron los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en concentraciones fisiológicas. Las vesículas de membrana de *E. coli* sin transformar fueron tomadas como control (* : $P < 0,05$).



Inicialmente, se determinó la actividad basal que corresponde a la actividad ATPasa estimulada únicamente por Mg^{2+} y es producida por la Mg^{2+} -ATPasa en la membrana de *E. coli*. Esta actividad está implícita en cada uno de los ensayos, debido a que el Mg^{2+} es un cofactor de las ATPasas tipo P y por tanto siempre está presente en el medio de

reacción. Por lo tanto, como es de esperarse, no existe una diferencia significativa entre la actividad basal de las vesículas expresando CtpE y las vesículas control.

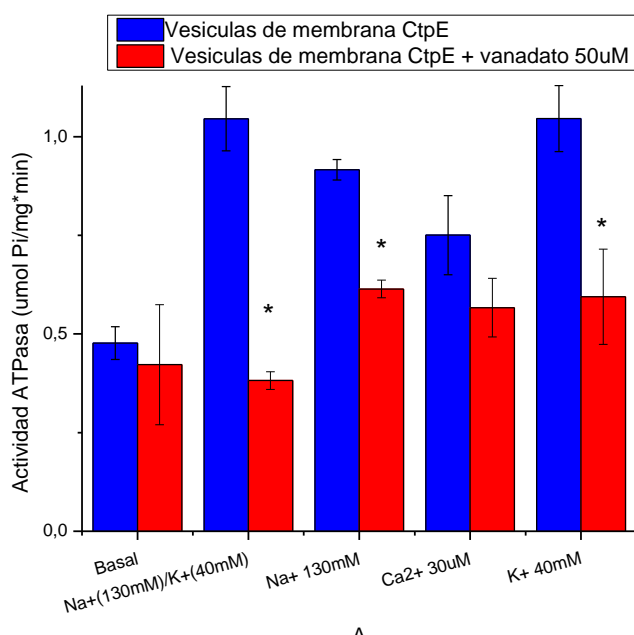
En la Figura 6-25, se observa un aumento de la actividad ATPasa estimulada por iones Na^+ y K^+ con respecto a la actividad basal, tanto para las vesículas control como para las vesículas de membrana expresando CtpE. La actividad medida en las vesículas control, puede deberse a la presencia de ATPasas y transportadores presentes normalmente en la membrana de *E. coli*, como por ejemplo, la proteína KdpB, la cual transporta K^+ a expensas de la hidrólisis de ATP. Por otra parte, la actividad ATPasa siempre se mostró mayor en las membranas expresando la proteína recombinante, comparadas con las vesículas control, lo que en principio podría ser un indicio de que Na^+ y K^+ son transportados por CtpE. La diferencia entre la actividad ATPasa estimulada en las vesículas de membrana con CtpE y las vesículas control, permitió establecer que la actividad ATPasa debida a la proteína CtpE es de $0,21 \pm 0,04 \mu\text{mol Pi/mg proteína} \cdot \text{minuto}$ cuando es estimulada individualmente por Na^+ ; $0,27 \pm 0,12 \mu\text{mol Pi/mg proteína} \cdot \text{minuto}$ en presencia únicamente de K^+ y cuando se prueban simultáneamente Na^+/K^+ en proporción molar 3:1, la actividad ATPasa es $0,26 \pm 0,08 \mu\text{mol Pi/mg proteína} \cdot \text{minuto}$. Estos resultados son prácticamente iguales y sugieren que tanto Na^+ como K^+ estimulan la actividad ATPasa de CtpE en las vesículas de membrana. Los valores de actividad ATPasa obtenidos en este trabajo, son del mismo orden de magnitud, a los reportados por otros autores (bajo condiciones experimentales similares) para la actividad Na^+ ATPasa de la bacteria *Exiguobacterium aurantiacum* ($0,2 - 0,3 \mu\text{mol Pi/mg proteína} \cdot \text{minuto}$) (Suzuki *et. al.* 2005).

Por otro lado, de acuerdo a los resultados obtenidos (Figura 6-25) es evidente que el Ca^{2+} no es transportado por CtpE ya que no hay una diferencia estadísticamente significativa en la actividad ATPasa entre las vesículas control y las vesículas con CtpE al adicionar el catión divalente.

En la literatura (Rocafull *et. al.* 2012, Benito *et. al.* 2002) se ha reportado que la Na^+ ATPasa es capaz de transportar iones Na^+ , Li^+ y K^+ individualmente, a diferencia de la Na^+/K^+ ATPasa que necesita de ambos iones para que la enzima se active. Por tanto, CtpE podría tratarse efectivamente de una Na^+ ATPasa. Todavía sería importante determinar en estudios posteriores, la afinidad y constantes de transporte para Na^+ y K^+ de la proteína CtpE.

Por otro lado, también se evaluó el efecto del vanadato sobre la actividad ATPasa de las vesículas expresando CtpE, los resultados se muestran en la Figura 6-26. El vanadato es un inhibidor específico de las ATPasas tipo P ya que bloquea la fosforilación de estas enzimas (Almeida *et. al.*, 2008).

Figura 6-26: Efecto del inhibidor vanadato sobre la actividad ATPasa medida en vesículas de membrana de *E. coli* expresando la proteína CtpE de *M. tuberculosis*. En azul se representa la actividad ATPasa de las vesículas expresando CtpE sin inhibidor y en rojo la actividad ATPasa sobre las mismas vesículas en presencia de inhibidor. La actividad ATPasa fue medida por triplicado empleando el método colorimétrico de verde malaquita y se definió como μmol de Pi liberado/mg de proteína*minuto a 25 °C y pH 7,2. Se probaron los iones Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en concentraciones fisiológicas y de ser necesario vanadato (50 μM). Las diferencias entre la actividad ATPasa en presencia y ausencia de inhibidor con valores de $P < 0,005$ (* : $P < 0,05$) fueron consideradas como significativas (Almeida *et. al.* 2008).



La actividad ATPasa estimulada por Na^+ y K^+ en las vesículas expresando CtpE, disminuyó considerablemente en presencia del inhibidor (Figura 6-26). Los niveles de actividad en presencia de Na^+ + vanadato ($0,61 \pm 0,02 \mu\text{mol Pi/mg proteína*minuto}$), K^+ + vanadato ($0,59 \pm 0,12 \mu\text{mol Pi/mg proteína*minuto}$) y Na^+/K^+ + vanadato ($0,38 \pm 0,02 \mu\text{mol Pi/mg proteína*minuto}$) son muy parecidos a los de la actividad basal + vanadato ($0,45 \pm 0,15 \mu\text{mol Pi/mg proteína*minuto}$); es decir, que el vanadato inhibió todas las ATPasas tipo P presentes en la membrana de *E. coli* incluyendo la actividad estimulada por Na^+ y K^+ de la proteína CtpE. Esto permitiría asociar experimentalmente la actividad de CtpE a una ATPasa tipo P.

Es importante anotar, que la actividad ATPasa medida incluso en presencia de vanadato puede ser debida a otras proteínas presentes en la membrana de *E. coli* como los transportadores tipo ABC que también hidrolizan ATP pero no son inhibidas por vanadato, o fosfatasa (Pedersen, 2007).

Los resultados de actividad ATPasa sugieren que la proteína CtpE efectivamente estaría involucrada en el transporte de Na^+ y/o K^+ , por lo que a continuación se utilizaron medidas electrofisiológicas empleando la técnica de SSM, para comprobar la especificidad iónica sugerida en los ensayos de actividad ATPasa.

6.4.2 Medidas electrofisiológicas

Las medidas electrofisiológicas son adecuadas para determinar el tipo de sustrato iónico que es transportado por CtpE. La técnica de SSM en particular, es muy útil en casos como el estudio de transportadores bacterianos, los cuales difícilmente pueden ser investigados con otras técnicas electrofisiológicas (sección 2.7) (Schulz *et. al.* 2008). En SSM, las vesículas de membrana de *E. coli* que expresan la proteína CtpE son adsorbidas sobre una membrana lipídica artificial, soportada en un electrodo de oro que esta conectado a un circuito externo (sección 5.5). La corriente generada por el transporte iónico debida al transportador (transporte electrogénico), es medida a través de acoplamiento capacitivo (sección 2.7.2). La técnica SSM permite detectar picos de corriente en el orden de los pA asociados al transporte de un sustrato específico (Pintschovius *et.al*, 1999).

En el caso de las ATPasas tipo P como CtpE, las señales de corriente son observadas una vez la bomba es activada por un “salto” o cambio rápido de la concentración de ATP en presencia del ion transportado (Tadini *et. al.* 2008).

En la Figura 6-27, se observan las señales de las corrientes eléctricas generadas por las vesículas de membrana control y expresando CtpE adsorbidas sobre SSM. Las señales son registradas después de los 550 ms, tiempo que le toma al equipo hacer el intercambio de soluciones (sección 5.5). En este caso, la detección de una señal se asoció al transporte del ion probado. Un pico de corriente de signo positivo indica que el transporte de carga positiva ocurre desde la solución hasta la vesícula en el SSM, en la configuración del experimento esto significa que el catión es transportado desde el lado citoplasmático al exterior celular (Pintschovius *et.al*, 1999).

