



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Clonación y determinación de la  
especificidad iónica de CtpA, una  
ATPasa tipo P encargada de  
transportar metales pesados a través  
de la membrana plasmática de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Andrés Felipe León Torres**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Departamento de Química  
Grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias  
Bogotá, Colombia

2013



# **Clonación y determinación de la especificidad iónica de CtpA, una ATPasa tipo P encargada de transportar metales pesados a través de la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis***

**Andrés Felipe León Torres**

Químico, Universidad Nacional de Colombia

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Master en Ciencias - Bioquímica**

Director:

. Carlos Yesid Soto Ospina, Ph.D., M. Sc, Químico

Profesor Asociado, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Interacción Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Bogotá, Colombia

2013



*Dedico este trabajo a mis Padres por su esfuerzo y dedicación para hacer posibles todos los objetivos en mi vida.*



## Agradecimientos

A **Dios**, por la vida.

A **mis padres**, Mariela Torres Novoa y Mario Humberto León Herrera, por ser guías incondicionales en mi vida. Gracias por su amor, comprensión, alegría en los momentos más necesitados.

A **mi hermano**, Carlos Mario León Torres, por ser parte de esencial en cada paso de mi vida. Gracias por su amistad, complicidad, paciencia y comprensión.

A **toda mi familia**, que son base fundamental y apoyo en mi vida. Por entender mi ausencia durante este proceso.

A la **Universidad Nacional de Colombia** por la mejor formación académica y personal. Convirtiéndose en el motor de muchos logros. A demás de la financiación de los estudios de Maestría como asistente docente.

A la **DIB** - Dirección de Investigación Sede Bogotá por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "Estudio bioinformático y bioquímico de ATPasas tipo P en el genoma de Mycobacterium tuberculosis H37Rv: posibles blancos para el diseño de nuevos antituberculosos" (Código 12351), avalado en la convocatoria "Proyectos de Investigación, Desarrollo, Innovación y Creación Artística de la DIB" en la modalidad 3 de su primer corte.

A **COLCIENCIAS** por la financiación de los estudios de Maestría a través del programa Jóvenes Investigadores e Innovadores Virginia Gutiérrez de Pineda del 2011.

Al **Departamento de Química** de la Universidad Nacional de Colombia por la formación como científico. Y por el acompañamiento como estudiante de sus programas.

Al profesor **Carlos Yesid Soto Ospina** por sus enseñanzas y confianza durante el desarrollo de la investigación. Además gracias a él se han abierto puertas y presentado oportunidades para mí durante su dirección. Muchas gracias.

Al doctor **José Antonio Aínsa Claver** por su gran contribución hecha a la presente investigación con el entrenamiento en la obtención de mutantes de micobacterias. Al **Laboratorio de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza – España**

por facilitar el espacio, las herramientas y el entrenamiento necesario para implementar la técnica de Recombinería de micobacterias en el laboratorio de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias de la Universidad Nacional de Colombia. En especial, gracias a Jesús Gonzalo-Asensio por su gran apoyo.

A la profesora **Luz Mary Salazar Pulido** por su disposición a ayudar de la mejor manera posible. A la profesora **Elizabeth López**, por ser la influencia en la elección de este camino, gracias a la entrega en su enseñanza de la Bioquímica. Al profesor **Luis Ramón Osses** (Q. E. P. D.), por sus ideas que hacen parte vital de la presente investigación y por la visión a futuro de sus investigaciones. A la profesora **Cecilia Anzola Velasco**, por su confianza y paciencia durante mi paso como asistente docente en el laboratorio de Bioquímica.

Al profesor **Pedro de Brito** y al **Laboratorio de Microbiología Ambiental** de la Universidad Nacional de Colombia por la permanente colaboración. Al grupo de Investigación: Interacción **Hospedero-Patógeno** por la colaboración brindada en especial al profesor Harold Ardila.

Al **Grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias** por el entrenamiento y formación, además de todos los momentos compartidos con sus integrantes que hicieron que la estancia en el grupo fuera la mejor.

A mis **amigos** Milena, Lorena, Carlos, Sebastián, Cristian, Estefanía, Yair, Jesica, Kateryne, Lucho, Sandra, Edilene, Fer, Fercho, Andrés, Nino, Felipe, Daniel, Miguel, Lucas...por estar ahí a pesar de mi ingratitud.

Finalmente, a todas las personas que de una u otra manera contribuyeron al desarrollo de este trabajo.



## Resumen

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa que representa uno de los mayores retos de salud pública en el mundo. Actualmente, su tratamiento no es efectivo debido al surgimiento de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (agente etiológico de la enfermedad) resistentes a los fármacos antituberculosos convencionalmente utilizados. Tradicionalmente las enzimas de la membrana plasmática se han asociado con los fenómenos de resistencia en bacterias debido que algunas de ellas se encargan del eflujo de sustancias tóxicas. Entre ellas, las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> han sido de gran interés debido a que están involucradas en el transporte de metales pesados que afectan el crecimiento celular. En el caso de algunas bacterias patógenas, algunas ATPasas tipo P<sub>1B</sub> se han considerado como posible factores de virulencia debido a su papel en la adaptación que del patógeno en el ambiente intracelular.

En comparación con otros sistemas bacterianos el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (cepa de referencia) contiene un gran número de ATPasas tipo P<sub>1B</sub>. Mediante herramientas bioinformáticas ha sido posible realizar una aproximación para conocer los sustratos transportados por estas enzimas, logrando de esta forma identificar la relación de las proteínas CtpA, CtpB y CtpV con el transporte de Cu<sup>+</sup>; el de CtpC y CtpG con el transporte Zn<sup>2+</sup>; y el de CtpD y CtpJ con el transporte de Co<sup>2+</sup>.

Estudios anteriores han reportado que *ctpA* hace parte del grupo de genes que *M. tuberculosis* sobreexpresa durante la infección *in vivo*. Específicamente se evidenció el aumento de la expresión del gen *ctpA* en cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes y extremadamente resistentes productoras de TB pulmonar o extrapulmonar, sugiriendo que CtpA es una enzima importante para el progreso de la infección tuberculosa.

El objetivo del presente proyecto ha sido conocer la especificidad iónica de CtpA, encaminado a conocer su posible papel en la dinámica de infección tuberculosa. Los resultados obtenidos han mostrado que la sobreexpresión heteróloga de CtpA de

*M. tuberculosis* le induce a *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 tolerancia a niveles tóxicos de Cu<sup>2+</sup> (4 mM). Se postula que posiblemente el Cu<sup>2+</sup> que ingresa a la micobacteria es reducido a Cu<sup>+</sup> debido al carácter fuertemente reductor del interior celular; además que una vez reducido el Cu sufre un eflujo al exterior de la micobacteria. Por otro lado, ensayos de actividad ATPasa mostraron que la presencia de Cu<sup>+</sup> (4,9 U/mg de proteína) y Ni<sup>2+</sup> (2,1 U/mg de proteína) estimula la actividad ATPasa en vesículas de membrana plasmática de *M. smegmatis* enriquecidas con CtpA. Finalmente, se determinaron los parámetros cinéticos de la actividad de CtpA sobreexpresada en vesículas de membrana, encontrando que la enzima presenta condiciones óptimas de reacción enzimática a 37 °C y un pH de 7,9. Se encontró que las constantes cinéticas aparentes de CtpA son K<sub>1/2</sub> de 4,68 x 10<sup>-2</sup> μM de Cu<sup>+</sup>, V<sub>max</sub> 10,3 U/mg de proteína y h de 1,91.

El conjunto de resultados obtenidos sugieren que CtpA es una Cu<sup>+</sup> ATPasa tipo P que tiene como función desintoxicar a la célula cuando se enfrenta a niveles letales de Cu<sup>+</sup>. Adicionalmente, se construyó un sustrato de intercambio alélico y la cepa de recombinería para obtener una cepa mutante defectiva en el gen *ctpA* de *M. tuberculosis* H37Ra, mediante la técnica de recombinería, que en un futuro cercano permitirá contrastar los resultados obtenidos en el presente trabajo, y ampliar acerca del transporte de Cu<sup>+</sup> mediado por ATPasas tipo P en *M. tuberculosis* H37Rv.

**Palabras clave:** *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas tipo P<sub>1B</sub>, bioinformática, transporte iónico, metales pesados, clonación, Recombinería.

## Abstract

Tuberculosis is an infectious disease that represents a major public health challenges in the world. Currently, treatment is not effective due to the emergence of strains of *Mycobacterium tuberculosis* (etiologic agent of the disease) resistant to anti-tuberculosis drugs conventionally used. Traditionally, plasma membrane enzymes have been associated with the incidence of resistance in bacteria because some of them are responsible for the efflux of toxic substances. Among them, the P<sub>1B</sub>-type ATPases have been of great interest because they are involved in the transport of heavy metals that affect cell growth. In the case of some pathogenic bacteria, some P<sub>1B</sub>-type ATPases are considered as virulence factors due to its role in the adaptation of the pathogen in the intracellular environment.