Para las vesículas control y expresando CtpE, se registraron picos de corriente positiva en presencia de Mg^{2+} entre 50- 70 pA (Figura 6-27 B) correspondientes al transporte “basal”, los cuales indican la contribución a la corriente iónica debida únicamente a este catión y que está asociado a la presencia de una Mg^{2+} ATPasa en las vesículas de membrana de *E. coli*, como se discutió anteriormente. Por otro lado, en presencia de Na^+ (Figura 6-27 C) y Na^+/K^+ (Figura 6-27 D) (además del Mg^{2+}) se registraron picos de corriente alrededor de 250 pA en las vesículas de membrana expresando CtpE, es decir 5 veces mayor que en las vesículas control, lo que muestra que la contribución a la corriente iónica debida a otros transportadores de *E. coli* ha sido mínima al comparar con las señales obtenidas para las vesículas control. Por tanto, las corrientes registradas en presencia de Na^+ y Na^+/K^+ para las vesículas expresando CtpE se asociarían a la presencia de la ATPasa CtpE, ya que los valores de corriente obtenidos son del mismo orden de magnitud que el reportado para otras ATPasas tipo P estudiadas con la misma técnica. Por ejemplo para la Na^+/K^+ ATPasa de riñón de cerdo luego de un salto en la concentración de ATP, se registran picos de corriente de 400 pA (Tadini *et.al.* 2008).

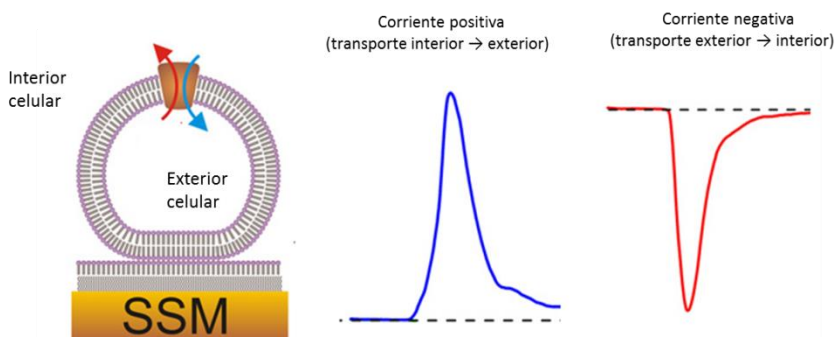
Los picos de corriente positiva obtenidos en presencia de Na^+ y Na^+/K^+ indicarían que el transporte de los cationes en CtpE ocurre desde el interior hacia el exterior celular. Esto concuerda con el mecanismo de transporte de las ATPasas tipo P y en particular de la

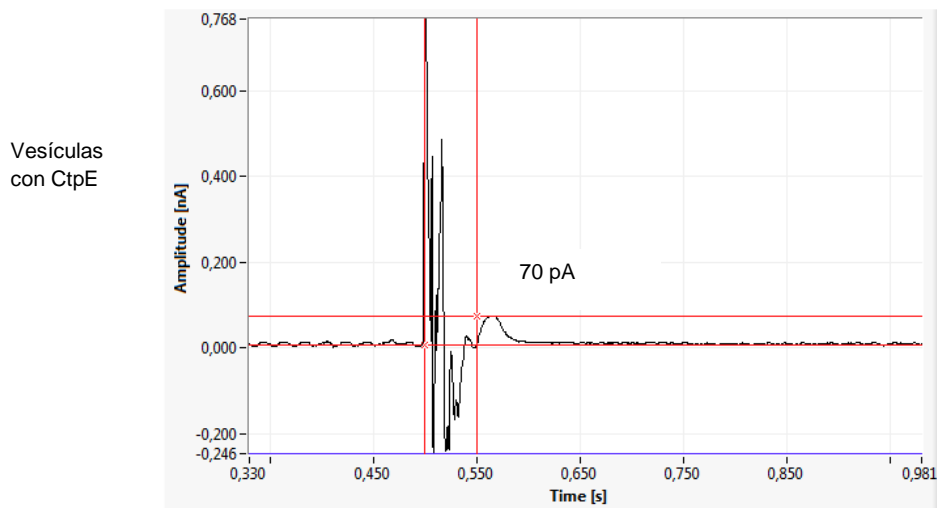
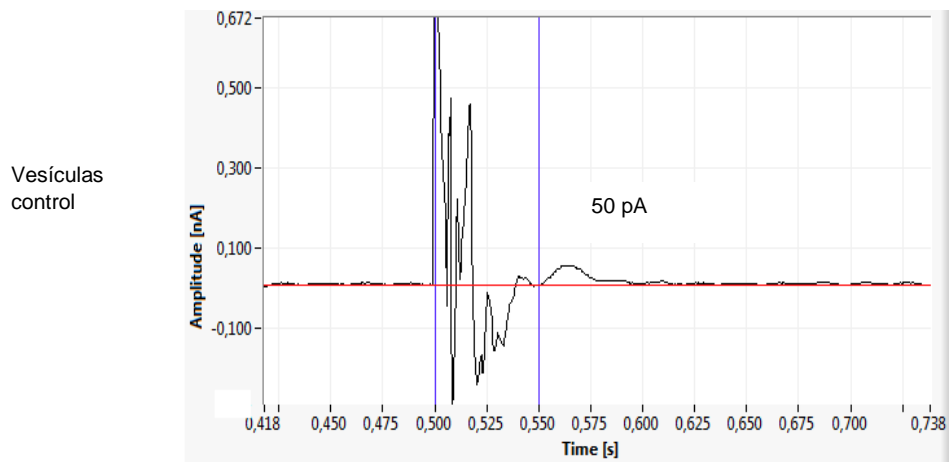
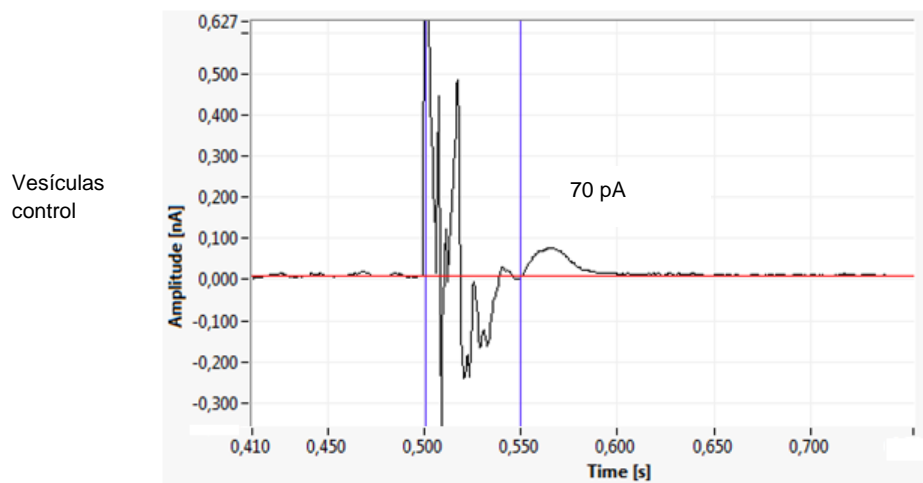
Na^+ ATPasa tipo P cuya función es exportar Na^+ y/o K^+ al medio extracelular a expensas de la hidrólisis de ATP (Benito *et. al.* 2002).

Al emplear únicamente K^+ , solo se detectó una señal de corriente negativa en las vesículas control (Figura 6-27 E), lo que indicaría que el catión es transportado desde la vesícula hacia la solución, es decir desde el exterior celular hasta el lado citoplasmático, función que ha sido asociada a la proteína KdpB de *E. coli* (Altendorf y Epstein, 1996).

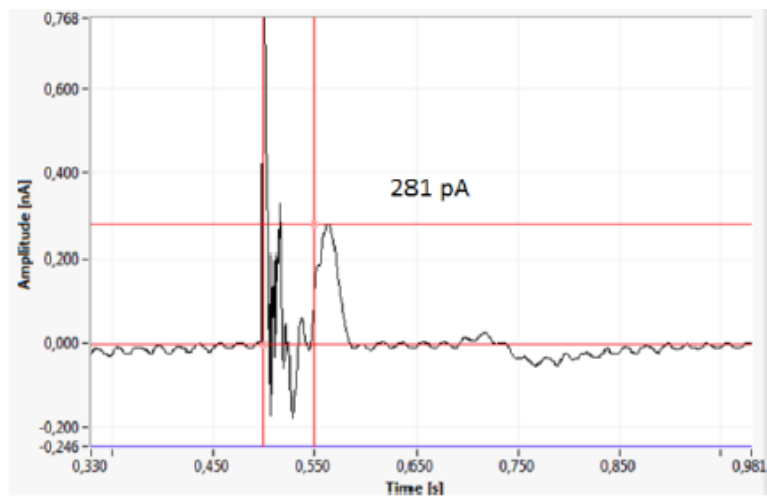
Figura 6-27: Señales eléctricas obtenidas mediante la técnica de SSM para las vesículas de membrana de *E. coli* expresando la proteína CtpE. **A)** Esquema de la interpretación cualitativa de las corrientes generadas en SSM al adsorber vesículas de membrana. Las vesículas en forma ISO, exponen el lado citoplasmático de la proteína a la solución que contiene los iones sustratos y el ATP. Si una carga positiva entra hacia la vesícula (desde citoplasma \rightarrow exterior) se genera una corriente positiva (flecha y curva azul), por el contrario si la carga positiva sale desde la vesícula (exterior \rightarrow citoplasma) se genera una corriente de carga negativa (flecha y curva roja). (Modificado de Mager *et. al.*, 2011) **B-E)** Corrientes transitorias generadas en presencia de diferentes cationes y luego de un salto en la concentración de ATP (300 μM) y siempre en presencia de Mg^{2+} (2 mM), cofactor de las ATPasas tipo P. Todos los experimentos se llevaron a cabo manteniendo constante la fuerza iónica con cloruro de colina. Las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2 **B)** Vesículas de membrana estimuladas únicamente por Mg^{2+} (2 mM). **C)** Vesículas de membrana estimuladas en presencia de los iones Na^+ (80 mM) **D)** Vesículas de membrana estimuladas en presencia de los iones Na^+ / K^+ (80 mM/ 50 mM). **E)** Vesículas de membrana estimuladas en presencia de K^+ 50 mM.

A)



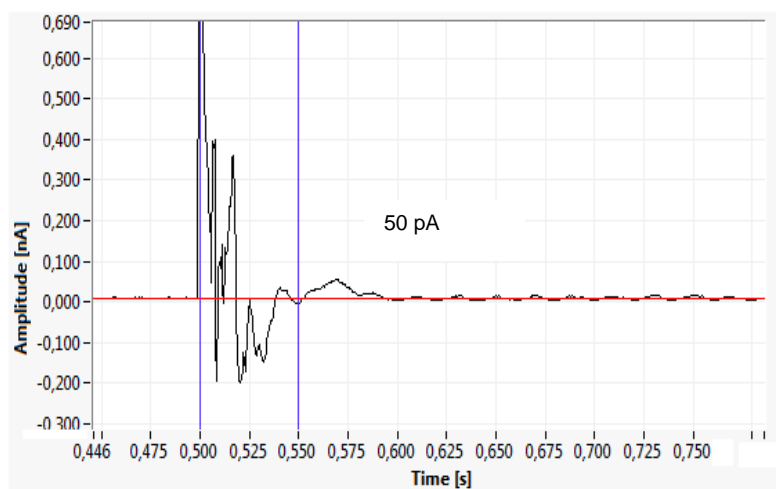
B) Activación por Mg^{2+} y ATP 300 μM **C) Activación con Na^+ y ATP 300 μM** 

Vesículas
con CtpE

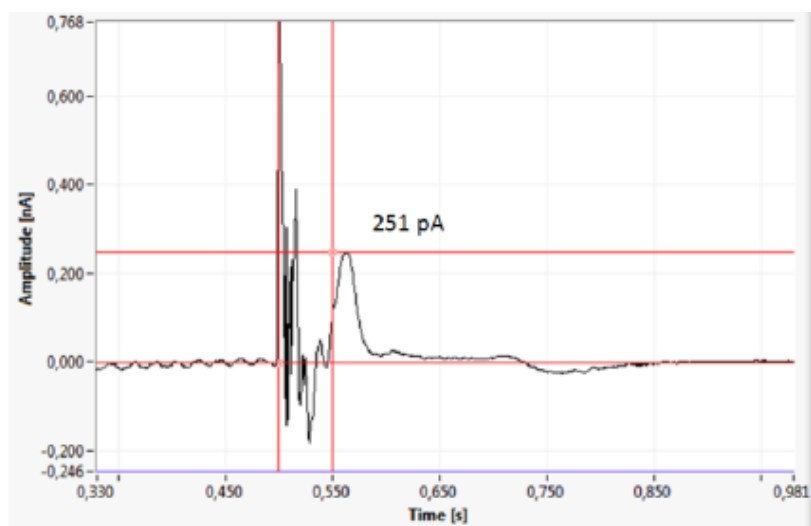


D) Activación con Na^+/K^+ y ATP 300 μM

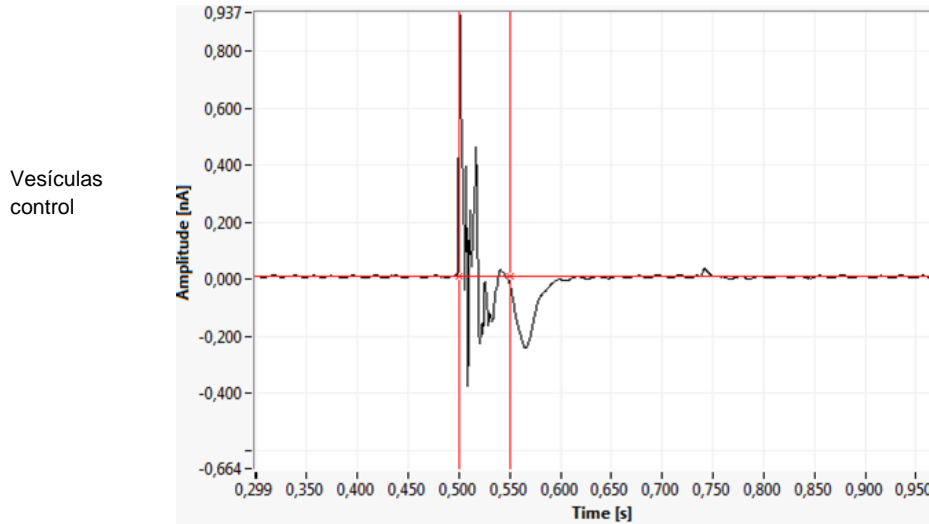
Vesículas
control



Vesículas
con CtpE



E) Activación por K^+ y ATP 300 μ M



Aunque los ensayos de actividad presentados anteriormente sugieren que efectivamente el sustrato de la proteína CtpE es Na^+ y/o K^+ , de todas formas una caracterización funcional de esta bomba aun requiere la purificación de la proteína y su reconstitución en liposomas, a fin de asegurar que la actividad y las señales registradas son debidas unicamente a CtpE al trabajar en un sistema controlado. En principio, y gracias al empleo de vesículas de membrana de *E. coli* sin transformar como control, las diferencias observadas en la actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas entre las vesículas de *E. coli* control y las vesículas expresando CtpE, se pueden correlacionar a la funcionalidad de la proteína expresada CtpE (Wang *et. al.* 2003).

Los resultados obtenidos, corroborarían las predicciones bioinformáticas previas en las que se sugirió que CtpE es un transportador de Na^+ (Novoa *et. al.*, 2012). Sin embargo, también podría esperarse que esta proteína transporte otros cationes como Li^+ y K^+ , como se ha reportado para otras Na^+ ATPasas tipo P (Ruiz y Ariño, 2007). La existencia de una Na^+ ATPasa tipo P en el proteoma de *M. tuberculosis*, sería el primer reporte de este tipo de bombas en una bacteria no alcalófila. Investigaciones a largo plazo, podrían revelar la importancia de CtpE en la supervivencia de este patógeno en el macrófago y su potencial como blanco terapéutico (Agranoff, 2004 y Korepanova, 2005).

7. Conclusiones

Se construyeron los recombinantes de clonación, **pJET 1.2 -CtpE**, y de expresión, **pBADA2 -CtpE**, del gen *ctpE* (*Rv0908*) de *M. tuberculosis* posible codificante de una Na⁺ ATPasa tipo P, basados en la amplificación del gen por PCR a partir de DNA genómico de la cepa no virulenta H37Ra.

Se logró expresar la proteína recombinante CtpE en *E. coli* TOP10 bajo la regulación del promotor araBAD. Al mismo tiempo se pudo comprobar la inserción de CtpE en la membrana plasmática de *E. coli*.

Estudios iniciales acerca de la especificidad iónica de la proteína CtpE (presente en las vesículas de membrana) por medio de ensayos enzimáticos de actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas (SSM), indicarían que efectivamente es capaz de transportar iones Na⁺ y/o K⁺.

Este es el primer acercamiento experimental para caracterizar funcionalmente la proteína CtpE de *M. tuberculosis*. La construcción de los recombinantes y la identificación de las condiciones de expresión en *E. coli*, representan un avance importante para elucidar los mecanismos moleculares involucrados en el transporte iónico mediado por ATPasas en micobacterias.

8. Perspectivas

Para continuar con la caracterización funcional de la proteína CtpE de *M. tuberculosis*, las nuevas investigaciones deben ser encaminadas a la purificación de la proteína CtpE a partir de las vesículas de membrana de *E. coli* y su posterior reconstitución en proteoliposomas.

A mediano plazo, se espera que los resultados obtenidos contribuyan a la comprensión del parasitismo intracelular de *M. tuberculosis* al interior del macrófago, específicamente, se busca establecer la función que cumplen este tipo de transportadores en la supervivencia del bacilo.

A largo plazo, estas investigaciones podrían aportar herramientas para el diseño de nuevas drogas antituberculosas.

A. Anexo: Vectores de clonación y expresión empleados en la presente investigación.

A continuación se presentan los mapas de los vectores que se emplearon para el desarrollo de este trabajo.