Compared to other bacterial systems the genome of *M. tuberculosis* H37Rv (reference strain) contains a large number of P<sub>1B</sub>-type ATPases. With bioinformatic tools has been possible to make an approach for substrates delivered by these enzymes, thereby achieving identify the relationship of proteins CtpA, CtpB and CtpV with Cu<sup>+</sup> transport, the CtpC and CtpG with Zn<sup>2+</sup> transport, and the CtpD and CtpJ with Co<sup>2+</sup> transport.

Previous studies have reported that CtpA is part of a group of genes that are overexpressed during *M. tuberculosis* infection *in vivo*. Specifically showed an expression increase of the *ctpA* gene in pulmonar TB and extrapulmonar TB infected with multi-drug-resistance-tuberculosis and extensively-drug-resistance-tuberculosis strains, suggesting that CtpA is an important enzyme for tuberculosis infection.

The aim of this project was to determine the ionic specificity of CtpA, pointed at knowing their possible role in the dynamics of tuberculosis infection. The results have shown that *M. tuberculosis* CtpA heterologous overexpression induces toxic levels of Cu<sup>2+</sup> (4 mM) tolerance to *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. It is postulated, when the Cu<sup>2+</sup> enters to the mycobacteria is reduced to Cu<sup>+</sup> due to a strongly reducing environment in the cell cytosol,

and then undergoes the Cu efflux outside of the mycobacteria. On the other hand, ATPase activity tests showed that the presence of Cu<sup>+</sup> (4.9 U/mg protein) and Ni<sup>2+</sup> (2.1 U/mg protein) stimulates ATPase activity in plasma membrane vesicles of *M. smegmatis* enriched with CtpA. Finally, CtpA kinetic parameters were determined, finding that the enzyme has optimum enzymatic reaction at 37 °C and a pH of 7.9. It was found that the CtpA apparent kinetic constants are  $K_{1/2}$   $4.68 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$  of Cu<sup>+</sup>,  $V_{\text{max}}$  of 10.3 U/mg protein, and  $h$  of 1.91.

The results obtained suggest that CtpA is a Cu<sup>+</sup> P-type ATPase whose function is to detoxify the cell when it faced with lethal levels of Cu<sup>+</sup>. Additionally, an allelic exchange substrate and a *M. tuberculosis* H37Ra recombineering strain were constructed to obtain a mutant strain defective in the *ctpA* gene using the recombineering technique, which in the near future will compare the results obtained in this work, and expand on Cu<sup>+</sup> transport mediated by P-type ATPases in *M. tuberculosis* H37Rv.

**Keywords:** *Mycobacterium tuberculosis*, P<sub>1B</sub> type ATPases, bioinformatic, ionic transport, heavy metals, clonation, Recombineering.

# Contenido

|   | Pág.        |
|---|-------------|
| <b>Resumen</b> .....  | <b>IX</b>   |
| <b>Lista de figuras</b> .....   | <b>XVII</b> |
| <b>Lista de tablas</b> .....  | <b>XIX</b>  |
| <b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....   | <b>XXI</b>  |
| <b>Introducción</b> .....   | <b>23</b>   |
| <b>Justificación</b> .....  | <b>26</b>   |
| <b>1. Marco teórico</b> .....   | <b>27</b>   |
| 1.1 Infección tuberculosa .....   | 27          |
| 1.2 El género <i>Mycobacterium</i> .....  | 28          |
| 1.3 El bacilo tuberculoso.....  | 31          |
| 1.4 Fagosoma de <i>M. tuberculosis</i> .....  | 31          |
| 1.5 Papel de los metales pesados en la infección tuberculosa .....                              | 32          |
| 1.6 Envoltura celular de las micobacterias .....  | 33          |
| 1.6.1 Membrana plasmática .....   | 33          |
| 1.6.2 Pared celular .....   | 35          |
| 1.7 Transporte a través de la membrana externa de las micobacterias .....                       | 36          |
| 1.8 Transporte a través de la membrana interna de las micobacterias .....                       | 37          |
| 1.9 ATPasas .....   | 39          |
| 1.9.1 ATPasas tipo P .....  | 40          |
| 1.9.1.1 ATPasas tipo P <sub>1B</sub> encargadas de transportar metales pesados.....             | 45          |
| 1.9.1.2 Mecanismo catalítico.....   | 46          |
| 1.9.1.3 Las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> como posibles factores de virulencia .....             | 49          |
| 1.10 Recombinería en micobacterias.....   | 51          |
| <b>2. Hipótesis experimental</b> .....  | <b>53</b>   |
| <b>3. Objetivos</b> .....   | <b>55</b>   |
| 3.1 Objetivo general .....  | 55          |
| 3.2 Objetivos específicos.....  | 55          |
| <b>4. Materiales y métodos</b> .....  | <b>57</b>   |
| 4.1 Análisis bioinformático.....  | 57          |
| 4.1.1 Comparación topológica de la ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> ..... | 57          |
| 4.1.2 Búsqueda de motivos funcionales que diferencian a las ATPasa tipo P <sub>1B</sub>         | 57          |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.1.3     | Análisis <i>in silico</i> de CtpA de <i>M. tuberculosis</i> .....  | 58        |
| 4.1.4     | Diseño de cebadores .....  | 59        |
| 4.2       | Componente de biología molecular .....   | 62        |
| 4.2.1     | Cepas bacterianas y condiciones de cultivo .....   | 62        |
| 4.2.2     | Construcción de recombinantes de sobreexpresión de CtpA .....  | 63        |
| 4.2.2.1   | Clonación del gen <i>ctpA</i> en el vector tipo T pGEM-T easy (construcción de pALT1).....   | 63        |
| 4.2.2.2   | Clonación del gen <i>ctpA</i> en el vector de expresión de micobacterias pMV261 (construcción de pALT4).....                       | 65        |
| 4.2.2.3   | Clonación del gen <i>ctpA</i> en el vector de expresión de <i>E. coli</i> pET302 (construcción de pALT7).....                      | 69        |
| 4.2.3     | Construcción del sustrato de intercambio alélico (AES) de <i>ctpA</i> .....  | 70        |
| 4.2.3.1   | Clonación de la sección corriente abajo del gen <i>ctpA</i> en el plásmido pYUB854 (construcción de pALT5).....                    | 71        |
| 4.2.3.2   | Clonación de la sección corriente arriba del gen <i>ctpA</i> en el plásmido pALT5 (construcción de pALT6) y obtención del AES..... | 71        |
| 4.2.3.3   | Clonación de la sección corriente abajo del gen <i>ctpA</i> en el plásmido pDH5-Hyg <sup>R</sup> (construcción de pALT3).....      | 72        |
| 4.2.4     | Obtención de la cepa de Recombinería de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....  | 72        |
| 4.3       | Componente bioquímico .....  | 74        |
| 4.3.1     | Ensayos de toxicidad frente a metales pesados.....   | 74        |
| 4.3.2     | Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados.....   | 74        |
| 4.3.3     | Determinación de condiciones de actividad optimas de las membranas enriquecidas con CtpA.....                                      | 75        |
| <b>5.</b> | <b>Resultados y discusión .....</b>  | <b>77</b> |
| 5.1       | Comparación topológica de las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> .....   | 77        |
| 5.2       | Motivos característicos de las ATPasa tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> .....   | 79        |
| 5.3       | Elección de la ATPasa tipo P <sub>1B</sub> a estudiar.....   | 82        |
| 5.4       | Análisis <i>in silico</i> de CtpA.....   | 83        |
| 5.5       | Estructura terciaria de CtpA.....  | 85        |
| 5.6       | Recombinante de sobreexpresión de la proteína CtpA .....   | 88        |
| 5.6.1     | Clonación de <i>ctpA</i> en el vector pGEM-T easy (Construcción de pALT1).....   | 88        |
| 5.6.2     | Construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA en <i>E. coli</i> .....  | 90        |
| 5.6.3     | Construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA en micobacterias (pALT4).....  | 93        |
| 5.6.4     | Transformación de micobacterias con el plásmido pALT4.....   | 96        |
| 5.6.5     | Sobreexpresión de la proteína CtpA en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....   | 97        |
| 5.7       | Ensayos de toxicidad frente a metales pesados de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 sobreexpresando CtpA .....                | 98        |
| 5.8       | Ensayos de Actividad ATPasa dependiente de metales pesados .....   | 101       |
| 5.9       | Determinación de parámetros cinéticos de las vesículas de membrana enriquecidas con CtpA.....                                      | 104       |
| 5.9.1     | Efecto de la concentración de proteína de membrana .....   | 104       |
| 5.9.2     | Efecto del pH .....  | 105       |
| 5.9.3     | Efecto de la temperatura .....   | 105       |
| 5.9.4     | Efecto de la concentración de sustrato y determinación de constantes cinéticas.....  | 106       |
| 5.10      | Precursores para la obtención del mutante de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra $\Delta$ <i>ctpA</i> .....                               | 110       |
| 5.10.1    | Construcción del AES de <i>ctpA</i> .....  | 111       |
| 5.10.1.1  | Estrategia 1: PCR solapante usando el sistema pDH5-Hyg <sup>R</sup> .....  | 111       |