Figura A-1: Vector de clonación pGEMT®- easy (Promega)

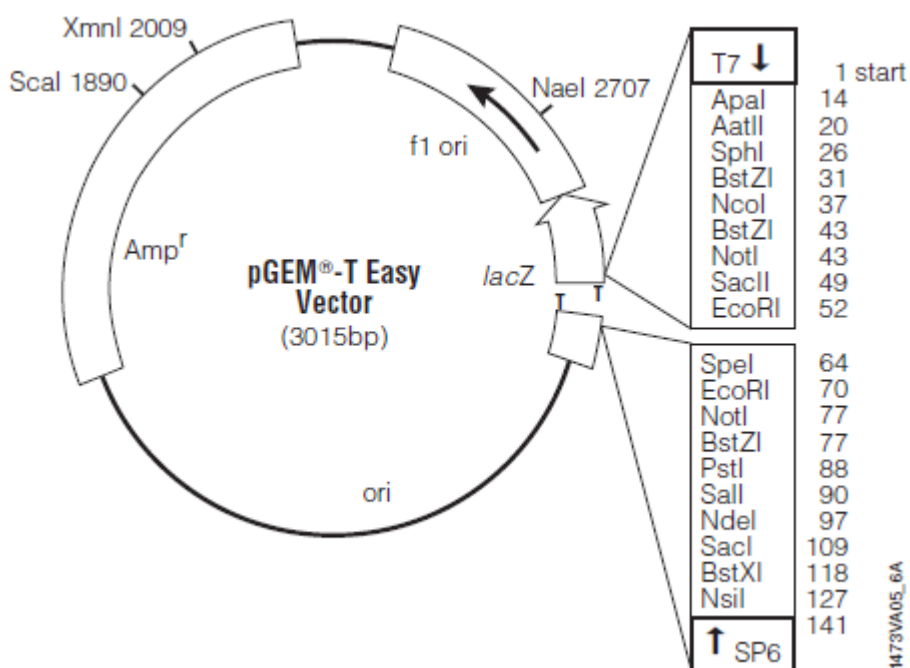


Figura A-2: Vector de expresión pET 19b ® (Novagen)

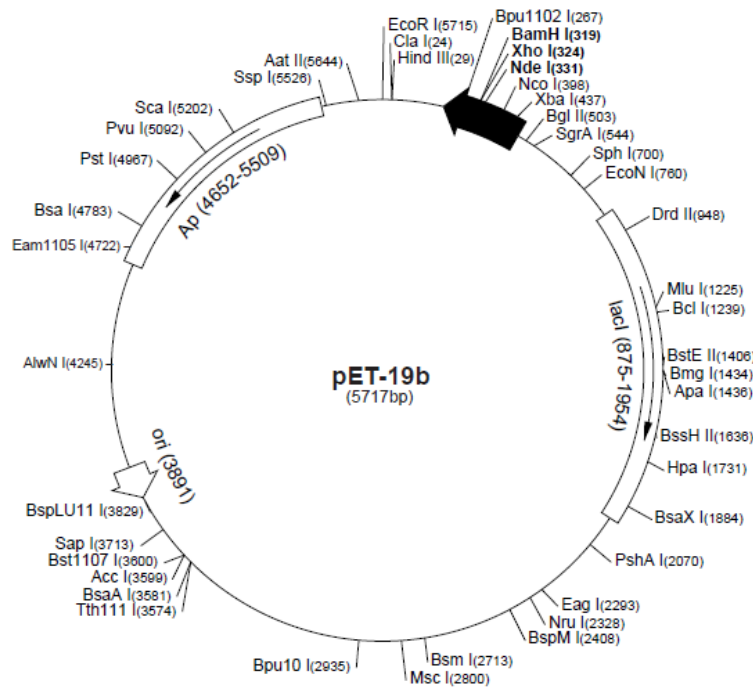


Figura A-3: Vector de clonación pJET 1.2 ® (Thermo Scientific /Fermentas)

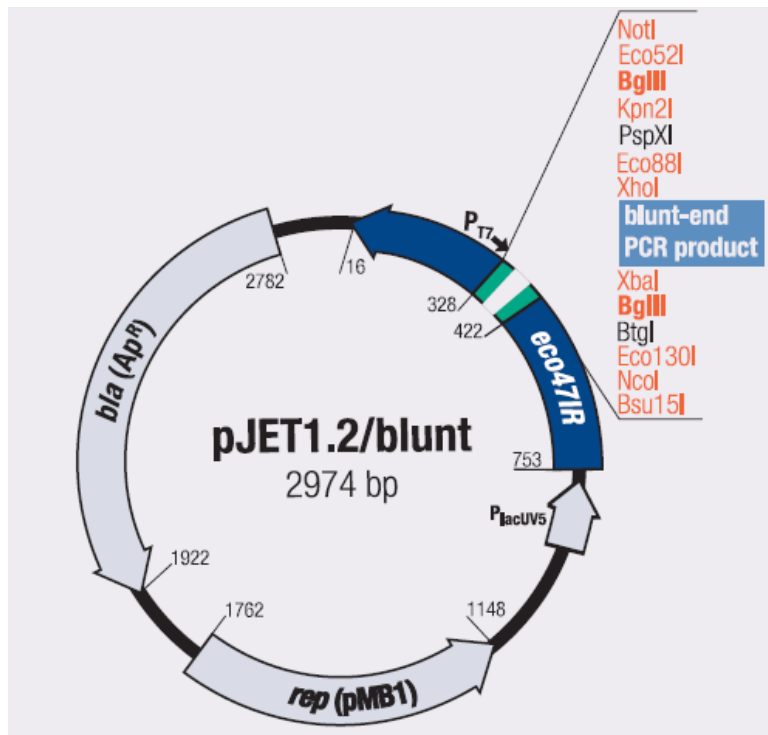


Figura A-4: Vector de expresión pBAD/HisA® (Invitrogen)

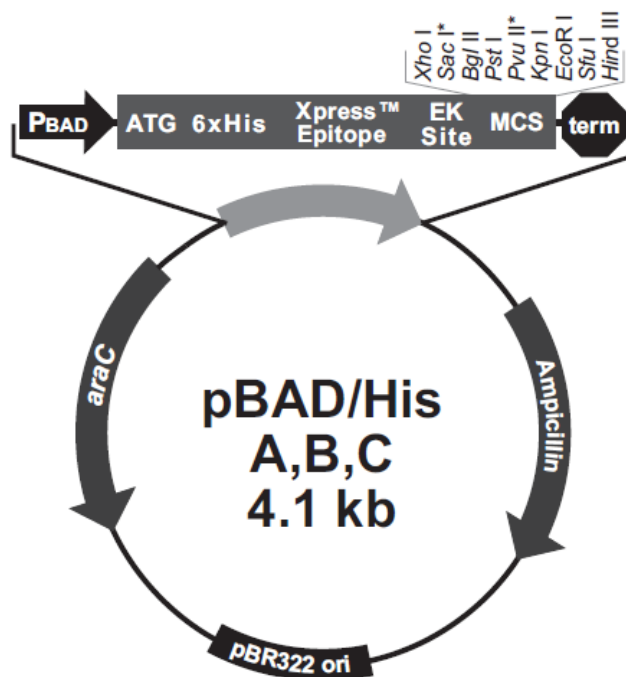


Figura A-5: Vector de expresión pBAD A2 modificado desde pBAD/HisA (MPI-Biophysics)

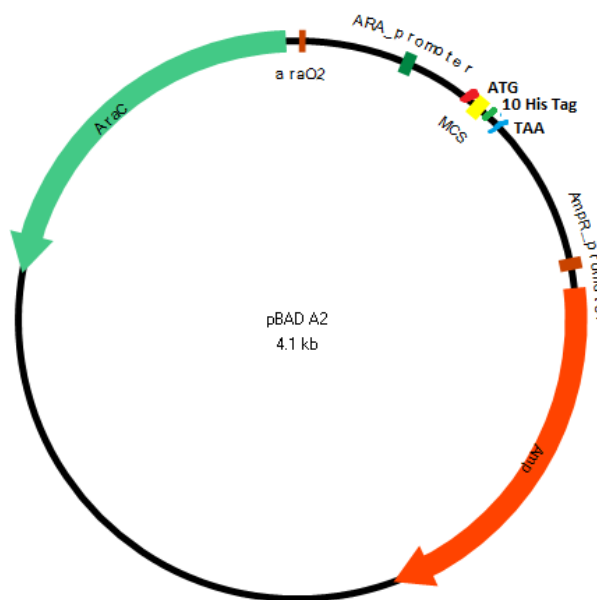
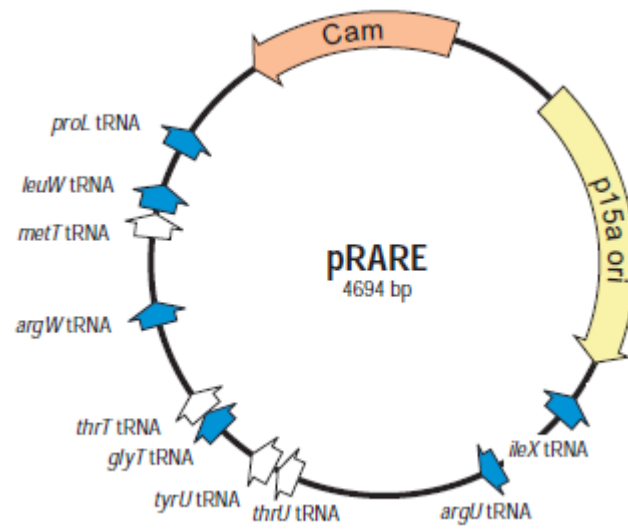


Figura A-6: Mapa del vector pRARE presente en la cepa de *E. coli* Rosetta 2 y el cual codifica tRNA poco comunes en *E. coli* (Novagen).



B. Anexo: Resultados de secuenciación de los recombinantes

pJET 1.2 CtpE: el fragmento *ctpE* se sitúa entre las posiciones 510- 2903 pb de la secuencia empleada como referencia (primera fila). Debajo se muestran los alineamientos con los fragmentos generados por cada uno de los iniciadores de secuenciación (Clone Manager).

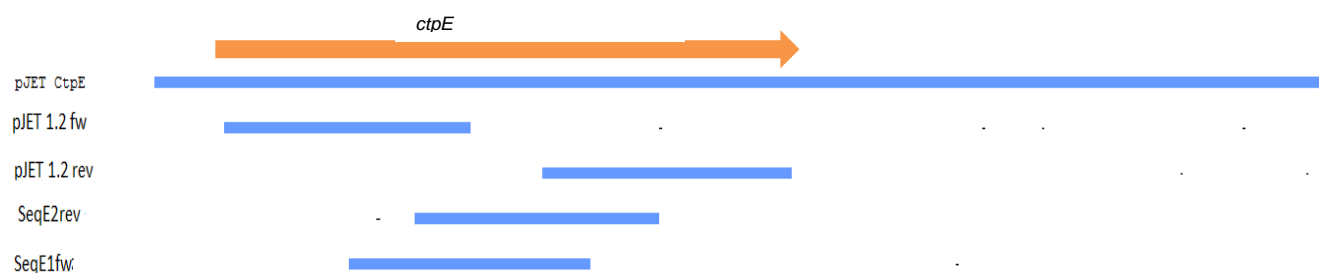
A continuación se enumeran los fragmentos generados y las posiciones en las que el alineamiento es exactamente el mismo. Como se observa, los solapamientos entre las secuencias abarcan la totalidad del gen.

Fragmento 1: 468 – 1280 pb

Fragmento 2: 1241 – 2184 pb

Fragmento 3: 1044- 2051 pb

Fragmento 4: 1979- 2990 pb



pJET CtpE
SeqE2rev 981 ccgatgtccaaagacgctggcgataacgctgatacggctggatgctggcagcttctggctcccggtccggccgctcacccggcccaaaaagctgaagcatatgacgcaaaactggcggccggagccagcaagtccaccctggg
53 ccgat---gcaagagcgt-gcgata-cgtgatgctggcagttctgctgctcc-gtggcg-ccgctaccggcccaccaaagtgggcaagcaagcatatgcaaccactggccggccggagccaagcagttcaaccctgggt

pJET CtpE
SeqE2rev 1121 gaaatccgaattcgcaacgcatcaacagattctgcagttccactctacttcttgggtcggcggcgcctcgtgacctctacaccagttcttcaccacacacagctggatggcggaaatccgtgttcggatggtgg
186 gaaatccgaattcgcaacgcatcaacagattctgcagttccactctacttcttgggtcggcggcgcctcgtgacctctacaccagttcttcaccacacacagctggatggcggaaatccgtgttcggatggtgg

pJET CtpE
SeqE2rev 1261 gcgctgtgtgcccagtgattcccccagaagcctggctgatgaacctgacatcgacctccgctcggggtggtcaggctggcggaggtccatgctgttgcagaaggttcccccagctgacggggtggcgaatg
326 gcgctgtgtgcccagtgattcccccagaagcctggctgatgaacctgacatcgacctccgctcggggtggcaggctggcggagctcaatgctctggggtgcaaggttcccccagctgaggggtgtggcgggtggaagctg

pJET CtpE
SeqE2rev 1401 gctctgccccacaagaccgcaactgaocgaaagtgcatgggggtctgaggtcgcaaggaaagtctgcccagctgcagggggcgtgcaaggaagtctgcccagttgctggcccccctggccgcgcgagaccgctccacaagc
466 gctctgccccacaagaccgcaactgaocgaaagtgcatgggggtctgaggtcgcaaggaaagtctgcccagctgcagggggcgtgcaaggaagtctgcccagttgctggcccccctggccgcgcgagaccgctccacaagc

pJET CtpE
SeqE2rev 1541 gacatcgaggaatccgcagggccttcactccgcgcggctgggtccgtggccgcaagcgccttcaagctggcacaagaagctgggagggcctcccttcgcgatacaggttaacttgggtgatctggggccgccagc
606 gacatcgaggaatccgcagggccttcactccgcgcggctgggtccgtggccgcaagcgccttcaagctggcacaagaagctgggagggcctcccttcgcgatacaggttaacttgggtgatctggggccgccagc

pJET CtpE
SeqE2rev 1681 tctgtctgatccggcttggtggggcagacagccaggcagattcgggggtgctgctgctgctgctgcaagtggccgtgcacatgcccgaagcgcgggttcaggtcccccgggtgagctgt
746 tctgtctgatccggcttggtggggcagacagccaggcagattcgggggtgctgctgctgctgctgcaagtggccgtgcacatgcccgaagcgcgggttcaggtcccccgggtgagctgt

pJET CtpE
SeqE2rev 1821 gttgtgctgagcagaaggtgcccgcgcagcccgtaaagcttatttctgcttcaagaattttctggttcaagaatggttccggctcaagggatctccgggtgacaacggcggctgcttggctgcccagccgctcgggctcagtg
886 gttgtgctgagcagaaggtgcccgcgcagcccgtaaagcttatttctgcttcaagaatggttccggctcaagggatctccgggtgacaacggcggctgcttggctgcccagccgctcgggctcagtg

pJET CtpE
SeqE2rev 1961 cyagcgatggatggcgtgcctgcccagcgggccgcaagaactggccgacacactgacctctaacacagttttggccgtggcccgcaagcgatctgctgatcattcactcacaggggaatccag
1026 cyagcgatggatggcgtgcctgcccagcgggccgcaagaactggccgacacactgacctctaacacagttttggccgtggcccgcaagcgatctgctgatcattcactcacaggggaatccag

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 1960 gcagaagcagtcgctgctgcgcagcggccgagcaaaactggccacacagcttccacacagcttttggcgtggcggcgcagcaagaagctggagctcgcctgctgcaatcacagggcacaac
102 gcagaagcagtcgctgctgcgcagcggccgagcaaaactggccacacagcttccacacagcttttggcgtggcggcgcagcaagaagctggagctcgcctgctgcaatcacagggcacaac

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2100 ttggcgatgaccggcagggcgtcaaacgactgcttcacctcaaggcctgatctggttggcgatgggtcggggcagccggctccgctggcgacagatcgtttgctgacaacccgggttgccacgctgc
241 ttggcgatgaccggcagggcgtcaaacgactgcttcacctcaaggcctgatctggttggcgatgggtcggggcagccggctccgctggcgacagatcgtttgctgacaacccgggttgccacgctgc

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2240 ccaatgtgctggcagggggctcgggtctatcggcaatatcgcaacgggtcgcgaatctatctccagactaagacgggtgtattcctgtgtggcgcctgctgggggttattgagctcattgcaataccgcgcggttgg
381 ccaatgtgctggcagggggctcgggtctatcggcaatatcgcaacgggtcgcgaatctatctccagactaagacgggtgtattcctgtgtggcgcctgctgggggttattgagctcattgcaataccgcgcggttgg

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2390 atccactctctccctccagccaatccacatcacaatccagcctattccatccgggtccactctggtgatcccaagccttcccaagccttccctccctcccccacaacagccagcctccagctctccctccctccctccctcc
321 atccactctctccctccagccaatccacatcacaatccagcctattccatccgggtccactctggtgatcccaagccttcccaagccttccctccctcccccacaacagccagcctccagctctccctccctccctccctccct

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2520 gcggtgccctcggactcactcggtcgcgactttcgcactatctggccctaccaggtcgtgacgcctcgtggcaggagcagcaagcggcgcagcctgcgctgcctgatccactgttggatgacctgacccggttatg
661 gcggtgccctcggactcactcggtcgcgactttcgcactatctggccctaccaggtcgtgacgcctcgtggcaggagcagcaagcggcgcagcctgcgctgcctgatccactgttggatgacctgacccggttatg

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2660 gggctggcggctgacccgaccccccatacgtggggcagactggccctggtgcttgcctccggactggccctattgggtgatcttcagcctcccgctggcgggagaaagtccctgtgtgagtgcccgaacccggcaag
801 gggctggcggctgacccgaccccccatacgtggggcagactggccctggtgcttgcctccggactggccctattgggtgatcttcagcctcccgctggcgggagaaagtccctgtgtgagtgcccgaacccggcaag

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2800 cgtcaatcgcctggcgttggctgggtgcgcggcaccattgagcagatgtgtgtgacccgaagcagatgctcgtgtgaaacccgagattgagcagcagctccgcgagctagccccgagttcggg
941 cgtcaatcgcctggcgttggctgggtgcgcggcaccattgagcagatgtgtgtgacccgaagcagatgctcgtgtgaaacccgagattgagcagcagctccgcgagctagccccgagttcggg

pJET CtpE
pJET 1.2 rev 2940 caatccagggcgttcgctgctcattcagcggccatcggcatcctcaaatatcctcagctgcaactggaatcctcaaatatcctcagctgcaactggaatcctcatttcttctcacaagatcctcagctgatatta
1081 caatccagggcgttcgctgctcattcagcggccatcggcatcctcaaatatcctcagctgcaactggaatcctcaaatatcctcagctgcaactggaatcctcatttcttctcacaagatcctcagctgatatta

pBADA2- CtpE: el fragmento *ctpE* se sitúa entre las posiciones 340-2730 pb de la secuencia empleada como referencia (primera fila). Debajo se muestran los alineamientos con los fragmentos generados por cada uno de los iniciadores de secuenciación (Clone Manager).