---

|   |            |
|---|------------|
| 5.10.1.2 Estrategia 2: Doble clonación en el vector pYUB854 .....                             | 113        |
| 5.10.2 Obtención de la cepa de recombinería de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....              | 116        |
| <b>6. Conclusiones y perspectivas .....</b>   | <b>119</b> |
| 6.1 Conclusiones .....  | 119        |
| 6.2 Perspectivas.....   | 120        |
| <b>A. Anexo A: Información de marcadores de peso molecular, vectores y recombinantes.....</b> | <b>121</b> |
| <b>B. Anexo: Protocolos .....</b>   | <b>127</b> |
| <b>Bibliografía .....</b>   | <b>139</b> |





## Lista de figuras

|   | <b>Pág.</b> |
|---|-------------|
| <b>Figura 1-1:</b> Incidencia estimada de casos de TB registrados a nivel mundial y en Colombia.....  | 29          |
| <b>Figura 1-2:</b> Esquema de la envoltura celular de las micobacterias.....  | 34          |
| <b>Figura 1-3:</b> Esquema de los tipos de transporte encontrados en la membrana plasmática de las células.....   | 37          |
| <b>Figura 1-4:</b> Esquema descriptivo de la función de las enzimas ATPasas.....  | 39          |
| <b>Figura 1-5:</b> Resumen esquemático de algunas enfermedades asociadas con enzimas ATPasas  | 41          |
| <b>Figura 1-6:</b> Esquema de la organización estructural de las ATPasas tipo P.....  | 44          |
| <b>Figura 1-7:</b> Modelo del mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P propuesto por Post-Albers..  | 47          |
| <b>Figura 1-8:</b> Mecanismo del proceso de fosforilación y defosforilación de las ATPasas tipo P.....  | 47          |
| <b>Figura 1-9:</b> Ciclo catalítico de las Cu <sup>+</sup> ATPasas tipo P que transportan dos cationes por cada ciclo.....  | 48          |
| <b>Figura 1-10:</b> Papel de Cu <sup>2+</sup> y Zn <sup>2+</sup> en la actividad bactericida de macrófagos y modelo del mecanismo de resistencia utilizado por <i>M. tuberculosis</i> ..... | 49          |
| <b>Figura 1-11:</b> Modelo de respuesta Cu <sup>+</sup> de <i>M. tuberculosis</i> mediado por CsoR.....   | 50          |
| <b>Figura 4-1:</b> Esquema general de la técnica de recombinería usada para la construcción de la cepa mutante <i>M. tuberculosis</i> H37Ra $\Delta$ ctpA.....                              | 73          |
| <b>Figura 4-2:</b> Fundamento de la determinación de la actividad ATPasa mediante la cuantificación del Pi liberado durante el ciclo catalítico de una Cu <sup>+</sup> ATPasa tipo P.....   | 75          |
| <b>Figura 5-1:</b> Perfiles de hidrofobicidad de las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv y secuencias consenso de bombas caracterizadas bioquímicamente.....       | 78          |
| <b>Figura 5-2:</b> Alineamiento de las secuencias consenso de las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> caracterizadas con las bombas de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.....                           | 81          |
| <b>Figura 5-3:</b> Esquema de la topología, motivos funcionales y dominios de la proteína CtpA.....   | 84          |
| <b>Figura 5-4:</b> Modelos de la estructura terciaria de la proteína CtpA.....  | 86          |
| <b>Figura 5-5:</b> Amplificación por PCR del gen <i>ctpA</i> .....  | 89          |
| <b>Figura 5-6:</b> Clonación del gen <i>ctpA</i> en pGEM-T easy y confirmación del plásmido pALT1.....  | 90          |
| <b>Figura 5-7:</b> Confirmación del plásmido pALT2.....   | 91          |
| <b>Figura 5-8:</b> Identificación del plásmido pALT7.....   | 93          |

|   |     |
|---|-----|
| <b>Figura 5-9:</b> Esquema de la estrategia final para clonación de <i>ctpA</i> en el vector lanzadera pMV261.....  | 94  |
| <b>Figura 5-10:</b> Identificación y análisis del plásmido pALT4.....   | 95  |
| <b>Figura 5-11:</b> Transformación del plásmido pALT4 en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....   | 97  |
| <b>Figura 5-12:</b> Sobreexpresión de la proteína recombinante CtpA en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 inducido por calentamiento.....  | 99  |
| <b>Figura 5-13:</b> Ensayos de toxicidad frente a diferentes metales pesados de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 sobreexpresando CtpA. ....                                      | 100 |
| <b>Figura 5-14:</b> Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados.. ....  | 102 |
| <b>Figura 5-15:</b> Condiciones óptimas de la actividad Cu <sup>+</sup> ATPasa a partir de vesículas de membrana de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 enriquecidas con CtpA. .... | 105 |
| <b>Figura 5-16:</b> Efecto de la concentración de Cu <sup>+</sup> en la velocidad de reacción enzimática .....  | 108 |
| <b>Figura 5-17:</b> Determinación de constantes cinéticas de CtpA.....  | 109 |
| <b>Figura 5-18:</b> Útiles génicos usados para la obtención del AES mediante PCR solapante .....  | 112 |
| <b>Figura 5-19:</b> Construcción de pALT5, recombinante pYUB854:sección B.....  | 115 |
| <b>Figura 5-20:</b> Construcción de pALT6, recombinante pALT5:sección A.....  | 116 |
| <b>Figura 5-21:</b> Construcción de cepa de recombinería de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra.....   | 117 |
| <b>Figura A-1:</b> Marcadores de peso molecular empleado a lo largo del presente trabajo.....   | 121 |
| <b>Figura A-2:</b> Vectores empleados a lo largo de la investigación.....   | 122 |
| <b>Figura A-3:</b> Mapeos de restricción de los plásmidos recombinantes construidos en el presente trabajo. ....  | 123 |
| <b>Figura A-4:</b> Alineamiento del resultado de secuenciación de pALT4 y la secuencia esperada..   | 124 |

## Lista de tablas

|  | <b>Pág.</b> |
|--|-------------|
| <b>Tabla 1-1:</b> Distribución, especificidad y función de las subfamilias de las ATPasas tipo P.....  | 43          |
| <b>Tabla 4-1:</b> Listado de las herramientas utilizadas para la predicción de TMS y topología de las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> .....   | 59          |
| <b>Tabla 4-2:</b> Cebadores utilizados en el estudio. ....   | 60          |
| <b>Tabla 4-3:</b> Cepas bacterianas utilizadas a lo largo de este estudio. ....  | 63          |
| <b>Tabla 4-4:</b> Plásmidos usados en el estudio.....  | 66          |
| <b>Tabla 4-5:</b> Condiciones de las PCR realizadas en el presente estudio .....   | 64          |
| <b>Tabla 5-1:</b> Motivos transmembranales asociados con los diferentes subgrupos de las ATPasas tipo P <sub>1B</sub> y posible clasificación de estas enzimas presentes en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. .... | 82          |