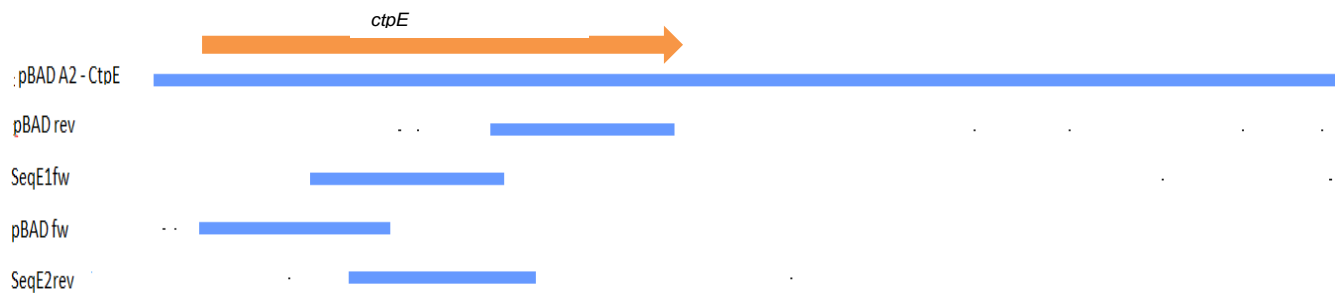
A continuación se enumeran los fragmentos generados y las posiciones en las que el alineamiento es exactamente el mismo. Como se observa, los solapamientos entre las secuencias abarcan la totalidad del gen.

Fragmento 1: 266-1242 pb

Fragmento 2: 849-1880 pb

Fragmento 3: 1071-2014 pb

Fragmento 4: 1871-2774 pb



C. Anexo: Alineamientos de las secuencias nucleotídicas del gen *ctpE* en las cepas de *M. tuberculosis* H37Ra y H37Rv.

Alineamiento global de las secuencias nucleotídicas del gen *ctpE* de las cepas *M. tuberculosis* H37Ra y H37 Rv empleando el programa CloneManager.

Número de acceso del gen *ctpE* de *M. tuberculosis* H37Ra: NC_009525.1 Región: 1013039 – 1015432

Número de acceso del gen *ctpE* de *M. tuberculosis* H37Rv: NC_000962 Región: 1011731 -1014124

```

ctpE H37Rv      1 atgaccogtctggctctggcgacagccggtttgaccgatgcccgaagtggcgcaacgggtgcccgaaggcaaggaacacgatcccggaacgggtcaccgcaccgtctgggcagatcgtccgggccaacgtattcaocgg
ctpE H37Ra      1 atgaccogtctggctctggcgacagccggtttgaccgatgcccgaagtggcgcaacgggtgcccgaaggcaaggaacacgatcccggaacgggtcaccgcaccgtctgggcagatcgtccgggccaacgtattcaocgg

ctpE H37Rv     141 gatcaacoggatctctggcgcttttggctgctcactgctctggcgacgggctcgttgatcaacogggatgctggccctgctcactatcgccaaacoggtcactggcatggtccaggagatccgtgccaaagcagacgctggaca
ctpE H37Ra     141 gatcaacoggatctctggcgcttttggctgctcactgctctggcgacgggctcgttgatcaacogggatgctggccctgctcactatcgccaaacoggtcactggcatggtccaggagatccgtgccaaagcagacgctggaca

ctpE H37Rv     281 aactcogcatcatcggaacgggcaaacogtgggtgcccaggaactccggaacgcgcacggctcgacccaacgaggtggtgctggacgacatcactgaacttgggcccggggaccaggttctgctcgaacggcaggtctgc
ctpE H37Ra     281 aactcogcatcatcggaacgggcaaacogtgggtgcccaggaactccggaacgcgcacggctcgacccaacgaggtggtgctggacgacatcactgaacttgggcccggggaccaggttctgctcgaacggcaggtctgc

ctpE H37Rv     421 gaggagaaaacttgagatcgacgaatcattgctgaccogggagggccacccgatgccaagaacgctggcgataccogtcatgctgggcaagttctgctctccggctccggccaccacgaagctcggcag
ctpE H37Ra     421 gaggagaaaacttgagatcgacgaatcattgctgaccogggagggccacccgatgccaagaacgctggcgataccogtcatgctgggcaagttctgctctccggctccggccaccacgaagctcggcag

ctpE H37Rv     561 cgaagcattatgacgcaaaactggccgcogagggccagcaagttcaacctggtgaaatccgaattggcgcaacggcatcaacaggatctcgaagttcacttacttgggtggccggccgctcctgacctacaccc
ctpE H37Ra     561 cgaagcattatgacgcaaaactggccgcogagggccagcaagttcaacctggtgaaatccgaattggcgcaacggcatcaacaggatctcgaagttcacttacttgggtggccggccgctcctgacctacaccc

ctpE H37Rv     701 agttggtccaccacacagctgggatggcggaatccgtgctgggatggtggcgccgctggtgcccagggcctggtgatgaacctgatcgcccttcggctgggggtggtcaggctcggccagcgtcaa
ctpE H37Ra     701 agttggtccaccacacagctgggatggcggaatccgtgctgggatggtggcgccgctggtgcccagggcctggtgatgaacctgatcgcccttcggctgggggtggtcaggctcggccagcgtcaa

ctpE H37Rv     841 tgcctggtgcaagagttgcccgcctcgaaggggtggcgccggtggaagctctgcgcgcaacaagccggcaccactgaccgaaagtggcatcggggtctggcaggtcgaagagctcgaacgggctggtcgaacgaaag
ctpE H37Ra     841 tgcctggtgcaagagttgcccgcctcgaaggggtggcgccggtggaagctctgcgcgcaacaagccggcaccactgaccgaaagtggcatcggggtctggcaggtcgaagagctcgaacgggctggtcgaacgaaag

ctpE H37Rv     981 tgtccogcatgctgctggccgctggccgcgcgcgacccgctcccaacgcgacgatcaggcaatgcccagggccttcaactgcccggggctgggtcgtggccgcgaaacgcgcttcaagtggccaccacgaagtga
ctpE H37Ra     981 tgtccogcatgctgctggccgctggccgcgcgcgacccgctcccaacgcgacgatcaggcaatgcccagggccttcaactgcccggggctgggtcgtggccgcgaaacgcgcttcaagtggccaccacgaagtga

ctpE H37Rv     1121 gggcgctcctcttcogcatcaccgtaaacgggtgatcggcgccgcgacgctgctcctgatccggctctgggtggcgccgaagcagccgagcagatcggagcagcagggatgctgggtgctgctgctgctgctggcagt
ctpE H37Ra     1121 gggcgctcctcttcogcatcaccgtaaacgggtgatcggcgccgcgacgctgctcctgatccggctctgggtggcgccgaagcagccgagcagatcggagcagcagggatgctgggtgctgctgctgctgctggcagt

ctpE H37Rv     1261 gttggcctgacacatgcccgaagccgggtcaggtcaccocggtagccctggttggctggagcagaaggtgcccgcgacgcccgtgaaacogtggatattttgcttccagaatgcttcggtcaaggtgatccgg
ctpE H37Ra     1261 gttggcctgacacatgcccgaagccgggtcaggtcaccocggtagccctggttggctggagcagaaggtgcccgcgacgcccgtgaaacogtggatattttgcttccagaatgcttcggtcaaggtgatccgg

ctpE H37Rv     1401 tgacaacoggggtgctggttggctgctgcccagcggctcgggtgctgctggcaggggatggatgcccgtgctgctgcccagggccgcaagaactggccgacacactggactcttacaccagtttggccgtgctggc
ctpE H37Ra     1401 tgacaacoggggtgctggttggctgctgcccagcggctcgggtgctgctggcaggggatggatgcccgtgctgctgcccagggccgcaagaactggccgacacactggactcttacaccagtttggccgtgctggc

ctpE H37Rv     1541 cggacagaagcgtcgtgatcgtgcatgctgcaatcacaacggcacaacgtggcgatgaccggcgaagggctcaacgacgtgcttgccctcaaggacgctgatcgggtgggcatgggctcgggcaagccggccctcg
ctpE H37Ra     1541 cggacagaagcgtcgtgatcgtgcatgctgcaatcacaacggcacaacgtggcgatgaccggcgaagggctcaacgacgtgcttgccctcaaggacgctgatcgggtgggcatgggctcgggcaagccggccctcg

ctpE H37Rv     1681 cgtcgggtggcacaagatcgtgctgctgcaacaacgggttgccacgctccccattggttggcgagggggctcgggtcactcggcaatcgaacgggtcggcaactctatctcctgactaacagcgtgattccogtctgct
ctpE H37Ra     1681 cgtcgggtggcacaagatcgtgctgctgcaacaacgggttgccacgctccccattggttggcgagggggctcgggtcactcggcaatcgaacgggtcggcaactctatctcctgactaacagcgtgattccogtctgct

ctpE H37Rv     1821 ggcgctgctgggtgggtattgagtgcttaattgcaataccgctgcccggctgacccgctgcttggctcccgctccagccgatcaccactcaccatcggcggctgggttcaactatcgggatcccaagcgttcaactccttggcgc
ctpE H37Ra     1821 ggcgctgctgggtgggtattgagtgcttaattgcaataccgctgcccggctgacccgctgcttggctcccgctccagccgatcaccactcaccatcggcggctgggttcaactatcgggatcccaagcgttcaactccttggcgc

ctpE H37Rv     1961 ccaacaacgagcgggctcactccggcctcgttcggcgagttatgacgctcctgcccgtggcgttgggaactcaggttgcgactttcgtcaacctatctggccgcttacaccaggtcgtcactcgtcgtggcagagcag
ctpE H37Ra     1961 ccaacaacgagcgggctcactccggcctcgttcggcgagttatgacgctcctgcccgtggcgttgggaactcaggttgcgactttcgtcaacctatctggccgcttacaccaggtcgtcactcgtcgtggcagagcag

ctpE H37Rv     2101 gaacagcgtcgaacccgtcggctgatcagcttgggtgatcaccoggttatgggtgctgcccgtgatcggcagccctcactcagttggtggcagctggcgtggtgctgctcgggactggcctatggtgatctcagcct
ctpE H37Ra     2101 gaacagcgtcgaacccgtcggctgatcagcttgggtgatcaccoggttatgggtgctgcccgtgatcggcagccctcactcagttggtggcagctggcgtggtgctgctcgggactggcctatggtgatctcagcct

ctpE H37Rv     2241 tccgctggcggggagaagttccctgctggtatgctcgaacctggcgacagctcaactcogcctggcggttggcgtggtgggtgcccgaacctgaggcagatgctggatcogaagcaggtatgctcgggtgaaaccca
ctpE H37Ra     2241 tccgctggcggggagaagttccctgctggtatgctcgaacctggcgacagctcaactcogcctggcggttggcgtggtgggtgcccgaacctgaggcagatgctggatcogaagcaggtatgctcgggtgaaaccca

ctpE H37Rv     2381 gagtggtggcgataa
ctpE H37Ra     2381 gagtggtggcgataa

```

Referencias

Agranoff D., Krishna S. (2004) Metal Ion Transport and Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience* **2**, 2996-3006.