## Lista de símbolos y abreviaturas

| Abreviatura      | Término  |
|------------------|--|
| ADC              | Albumina de suero bovino, dextrosa y catalasa                |
| ADP *            | Adenosina 5'-difosfato                                       |
| AES *            | Sustrato de intercambio alélico                              |
| AG               | Arabinogalactano   |
| AM               | Ácidos micólicos   |
| Amp              | Ampicilina   |
| ATP *            | Adenosina 5'-trifosfato                                      |
| BAAR             | Bacilo ácido alcohol resistente                              |
| BCG              | Bacilo de Calmette Guérin                                    |
| BSA *            | Albúmina sérica bovina                                       |
| bp *             | Pares de bases   |
| CMI              | Concentración mínima inhibitoria                             |
| Da               | Dalton   |
| DNA *            | Ácido Desoxirribonucleico                                    |
| dsDNA *          | DNA de cadena doble  |
| dNTP *           | Desoxirribonucleótido (base A, C, T ó G)                     |
| G                | Gravedades   |
| H                | Coefficiente de Hill   |
| h                | Hora   |
| H37Ra            | Cepa de referencia no virulenta <i>M. tuberculosis</i> H37Ra |
| H37Rv            | Cepa de referencia virulenta <i>M. tuberculosis</i> H37Rv    |
| Hyg              | Higromicina  |
| INS              | Instituto Nacional de Salud                                  |
| IPTG             | Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido                   |
| K <sub>1/2</sub> | Constrante cinética aparente                                 |
| kDa              | Kilodalton   |
| Km               | Kanamicina   |
| LAM              | Lipoarabinomanano  |
| LB               | Medio Luria-Bertani  |
| LM               | Lipomanano   |
| mAGP             | Complejo micolil-arabinogalactano-peptidoglicano             |
| MBD *            | Dominio de unión al metal citoplasmático                     |
| MCS *            | Sitio múltiple de clonación                                  |
| MDR-TB *         | Tuberculosis multidrogorresistente                           |
| min              | Minuto   |

| Abreviatura      | Término  |
|------------------|--|
| MP               | Marcador de peso molecular                                       |
| MTBC             | complejo tuberculoso ó <i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex |
| Nt               | Nucleótidos  |
| OD               | Densidad óptica  |
| OMS              | Organización Mundial de la Salud                                 |
| PBS *            | Buffer fosfato salino  |
| PCR *            | Reacción en cadena de la polimerasa                              |
| PDB *            | Protein Data Bank  |
| PDIM             | Ftioceroil dimicoserato  |
| PG               | Peptidoglicano   |
| PGL              | Glicolípido fenólico   |
| Pi               | Fosforo inorgánico o fosfato                                     |
| PI               | Punto isoeléctrico   |
| PIM              | Fosfatidil inositol manosido                                     |
| RNA *            | Ácido Ribonucleico   |
| ROS *            | Especies reactivas de oxígeno                                    |
| Rpm              | Revoluciones por minuto  |
| s                | Segundo  |
| SDS *            | Dodecil sulfato de sodio   |
| SDS-PAGE *       | Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS                  |
| SL               | Sulfolípido  |
| ssDNA *          | DNA de cadena sencilla   |
| TB               | Tuberculosis   |
| TBE              | Tris-Borato-EDTA   |
| TDM              | Dimicolato de trehalosa  |
| Tm *             | Temperatura de fusión  |
| TM               | Transmembrana  |
| TM-MBS *         | Sitio de unión al metal transmembranal                           |
| TMS *            | Segmento transmembranal  |
| U                | Unidad de actividad enzimática                                   |
| UFC              | Unidades formadoras de colonia                                   |
| V <sub>max</sub> | Velocidad máxima   |
| VIH              | Virus de inmuno-deficiencia humana                               |
| XDR-TB *         | Tuberculosis extremadamente multidrogorresistente                |
| X-Gal            | 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido                  |

\* Abreviatura original del inglés.

# Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria patógena que se ha convertido en uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo [1]. El aumento de la incidencia de TB viene de la mano con la aparición de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos de primera y/o segunda línea (TB multidrogorresistente MDR-TB y extremadamente multidrogorresistente XDR-TB), además la coinfección TB-VIH (virus de inmunodeficiencia humana), lo que dificulta su control [1]. Actualmente, existe la necesidad de diseñar nuevos compuestos antituberculosos, por lo que es prioritario conocer a profundidad los mecanismos moleculares que la micobacteria utiliza para tener éxito como patógeno.

El fenómeno de resistencia de las micobacterias se centra en la acción de sus bombas de eflujo y otras enzimas presentes en la membrana celular [2]. Entre ellas, las ATPasas se encargan de catalizar la translocación de metales pesados, o ATPasas tipo P<sub>1B</sub>. Estas enzimas se encargan de la homeostasis iónica, la desintoxicación celular y en algunos casos actúan como factores de virulencia [3]. En comparación con otras bacterias, en el genoma de *M. tuberculosis* se ha encontrado un número elevado de estas bombas, lo que sugiere que estos sistemas proteicos podrían ser importantes para la viabilidad del bacilo tuberculoso en condiciones de estrés.

Durante el proceso de infección, la micobacteria se enfrenta a una elevada concentración de algunos metales pesados en el interior del fagosoma [4]. Se ha observado que en el interior del fagosoma de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* existe un aumento en la concentración de Cu<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> entre 1 y 24 h después de la infección con el bacilo tuberculoso [5], mientras que no se observaron cambios significativos en la concentración intrafagosomal de Mn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> [5]. El macrófago aumenta la cantidad de Cu<sup>2+</sup> como respuesta al control de algunos patógenos intracelulares afectando de esta forma la viabilidad del microorganismo invasor, utilizando mecanismos de defensa como la creación de especies reactivas de oxígeno (ROS) vía estrés oxidativo, desnaturalización

de proteínas (por la interacción entre el  $\text{Cu}^+$  y los grupos tiol), inactivación de enzimas por la sustitución de otros biometales, y desestabilización de membrana [6]. *M. tuberculosis* soporta bajas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (<25  $\mu\text{M}$ ) en comparación con otras bacterias. Se ha determinado que los niveles intrafagosomales de células infectadas con *M. tuberculosis* varía entre 25 y 500  $\mu\text{M}$ , siendo este último valor tóxico para el bacilo [7].

Los metales de transición divalentes, a pesar de ser tóxicos en altas concentraciones, son parte estructural y catalítica de algunas enzimas como los citocromos de la cadena respiratoria y las enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo [6]. Por lo tanto, las metaloproteínas son parte fundamental en la virulencia de *M. tuberculosis*, debido a su contribución en la capacidad de soportar la explosión oxidativa dentro del macrófago [6]. Se ha encontrado que el bacilo tuberculoso posee dos superóxido dismutasas, SodA y SodC que utilizan  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  como cofactor [8, 9]. Otras enzimas que están involucradas con la respuesta al estrés oxidativo incluyen la catalasa-peroxidasa, KatG, una alquilo hidroperóxido reductasa, AhpC, y las proteínas tiorredoxina TrxA y TrxB, todas ellas utilizan  $\text{Fe}^{2+}$  como cofactor [8]. Por lo tanto, la homeostasis iónica de estos metales se hace fundamental para la viabilidad del bacilo tuberculoso.

La función básica de las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  es regular el contenido intracelular de metales de transición, como  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , para asegurar la supervivencia de la micobacteria dentro del macrófago. El uso de herramientas bioinformáticas permiten hacer una predicción de los posibles sustratos que pueden transportar estas bombas, lo que ha permitido diferenciar las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  en cinco subgrupos que transportan principalmente los iones  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ , y  $\text{Zn}^{2+}$  [3]. Sin embargo, los resultados de estos análisis *in silico* deben ser contrastados con experimentos bioquímicos, específicamente mediante ensayos de actividad ATPasa dependiente de metales pesados. Otra aproximación posible es conocer el sustrato transportado utilizando ensayos de toxicidad frente a metales pesados, que se fundamenta en la comparación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) entre células control y sobreexpresando la ATPasa tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  [10].

En general, el gran número de ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  en el genoma de *M. tuberculosis* sugiere que estas bombas son esenciales para contrarrestar el aumento del nivel de los metales



pesados que se acumulan los macrófagos luego de la infección con el bacilo tuberculoso. Una evidencia de ello es *ctpA* que hace parte del grupo de genes que *M. tuberculosis* sobreexpresa *in vivo* durante la infección de células humanas [11].

## Justificación

La alta incidencia de infección producida por *M. tuberculosis*, el agente etiológico de la TB, le convierte en la principal causa de enfermedad y muerte producida por un agente bacteriano en el mundo [1]. Su control se ha dificultado por el surgimiento de MDR-TB y XDR-TB, y especialmente la persistente coinfección TB-VIH [12]. Cerca de dos mil millones de personas se encuentran infectadas en forma latente con *M. tuberculosis*, de esta población solo el 10% desarrollará la enfermedad en algún momento de la vida, el resto de la población permanecerá asintomático (90%), convirtiéndose en un reservorio permanente de infección, que facilita el contagio entre individuos [13].

Las cifras anteriores indican la magnitud del problema y muestran la necesidad de desarrollar nuevas herramientas para combatir efectivamente la TB. El tratamiento utilizado actualmente es prolongado que incluye varios fármacos y produce efectos secundarios, lo que induce al abandono del tratamiento lo que potencialmente induce que la bacteria desarrolle mutaciones y resistencia a los fármacos suministrados convirtiéndose en la principal causa de aparición de cepas multirresistentes [12, 14, 15]. Por lo tanto, se hace necesario diseñar nuevos medicamentos dirigidos a dianas terapéuticas sensibles que no estén relacionadas con las ya existentes. Para cumplir este objetivo es necesario entender los mecanismos de la interacción hospedero-patógeno en los que los transportadores iónicos pueden jugar un papel esencial en la adaptación de las micobacterias a diferentes factores medioambientales, que constituye parte del éxito del bacilo tuberculoso durante la infección [16].

## 1. Marco teórico

Actualmente, la TB continúa siendo uno de las mayores preocupaciones de salud pública alrededor del mundo, tanto así que esta enfermedad se ubica después del VIH, como la segunda causa de muerte en el mundo causada por un agente infeccioso [1]. En el último reporte de la Organización Mundial de la Salud (OMS) en el 2011 se reportaron en el mundo cerca de 8,7 millones de nuevos casos y 1,4 millones de muertes por TB (donde el 30 % fueron pacientes VIH positivos). El 59 % de los casos se presentó en Asia, el 26 % en África, y una baja proporción en el este del mediterráneo (7,7 %), Europa (4,3 %) y América (3%) [1] (Figura 1a). En Colombia, el Instituto Nacional de Salud (INS) afirma en el reporte epidemiológico semanal número 18 del 2013 que las entidades territoriales de Amazonas, Chocó, Risaralda y Barranquilla son las de mayor incidencia de TB en Colombia (Figura 1b) y que la cantidad de casos notificados en el país es de 3962 [17].

El control de la infección tuberculosa se ha dificultado por el surgimiento de la MDR-TB y XDR-TB, la persistente coinfección TB-VIH [18], así como al aumento de la movilidad internacional desde países con alta prevalencia de la enfermedad [19]. Se estima que cerca de dos mil millones de personas se encuentran infectadas en forma latente con el bacilo tuberculoso [20], de ellas, solo un pequeño porcentaje desarrollará la enfermedad en algún momento de la vida, la población restante permanecerá asintomática convirtiéndose en un reservorio permanente de infección.

### 1.1 Infección tuberculosa

La TB es una enfermedad infecciosa que generalmente afecta a los pulmones y es causada por el patógeno *M. tuberculosis* [1]. Esta bacteria se propaga vía aerosoles

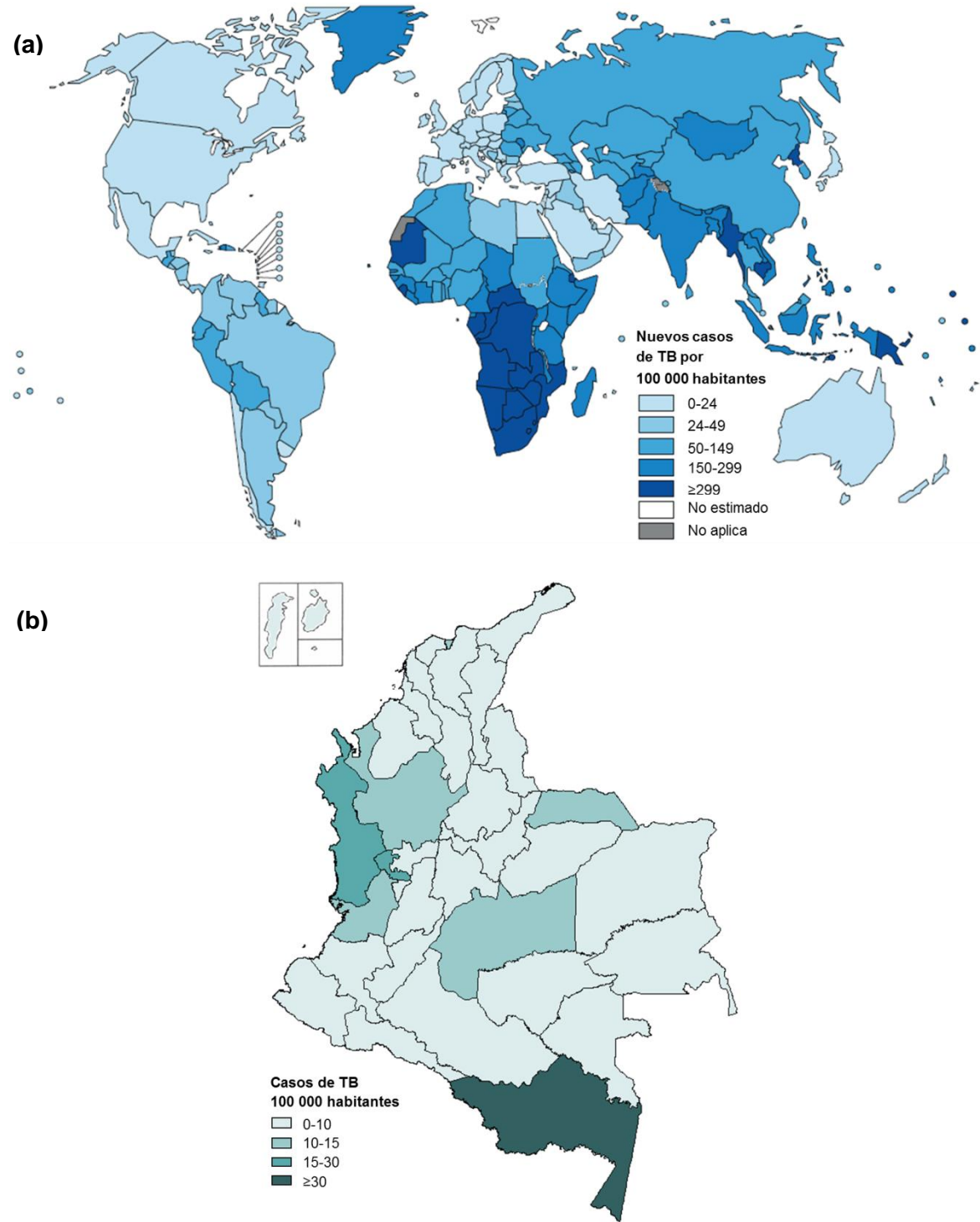
desde un individuo infectado a otro sano. Una vez inhalado, el bacilo se localiza en los alveolos pulmonares donde es fagocitado por los macrófagos alveolares. A diferencia de la mayoría de bacterias que mueren rápidamente después de la fagocitosis, las cepas virulentas de *M. tuberculosis* interfieren con la señalización de la célula huésped y previenen la maduración del fagosoma [21]. Sin embargo, durante la infección la micobacteria debe enfrentarse a diferentes condiciones de estrés como son los bajos niveles de nutrientes y oxígeno, y altos niveles de intermediarios de nitrógeno y oxígeno reactivo [7]. A pesar de todo el bacilo logra responder de manera efectiva a estas condiciones evadiendo el ataque del sistema inmune y causando infección.

La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, ya que el sistema inmune logra confinar a la micobacteria dentro de una estructura conocida como granuloma. Allí la micobacteria puede permanecer muchos años en estado de latencia sin presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad. Después de 2-4 semanas de infección, si la respuesta inmune es inadecuada el bacilo tuberculoso escapa de los macrófagos produciendo su diseminación por vía sanguínea. La diseminación de la enfermedad depende de diversos factores como la coinfección con el VIH, la malnutrición, la diabetes, la terapia con medicamentos inmunosupresores. Entre un 15 y 20% de los casos la TB puede involucrar otros órganos del cuerpo humano diferentes a los pulmones, ya que la bacteria puede diseminarse a través del sistema linfático o sanguíneo [15].

## 1.2 El género *Mycobacterium*

*Mycobacterium* proviene del prefijo griego *Myco* que significa hongo, este nombre fue dado a las bacterias pertenecientes a este género porque al ser cultivadas presentan una apariencia similar a estos organismos [22]. El género *Mycobacterium* es miembro de la familia *Mycobacteriaceae* que hace parte del orden *Actinomycetales* [23]. Actualmente pertenecen al género *Mycobacterium* 154 especies y 13 subespecies [23], de las que se destacan los patógenos *M. tuberculosis* y *M. leprae*, los agentes etiológicos de la TB y la lepra respectivamente [24]. Sin embargo, la mayoría de las micobacterias se encuentran presentes en el ambiente sin causar daños [22].

**Figura 1-1:** Incidencia estimada de casos de TB registrados a nivel mundial y en Colombia. **(a)** Situación mundial de nuevos casos de TB en el 2011 según el reporte de la OMS en el 2012 (Figura tomada de [1]). **(b)** Situación en Colombia reportada por el INS en el 2013 (Figura adaptada de los datos del INS 2013 [17]).