Agranoff D., Krishna S. (1998) Metal ion homeostasis and Intracellular parasitism. *Molecular Microbiology* **28**, 403-412.

Almeida- Amaral E., Caruso – Neves C., Pereira M., Meyer J. (2008) *Leishmania amazonensis*: Characterization of an ouabain insensitive Na⁺ ATPase activity. *Experimental parasitology* **118**, 165-171.

Altendorf K., Epstein W. (1996) The Kdp ATPase of *Escherichia coli*. *Biomembranes a multiple trease*. **5**, 403- 420.

Altendorf K., Staehelin L. (1974). Orientation of Membrane Vesicles from *Escherichia coli* as Detected by Freeze-Cleave Electron Microscopy. *Journal of Bacteriology* **117**, 888-899.

ApE- A Plasmid Editor v.2.0.40. Software by M. Wayne Davies. (2003) <http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/>

Applichem (2008) <http://www.applichem.com/fileadmin/Broschueren/Detergenzien.pdf>
Fecha de consulta: 25/03/2013

Bazzone A., Steuer W., Fendler K. (2012) Video: Introduction to solid supported membrane based electrophysiology. Aún no publicado obtenido por comunicación personal.

Benito B., Garciadeblás B., Rodriguez A. (2002) Potassium or sodium efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi. *Microbiology* **148**, 933-941.

Botella H., Peyron P., Levillain F., Poincloux R., Poquet Y., Brandli I. *et. al.* Mycobacterial P1 Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages. *Cell Host and Microbe* **10**, 248-259.

Botella H., Stadhagen G., Lugo G., Chastellier C., Neyrolles O. (2012) Metallobiology of host –pathogen interactions: an intoxicating new insight. *Trends in Microbiology* **20**, 106-112.

Boyd C. (1993) Turbo cloning: a fast, efficient method for cloning PCR products and other blunt-ended DNA fragments into plasmids. *Nucleic Acids Research*, **21**, 817-821.

Bradford M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**, 248-274.

BvTech Plasmid. Plasmid drawing Software Version 5.1 (2003)

Carneiro S., Ferreira E., Rocha I. (2012) Metabolic responses to recombinant bioprocesses in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* <http://dx.doi.org/10.1016/j.jbiotec.2012.08.026>.

Chastellier C. (2009) The Many Niches and Strategies Used by Pathogenic Mycobacteria for Survival Within Host Macrophages. *Inmunobiology* **214**, 526-542.

Cheung Lab. http://www.dartmouth.edu/~staphy/protocol/southern_with_dig_probe.html
Fecha de consulta: 15/2/13

Chintalapati S., Kurdi R., Terswisscha A., Kühlbrandt W. (2008). Membrane Structure of CtrA3, a Copper-transporting P-type-ATPase from *Aquifex aeolicus*. *Journal Molecular Biology* **378**, 581-595.

Clone Manager 9,0 Professional Edition Software (2010)

Cosma C., Sherman D., Ramakrishnan L. (2003) The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annual Review of Microbiology* **57**, 641-676

Cuesta J. (2010) Caracterización y efecto producido por las condiciones de hipoxia e inanición en la actividad Na⁺ ATPasa de bacterias del género *Mycobacterium*. Tesis de Grado dirigida por el Profesor Carlos Yesid Soto. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia.

Dafeé M. (2008) Capítulo 1: The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope. In *The Mycobacterial Cell Envelope* pág. 3-11 Ed. ASM Press Ciudad Washington DC, USA.

Dafeé M., Etienne G. (1999) The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tubercle and Lung Disease* **79**, 153-169.

Ernst J. (1998) Macrophage Receptors for *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity* **66**, 1277-1281.

Fendler K., Jaruschews S., Hobbs A., Albers W., Froehlich J. (1993) Pre- Steady –State Charge Translocation in NaK – ATPase from Eel Electric Organ. *The Journal of General Physiology* **102**, 631-666.

Gomez J. (1996) Capitulo 2: Interacciones entre Lípidos y Proteínas en las *Biomembranas*. *Biofísica y Fisiología Celular*. 1 ed. Ed. Grafivalme. Ciudad Sevilla, España. Pág. 51-65

- Gordon E., Horsefield R., Swarts H., Pont J., Neutze R., Snijder A. (2008) Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification* **62**, 1–8
- Goren MB. (1972) Mycobacterial Lipids: Selected Topics. *Bacteriological Reviews* **36**, 33-64
- Grunenwald H. (2003) Capítulo 20: Optimization of Polymerase Chain Reactions. *PCR Protocols*. 2 ed. Ed. Humana Press, Ciudad New Jersey, USA.
- Guo B., Bi Y. (2002) Capítulo 12: Cloning PCR products. *PCR Cloning Protocols*. 2 ed. Ed. Humana Press. Ciudad New Jersey, USA
- Häse C., Fedorova N., Galperin M., Dibrov P. (2001) Sodium Ion Cycle in Bacterial Pathogens: Evidence from Cross-Genome Comparisons. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **65**, 353-370.
- Heefner D., Harold F. (1982) ATP driven sodium pump in *Streptococcus faecalis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America (PNAS)* **79**, 2798 -2802
- Hett E., Rubin E. (2008) Bacterial Growth and Cell Division: a Mycobacterial Perspective. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **72**, 126- 156.
- INS. Instituto Nacional de Salud (2009). Plan Estratégico. Colombia Libre de Tuberculosis 2010-2015 para la Expansión y el Fortalecimiento de la Estrategia alto a la TB. Pág. 9 Ed. Gráficas Ducal. 3 ed. Ciudad Bogotá, Colombia.
- Kaur J., Bachhawat A. (2009) A modified Western blot protocol for enhanced sensitivity in the detection of a membrane protein. *Analytical Biochemistry* **384**, 348-349
- Kapust R., Tozsér J., Fox J., Anderson E., Cherry S., Copeland T., Waugh D. (2001) Tobacco etch virus protease: mechanism of autolysis and rational design of stable mutants with wild type catalytic proficiency. *Protein Engineering* **14**, 993-1000.
- Kolmodin L., Birch D. (2002) Capítulo 1 Polymerase Chain Reaction. *PCR Cloning Protocols*. 2 ed. Ed. Humana Press Ciudad New Jersey, USA
- Korepanova A. Gao F., Hua Y., Qin H., Nakamoto R. Cross T. (2005) Cloning and Expression of multiple membrane proteins of *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli*. *Protein Science* **14**, 148-158
- Korepanova A., Moore J., Nguyen H., Hua Y., Cross T., Cross T. (2007) Expression of membrane proteins from *Mycobacterium tuberculosis* in *Escherichia coli* as fusions with maltose binding protein. *Protein Expression and Purification* **53**, 24–30

- Koul A., Arnoult E., Lounis N., Guillermont J., Andries K. (2011) The Challenge of New Drug Discovery for Tuberculosis. *Nature* **469**, 483-490.
- Koyama N. (1999) Presence of Na⁺ Stimulated P-type ATPase in the Membrane of a Facultatively Anaerobic Alkaliphile, *Exiguobacterium aurantiacum*. *Current Microbiology* **39**, 27-30.
- Kühlbrandt W. (2004) Biology, Structure and Mechanism of P- type ATPases. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **5**, 282-295.
- Kurien B., Scofield R. (2003) Protein blotting: a review. *Journal of Immunological Methods* **274**, 1 – 15
- Lanzetta P., Alvarez L., Reinach P Candia O.(1979) An improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate. *Analytical Biochemistry* **100**, 95–97.
- Latorre R., López-Barneo J., Bezanilla F., Llinás R. (1996) Biofísica y Fisiología Celular. Ed. Universidad de Sevilla. Ciudad Sevilla, España.
- Läuger P. (1991) Electrogenic Ion Pumps. 1ed. Ed. Sinauer Associates. Ciudad Sunderland, Mass, USA.
- Lewinson O., Lee T., Rees D. (2008) The Funnel Approach to the Recrystallization Production of Membrane Proteins. *Journal of Molecular Biology* **377**, 62-73.
- Lewinson O., Lee T., Rees D. (2009) A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. . *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America (PNAS)* **12**, 4677- 4682
- Lougheed K., Taylor D., Osborne S., Bryans J., Buxton R. (2009) New anti- tuberculosis agents amongst known drugs. *Tuberculosis* **89**, 364-370
- MacPhee D. (2009) Methodological considerations for improving Western blot analysis. *Journal of Pharmacological and Toxicological Methods* **61**, 171–177
- Mager T., Rimon A., Padan E., Fendler K. (2011) Transport Mechanism and pH Regulation of the Na⁺/K⁺ antiporter NhaA from *Escherichia coli*. *The Journal of Biological Chemistry*, **286**, 23570-23581.
- Mandal A., Cheung W., Argüello J. (2002) Characterization of a Thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺ ATPase from the Extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *The Journal of Biological Chemistry* **9**, 7201-7208
- MINSALUD (2012) Ministerio de Salud y Protección Social. ¿Qué es Tuberculosis (TB)? <http://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/Tuberculosis.aspx> Fecha de Consulta: 27/11/2012

Miroux B. Walker J. (1996) Over-production of Proteins in *Escherichia coli*: Mutant Hosts that Allow Synthesis of some Membrane Proteins and Globular Proteins at High Levels. *Journal of Molecular Biology* **260**, 289-298.