Las micobacterias son bacterias aerobias (algunas especies son capaces de crecer en bajas concentración de oxígeno) que no esporulan ni se encapsulan [25]. Morfológicamente se caracterizan por ser bacilos rectos o ligeramente curvos, con un grosor de 0,2 y 0,7 $\mu$ m y longitud de 1,0–10 $\mu$ m. En su pared celular tienen una alta concentración de lípidos, cerca del 60% de su peso, y por su alta hidrofobicidad hacen que la bacteria sea muy resistente a agentes químicos [26]. Se caracterizan por ser bacilos ácido-alcohol resistentes (BAAR) y presentar un alto contenido de G+C (entre 61 y 71%). De acuerdo al tiempo de crecimiento el género *Mycobacterium* se ha clasificado en dos grandes grupos según el tiempo necesario para formar colonias en medio sólido: micobacterias de crecimiento rápido (menor a 7 días) y micobacterias de crecimiento lento (mayor a 7 días) [24], lo que coincide con la separación filogenética entre las micobacterias. Las morfologías coloniales pueden variar desde bacterias lisas hasta rugosas entre las distintas especies [27]. De igual forma, la mayoría de las especies presentan más de una morfología colonial. Se ha encontrado que algunas especies poseen la capacidad de sintetizar pigmentos carotenoides que les otorgan coloraciones que varían entre amarillentas y rosáceas [27]. Por lo tanto, existe otra clasificación basada en la pigmentación de las colonias, en las que especies fotocromógenas son capaces de producir pigmentos en presencia de luz, como por ejemplo *M. marinum*; escotocromógenas, que no necesitan luz para generar la pigmentación, como *M. goodii*; y las no cromógenas que como su nombre lo indica, no se pigmentan, como es el caso de *M. tuberculosis* [27].

Una característica importante de las micobacterias es su resistencia a un amplio espectro de antimicrobianos [28]. Las micobacterias son sensibles a la estreptomycin, un aminoglicósido que actúa a nivel del ribosoma inhibiendo la síntesis de algunas proteínas bacterianas [28], y a la rifampicina que actúa a nivel de síntesis de ácidos nucleicos [29]. También son susceptibles a otros antimicrobianos que actúan en diferentes dianas celulares, tales como la isoniazida (síntesis de ácidos micólicos, AM), pirazinamida (actúa como profármaco e inhibe la síntesis de ácidos grasos), etambutol (síntesis de arabinogalactano, AG) y fluoroquinonas (inhibición de la ADN girasa). Algunos de estos antimicrobianos poseen una acción exclusiva sobre las micobacterias [30].

### 1.3 El bacilo tuberculoso

*M. tuberculosis* es una bacteria que pertenece al complejo tuberculoso (MTBC), que corresponde a las micobacterias que causan TB en humanos y animales [32]. Actualmente el MTBC está constituido por: *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti* y *M. canetti*. Entre los miembros del MTBC existe alta identidad genética (superior al 99,9%) lo que sugiere fuertemente que provienen de un mismo ancestro común; también se caracteriza por tener secuencias 16S rRNA idénticas, pero a pesar de ello generan patologías diferentes en hospederos distintos [31, 32].

El bacilo tuberculoso también se caracteriza por ser BAAR, poseer una pared celular con estructura única (muy hidrófoba) crucial para su supervivencia [19], encontrarse entre las micobacterias de crecimiento lento con un tiempo de generación de aproximadamente 24 h. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de entrar en periodos de latencia, lo que dificulta la acción de compuestos antimicrobianos. La resistencia del bacilo tuberculoso a los antimicrobianos viene dado por su compleja pared celular, la presencia de enzimas modificantes (beta-lactamasas) y por sus sistemas de eflujo [14]. Las micobacterias del MTBC presentan comportamientos diferentes en su replicación dependiendo de su localización. Las que se alojan en cavidades pulmonares (ambiente aerobio) se dividen de forma activa, las encontradas dentro de macrófagos (ambiente microaerófilico) inician la adaptación a latencia y las ubicadas en granulomas (ambiente anaerobio) se replican solo ocasionalmente [14].

### 1.4 Fagosoma de *M. tuberculosis*

*M. tuberculosis* se aloja en los macrófagos y asegura su supervivencia manteniéndose en el interior de un sistema endosomal temprano producto del retraso en la maduración del fagosoma [33], y permaneciendo en los compartimientos que no se fusionan con el lisosoma. El fagosoma micobacteriano se caracteriza por tener un pH ácido (aproximadamente de 6,5), debido al transporte de protones mediado por ATPasas vacuolares [4], y por la falta de marcadores endosomales y lisosomales tardíos, como Rab7 o LAMP1, que están involucrados en la formación del fagolisosoma [34, 35]. Las proteínas Rab son miembros de la superfamilia Ras-GTPasas de bajo peso molecular, que funcionan como interruptores moleculares para promover la fusión de vesículas; en

el caso de la infección con el bacilo tuberculoso no se da la fusión del fagosoma-lisosoma[36].

En el fagosoma de *M. tuberculosis* la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  aumenta entre 1 y 24 h después de la infección [5], lo que sugiere que estos metales son importantes en el control de la viabilidad del bacilo; por lo tanto, la micobacteria debe contar con mecanismos para responder efectivamente a los incrementos de la concentración de metales pesados dentro del fagosoma. El  $\text{Cu}^{2+}$  se considera como uno de los iones metálicos más utilizados por el macrófago para controlar algunos patógenos intracelulares [6]; en la infección el macrófago aumenta la concentración del  $\text{Cu}^{2+}$  hasta  $500 \mu\text{M}$ , siendo un valor tóxico para *M. tuberculosis* que aguanta un CMI  $<25 \mu\text{M}$  [7]. Otros metales de transición como  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  no presentan cambios significativos de concentración dentro del fagosoma luego de la infección con el bacilo tuberculoso [5].

## 1.5 Papel de los metales pesados en la infección tuberculosa

Los cationes divalentes de algunos metales de transición hacen parte estructural y catalítica de algunas enzimas, como los citocromos de la cadena respiratoria y las enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo. Estas metaloproteínas son parte fundamental en la fisiología de *M. tuberculosis* por su capacidad de responder frente a niveles altos de ROS en el interior del macrófago [6].

*M. tuberculosis* posee dos superóxido dismutasas, SodA y SodC que utilizan  $\text{Fe}^{2+}$  y la pareja  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$  como cofactores respectivamente [9]. La función catalítica de estas enzimas es convertir el  $\text{O}_2^-$  en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno [37]. Por analogía es probable que SodA esté involucrada en la lucha contra el estrés oxidativo de los derivados de la fosforilación oxidativa endógena [8]. SodC se ha localizado en un compartimento periplásmico [8], contiene un motivo de unión de lipoproteínas, lo que sugiere que puede ser anclada en la membrana para proteger al bacilo de ROS en la superficie bacteriana cuando se encuentra dentro de los macrófagos [37]. Otras enzimas que están involucradas con la respuesta al estrés oxidativo incluyen la catalasa-peroxidasa, KatG, una alquilo hidropéroxido reductasa, AhpC, y las proteínas tiorredoxina TrxA y TrxB, todas ellas que utilizan Fe como cofactor [8].



Las funciones fisiológicas de  $Mn^{2+}$  en *M. tuberculosis* están por elucidar. Comparado con el  $Fe^{2+}$  libre, el  $Mn^{2+}$  tiene una menor capacidad para dismutar el  $H_2O_2$  [8], por lo tanto en altas concentraciones puede suplir esta función sin correr el riesgo de generar ROS. Además por la geometría con los ligandos,  $Mn^{2+}$  puede sustituir el  $Mg^{2+}$  como un cofactor no estructural de muchas enzimas incluyendo la adenilil ciclase, Cya, y serina/treonina quinasa PknA (involucrada en la regulación morfológica durante la división celular) [8].

## 1.6 Envoltura celular de las micobacterias

La envoltura micobacteriana está compuesta por todo aquello que rodea al citoplasma de la bacteria [30]. La envoltura tiene como función proteger al microorganismo del ambiente en el que se encuentre, dar forma y proporcionar los mecanismos necesarios para el tráfico de sustancias entre el interior y exterior celular. La envoltura de las micobacterias está compuesta por la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula en algunas especies [38] (Figura 1-2). La pared es una estructura compleja conformada por el periplasma, peptidoglicano (PG) unido a AG Y AM [38, 39]. Esta envoltura tiene una baja permeabilidad lo que dificulta la toma de nutrientes y la internalización de drogas antibacterianas [40], es por ello que la complejidad de esta barrera dificulta el control de las micobacterias con medicamentos [24].

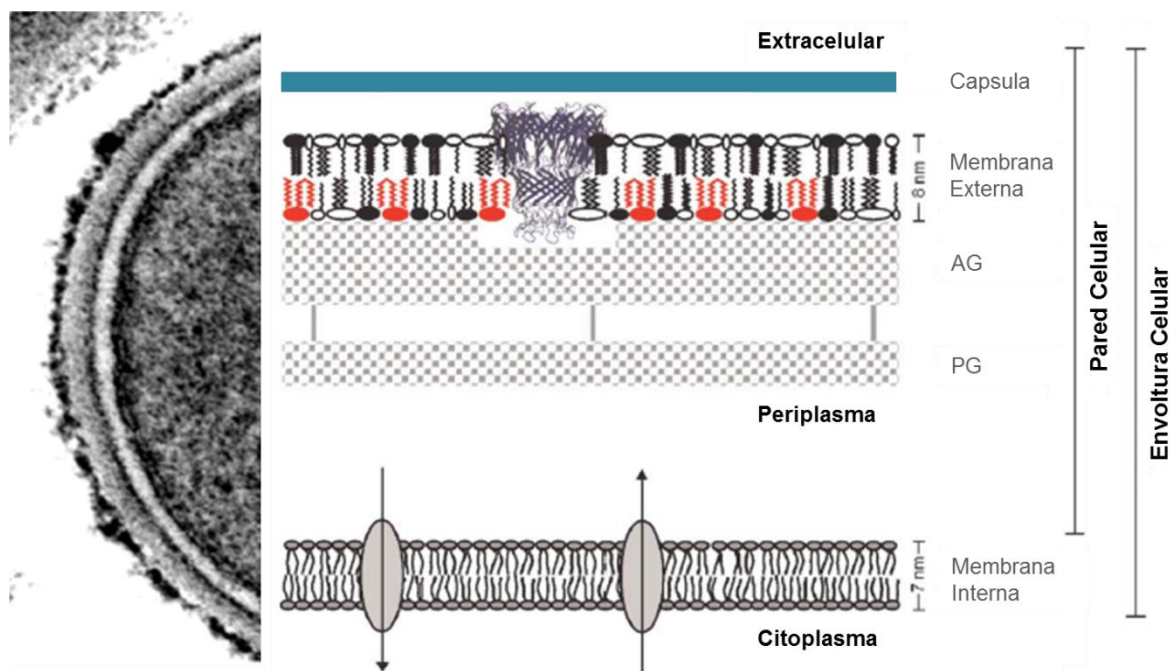
Las micobacterias son consideradas como Gram positivas [24] basado en el análisis taxonómico de su DNA; sin embargo, al observar la organización de su envoltura, las micobacterias se parecen más a las bacterias Gram negativas [30]. La naturaleza química de la envoltura dificulta la clasificación Gram de las micobacterias ya que su contenido de lípidos es aproximadamente el 40 % del peso seco de la célula, muy alto al compararlo con el de bacterias Gram positivas y Gram negativas (5 % y 10 % respectivamente) [30]. El alto contenido de lípidos explica la tendencia de las micobacteria a formar agregados en cultivo líquido y su característica de BAAR [30].

### 1.6.1 Membrana plasmática

La membrana plasmática de las micobacterias es similar a la de otras bacterias en apariencia, función metabólica y composición [30]. La bicapa lipídica está constituida por

lípidos polares que se encuentra asociada a proteínas y algunos lipopolisacáridos como el lipoarabinomano (LAM) y el lipomano (LM), siendo el LAM importante en la internalización de las micobacterias al macrófago a través del receptor de manosa [41]. Los lípidos de la membrana son principalmente polares, mezcla de fosfolípidos con cadenas de ácidos grasos de al menos 20 carbonos, entre los que se encuentran el ácido palmítico ( $C_{16:0}$ ), el ácido octadecanóico ( $C_{18:1}$ ) y el ácido 10-metiloctadecanóico, también conocido como ácido tuberculoesteárico ( $C_{19r}$ ) [30]. Los fosfolípidos que principalmente se encuentran en la membrana plasmática de las micobacterias son fosfatidilinositolmanósidos, fosfatidilgliceroles, cardiolipinas y fosfatidiletanolaminas [42, 43].

**Figura 1-2:** Esquema de la envoltura celular de las micobacterias. En la parte izquierda de la figura se muestra la envoltura celular de *M. smegmatis* tomada por microscopía de transmisión electrónica. La otra parte de la figura es un esquema gráfico de la envoltura micobacteriana en el que se observa la membrana plasmática, periplasma, componentes de la base de la pared celular (PG, AG y AM) y lípidos extraíbles (que con los AM forman la membrana externa), finalmente se encuentra la capa externa (llamada como “capsula” para especies patogénicas). (Figura adaptada de las referencias [30] y [38]).



Las proteínas de membranas en las micobacterias se encargan del metabolismo pequeñas moléculas, como ácidos grasos, y de otros procesos celulares, tales como la

unión y transporte de aminoácidos, iones, carbohidratos, ácidos orgánicos y drogas a través de la bicapa lipídica [44].

### 1.6.2 Pared celular

La pared celular es una compleja estructura que rodea las micobacterias (Figura 1-2) desde la membrana celular, y se le atribuye parte de la resistencia a un buen número de antibióticos [24].

El espacio periplasmático en la micobacterias representa el compartimiento confinado entre la membrana plasmática y la capa externa de PG que hace parte del núcleo de la pared celular. El periplasma está compuesto por moléculas solubles [45], principalmente de tipo proteico [38].

El núcleo de la pared celular está compuesto por PG, AG y AM que están unidos covalentemente formando el complejo micolil–arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP). El PG se compone de unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilglicolil-murámico conectadas por pequeños péptidos [30]. El AG es el principal polisacárido de la pared celular, está conformado por arabinano y galactano en su forma furanosa para formar un complejo heteropolisacárido ramificado [24]. Finalmente, los AM, son una variedad de ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 carbonos)  $\alpha$ -alquilados y  $\beta$ -hidroxilados, que se encargan de dar la permeabilidad de la pared celular [24]. En su mayoría los AM se encuentran unidos covalentemente al mAGP, pero algunos de ellos se pueden encontrar de forma libre en la pared micobacteriana [24, 30].

Se ha propuesto una estructura que hace las veces de membrana externa de la micobacteria, ubicada entre los AM que se encuentran unidos covalentemente al mAGP (capa interna), y lípidos libres (capa externa) [30, 38]. Los lípidos libres se enlazan de forma no covalente con el mAGP y son extraíbles fácilmente con solventes orgánicos. Dentro de este grupo de lípidos se encuentran manosidos de fosfatidil mioinositol (PIM), glicolípido fenólico (PGL), ftiocerol dimicoserato (PDIM), dimicolato de trehalosa (TDM) y sulfolípidos (SL) [30, 46]. Los PIM son fosfolípidos responsables de regular la expresión de citocinas, la respuesta de células T y la respuesta oxidante de los macrófagos, tienen manosas en forma piranosa y los enlaces de estos azúcares son  $\alpha(1-6)$  [47]. El PGL

contiene una parte glicosídica y cadenas ramificadas hidrofóbicas, algunos azúcares se encuentran O-metilados y la parte lipídica está compuesta de fenol-ftiocerol (C<sub>33-41</sub>); su función no es clara pero su ausencia en la micobacteria hace que pierda su carácter modulador frente al ataque del sistema inmune [48]. El PDIM es polar comparado con los otros glicolípidos, consiste en un motivo ftiocerol esterificado con ácidos micoséricos multiramificados con grupos metilo (C<sub>27-34</sub>); además, tiene como función ser agente anti-permeabilizante y protector contra agentes antimicrobianos [48]. El TDM es una trehalosa esterificada por algunos de los AM de la pared celular, el que resulta ser tóxico para la células hospederas [48]. Los SL son moléculas que se han asociado con la fijación del rojo neutro en la superficie altamente ácida del bacilo y a la virulencia del bacilo [48]. Las aciltrehalosas sulfatadas tienen 4 grupos acilo, tres de ellos glicosilados y el último sulfatado. En el caso de *M. tuberculosis* existen cinco familias de SL que se diferencian en la combinación de las cadenas hidrocarbonadas (palmitato/estearato, ftioceranato e hidroxiftioceranato) [49].

La capsula que es una estructura externa a la pared celular que hace parte de la envoltura, principalmente en las especies patogénicas [30], aunque se cree existir una delgada capa capsular en las micobacterias saprofitas. La capsula está compuesta de polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos [30]. Las moléculas que componen la capsula han sido catalogadas como de señalización y efectoras en las micobacterias, debido a su papel en la interacción con el sistema inmune [24]. Polisacáridos como el glucano, son los principales componentes de la capsula de las micobacterias de crecimiento lento, y especialmente de las patogénicas como *M. tuberculosis* [30].

## 1.7 Transporte a través de la membrana externa de las micobacterias

Debido a la permeabilidad de la pared, la captación de moléculas polares pequeñas por parte de las micobacterias se resuelve con la producción de las proteínas formadoras de poros hidrofílicos que atraviesan la pared celular, conocidas como porinas, las que están presentes en micobacterias de crecimiento lento y rápido [30, 50]. En las micobacterias se han identificado porinas que se encargan de la captura de nutrientes como fosfato, sulfato y algunos aminoácidos [38]. Los compuestos policatiónicos al parecer

desorganizan la membrana externa, mediando su propia captación en un proceso llamado “captación autopromovida” [38]. Aunque algunos compuestos policatiónicos son específicamente captados por proteínas transportadoras [45].