Mülhardt C. (2006) Der experimentator molekularbiologie. 5 ed. Ed. Elsevier. Ciudad München, Alemania.

Murray P., Rosenthal K., Pfaller M. (2006) Micobacterias. *Microbiología Médica*. Cap. 29 Ed. Elsevier Mosby, 5 ed. Ciudad Madrid, España.

Niederweis M. (2008) Nutrient Acquisition by Mycobacteria. *Microbiology* **154**, 679-692.

Novoa L., León A., Patiño M., Cuesta J., Salazar M., Landsman D. Marino L., Soto C. (2012). In silico Identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Structural Biology*, **12**, 25

Novy R., Drott D., Yaeger K., Mierendorf R. (2001) Overcoming the codon bias of *E. coli* for enhanced protein expression. *Innovations* **12**, 1-3.

Origin 8.1 SR3 v 8.1.34.90 Software (2010) OriginLabCorporation

Padan E., Hunte C., Reiländer H. (2003) Capítulo 3: Production and Purification of Recombinant Membrane Proteins. *Membrane Protein Purification and Crystallization: A Practical Guide*. 2ed. Ed Elsevier. USA

Page M., Di Cera E. (2006) Role of Na⁺ and K⁺ in Enzyme Function. *Physiological Reviews* **86**, 1049-1092.

Palmgren M., Axelsen K. (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochimica et Biophysica Acta* **1365**, 37-45.

Palmgren M., Niseen P. (2011) P-type ATPases. *Annual Review of Biophysics* **40**, 243-266.

Park, S. Bendelac A. (2000) CD1 restricted T- cell responses and microbial infection. *Nature* **406**, 788-792.

Pedersen P. (2007) Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related of types, structures, functions and roles in health and disease. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* **39**, 349-355

Pinoni S., Lopez A., (2009) Na⁺ ATPase activities in chela muscle of the euryhaline crab *Neohelice granulata*: Differential response to environmental salinity. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* **372**, 91-97.

Pintschovius J., Fendler K. (1999) Charge Translocation by the Na⁺/K⁺ ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Rapid Solution Exchange with a New Technique. *Biophysical Journal* **76**, 814-826.

Pintschovius J., Fendler K. Bamberg E. (1999) Charge Translocation by the Na⁺/K⁺ ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Cytoplasmatic Cation Binding and Release. *Biophysical Journal* **76**, 827- 836.

QUIAGUEN (2003) The QIAexpressionist. A handbook for high level expression and purification of 6xHis-tagged proteins. 5ed. <http://www.qiagen.com/literature/> Fecha de consulta: 30/11/2012

Rachman H., Kaufmann S. (2007) Exploring functional genomics for the development of novel intervention strategies against tuberculosis. *International Journal of Medical Microbiology* **297**, 559-567.

Raimunda D., Long J., Sasseti C., Argüello J. (2012) Role in metal homeostasis of CtpD, a Co²⁺ transporting P1B4 ATPase of *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology* **84**, 1139- 1149.

Reisinger V., Eichacker L. (2008) Solubilization of membrane protein complexes for blue native PAGE. *Journal of Proteomics* **71**, 277- 283

Rocafull M., Romero F., Thomas L., Castillo J. (2012) The second sodium pump: from the function to the gene. *European Journal of Physiology*. **463**, 755–777

Rocafull M., Romero F., Thomas L., Castillo J. (2011) Isolation and Cloning of the K⁺-independent, ouabain – insensitive Na⁺ ATPase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1808**, 1684 -1700.

Ruiz A. Ariño J. (2007) Function and Regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ENA Sodium ATPase system. *Eukaryotic Cell* **12**, 2175- 2183.

Santa Cruz Biotechnology (2013) <http://datasheets.scbt.com/sc-8036.pdf> Fecha de Consulta: 19/02/2013

Santos P., Gordillo A., Osses L., Salazar L. Soto C. (2012) Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides*, **36**, 121-128.

Sambrook J., Russel D. (2001) Molecular Cloning: A laboratory manual. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Ciudad New York, USA.

Seddon A., Curnow P., Booth P. (2004) Membrane proteins, lipids and detergents: not just a soap opera. *Biochimica et Biophysica Acta* **1666**, 05– 117

- Sharma R., Rensing C., Rosen B., Mitra B. (2000) The ATP Hydrolytic Activity of Purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)- translocating ATPase from *Escherichia coli*, *The Journal of Biological Chemistry and Molecular Biology* **275**, 3873-3878
- Schlieff R. (2000) Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends in genetics* **16**, 559-565
- Schulz P., Garcia-Celma J., Fendler K. (2008)SSM-based electrophysiology. *Methods* **46**, 97-103
- Soldati T., Neyrolles O., (2012) Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic* 1-11.
- Sørensen H. Kusk K. (2005) Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *Journal of Biotechnology* **115**, 113–128
- SurfE R One Control Version 3.5.2 (2004) IonGate Bioscience.
- Sundaramurthy V., Pieters J. (2007) Interactions of Pathogenic Mycobacteria with Host Macrophages. *Microbes and Infection* **9**, 1671-1679
- Suzuki Y., Ueno S., Ohnuma O., Koyama N. (2005) Cloning, sequencing and functional expression in *Escherichia coli* of the gene for a P-type Na⁺ ATPase of a facultatively anaerobic alkaliphile, *Exiguobacterium aurantiacum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **1727**, 162-168.
- Tadini- Buoninsegni F., Bartolommei G., Moncelli M., Fendler K. (2008) Charge transfer in P-type ATPases investigated on planar membranes. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **476**, 75-86.
- Terpe K. (2006) Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology Biotechnology* **72**,211–222.
- Thever M. Saier M. (2009) Bioinformatic Characterization of P-Type ATPases Encoded Within the Fully Sequenced Genomes of 26 Eukaryotes. *Journal of Membrane Biology* **229**, 115-130.
- Tomashefski J., Farver C. (2008) Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*. Vol 1. Cap 9. Ed Springer, 3 ed. Ciudad New York, USA.
- Toyoshima C., Kanai R., Cornelius F. (2011) First Crystal Structures of Na⁺, K⁺ ATPase: New Ligh on the Oldest Ion Pump. *Cell Press Structure* **19**, 1732 -1738

Ueno S., Kaieda N., Koyama N. (2000) Characterization of a P- type ATPase of a Facultatively Anaerobic Alkaliphile, *Exiguobacterium aurantiacum*. *The Journal of Biological Chemistry* **19**, 14537-14540.

Ventrella V., Elvir J., Borgatti A., Trigari G., Proverbio T., Pagliarani A., Trombetti F., Pirini M., Marin M., Proverbio F. (2010) Phosphorylated intermediate of the ouabain-insensitive, Na⁺-stimulated ATPase in rat kidney cortex and rainbow trout gills. *Biochimie* **92**, 128-135.

Wagner D., Maser J., Lai B., Cai Z., Barry C., Bentrup K., Russel D., Bermudez L. (2005) Elemental analysis of *Mycobacterium avium*- *Mycobacterium tuberculosis*-, *Mycobacterium smegmatis*- Containing phagosomes Indicates Pathogen –Induces Microenviroments within the host cell’s endosomal system. *Journal of Immunology* **174**, 1491-1500.

Wagner S., Klepsch M., Schlegel S., Appel A., Draheim R., Tarry M. *et.al.* (2008) Tuning *Escherichia coli* for membrane protein overexpression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America (PNAS)* **38**, 14371-14376

Wagner S., Baars L., Ytterberg J., Klussmeier A., Wagner C., Nord O. *et. al.* (2007) Consequences of Membrane Protein Overexpression in *Escherichia coli*. *Molecular and Cellular Proteomics* **6.9**, 1527-1550.

Wagner S., Lerch M., Drew D., Willem J. (2006) Rationalizing membrane protein overexpression. *TRENDS in Biotechnology* **24**, 364-371

Wang D., Safferling M., Lemieux M, Griffith H. , Chen Y, Dan Li X. (2003) Practical aspects of overexpressing bacterial secondary membrane transporters for structural studies. *Biochimica et Biophysica Acta* **1610** 23-36

Ward S ., Abomoelak B., Hoyer E., Steinberg H., Talaat M. (2010) CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology* **77**, 1096 -1110.

WHO, World Health Organization (2012). WHO Report 2012: Global Tuberculosis Report. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Consultado: 12/11/2012

Yatime L., Buch- Pedersen M., Musgaard M., Preben J., Lund A., Pedersen B. *et.al.* (2009) P-type ATPases as drug targets: Tools for Medicine and Science. *Biochimica et Biophysyca Acta* **1787**, 207-220

Zuck P., O'Donnell G., Cassaday J., Chase P., Hodder P., Strulovici B., Ferrer M. (2005) Miniaturization of absorbance assays using the fluorescent properties of white microplates *Analytical Biochemistry* **342**, 254–259