Las moléculas no polares son capaces de difundir fácilmente a través de las bicapas lipídicas, pero la permeabilidad en el caso de la membrana externa de las micobacterias es más baja debido principalmente a presencia de los AM. Una de las ventajas de este fenómeno es la mayor resistencia del patógeno a los antibióticos hidrofóbicos [38].

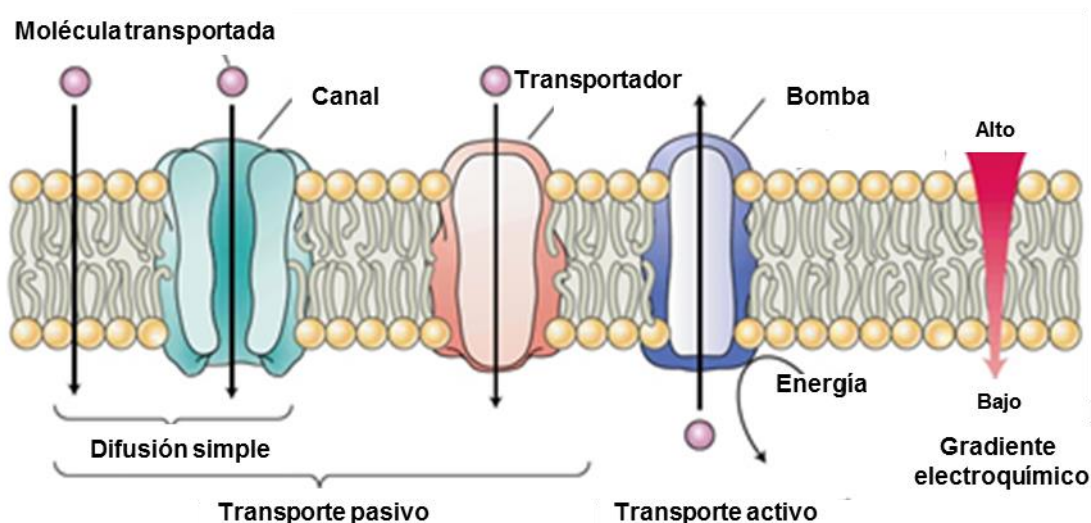
## **1.8 Transporte a través de la membrana interna de las micobacterias**

Los nutrientes que logran atravesar la parte externa de la pared celular necesitan transpasar el periplasma mediante un mecanismo que aún no se conoce en las micobacterias. Los nutrientes deben pasar luego por la membrana plasmática haciendo uso de proteínas transportadoras específicas, que en la micobacterias se sabe transportan carbohidratos, lípidos, compuestos fosforados, sulfurados y nitrogenados, así como para aminoácidos y cationes inorgánicos [38, 45].

Los tipos de transporte a través en la membrana de la micobacterias son los mismos activo y pasivo encontrados en todas la células (Figura 1-3) [51]. Dentro del transporte pasivo se encuentran las moléculas que son permeables en la membrana [51]; por ejemplo el glicerol y el amoniaco son capaces de difundir a través de la membrana para ser utilizados como fuente de carbono y nitrógeno [38]. La difusión facilitada también hace parte del transporte pasivo y este tipo de transporte es producto de las proteínas formadoras de canal que pueden transportar solutos polares, como iones y agua [51]; en el caso de *M. tuberculosis* se cree que los fosfatos son transportados por estos canales a través de la membrana plasmática [38]. El transporte a favor del gradiente electroquímico mediado por un transportadores también es un tipo de transporte pasivo, estos transportadores son capaces de transportar iones específicos y metabolitos orgánicos [51]; en el caso de *M. tuberculosis* se han encontrado transportadores de monosacáridos, sulfatos, amoniaco, aminoácidos y péptidos [38]. Finalmente, las proteínas encargadas de bombear una sustancia en contra del gradiente electroquímico por el suministro de

energía metabólica, hacen parte del transporte activo [51]; en el caso de *M. tuberculosis* son las bombas ATPasa transportadoras de iones y ATPasas tipo ABC [38].

**Figura 1-3:** Esquema de los tipos de transporte encontrados en la membrana plasmática de las células, incluidas las micobacterias. Comparando el transporte pasivo a favor del gradiente electroquímico y un transporte activo en contra del gradiente electroquímico. Figura adaptada de [51].

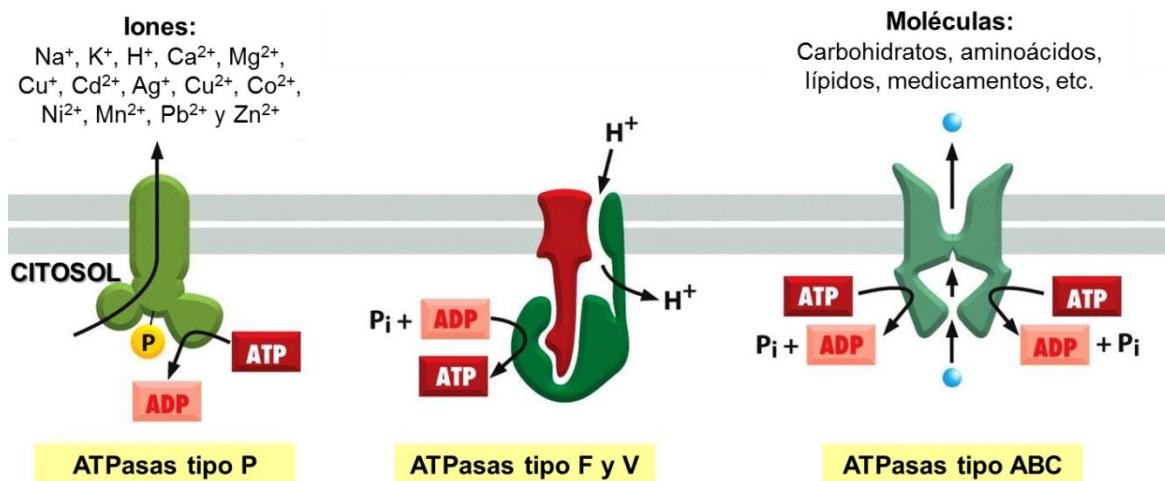


Mediante estudios *in silico* se ha evidenciado la presencia de una gran cantidad de bombas encargadas del transporte de sustancias a través de la membrana plasmática en el bacilo tuberculoso [52]. En el caso de proteínas encargadas del transporte de carbohidratos, se han descrito bombas tipo ABC y permeasas de azúcares de la superfamilia facilitadoras mayores (MFS) en *M. tuberculosis* [45]. Por otro lado, estudios genómicos han identificado la presencia de genes que codifican proteínas transportadoras putativas de solutos que contienen sulfato, fosfato y algunos aminoácidos [45]. En cuanto a transportadores de iones metálicos, *M. tuberculosis* posee 29 genes que codifican para un amplio repertorio de transportadores de iones metálicos comprendidos entre 8 familias de transportadores activos secundarios y 3 de transportadores activos primarios, que incluye 11 ATPasas tipo P encargadas posiblemente del transporte de  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+/3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $AsO_2^-$  y  $AsO_4^{3-}$ . [38, 45]

## 1.9 ATPasas

Las ATPasas hacen parte de las proteínas encargadas del transporte de solutos a través de la membrana, y se agrupan en 4 tipos de superfamilias, P, F, V y ABC (Figura 1-4). Todas ellas tienen en común: estar presentes en membranas biológicas, hidrolizar ATP y transportar al menos una sustancia a expensas de la hidrólisis de ATP. Estas enzimas se encuentran en la mayoría de organismos [53], tienen diferentes especificidades de transporte, y se consideran esenciales para la viabilidad de las células. Otra de las funciones de estas las ATPasas es la interconversión de la energía metabólica en un gradiente electroquímico que puede ser aprovechado en procesos celulares de captura de nutrientes [54]. También estas proteínas se encargan de controlar el volumen de la célula, porque se entre sus funciones está nivelar la concentración intracelular de  $K^+$ , el cual responde a la osmolaridad del medio [55].

**Figura 1-4:** Esquema descriptivo de la función de las enzimas ATPasas. Las ATPasas tipo P se encargan del transporte de iones y forman un intermediario fosforilado de la enzima. Las ATPasas tipo F y V transportan protones en contra del gradiente electroquímico a expensas de la hidrólisis del ATP. Finalmente, las ATPasas tipo ABC se encargan del transporte de carbohidratos, aminoácidos, lípidos, medicamentos, entre otras moléculas a expensas de la hidrólisis del ATP. Figura adaptada de [56].



Las ATPasas tipo P se caracterizan por transportar generalmente cationes y porque durante su ciclo catalítico forman un intermediario fosforilado que involucra un enlace covalente [54]. Las ATPasas tipo F y V se encargan de mantener el gradiente de pH en la

membrana. En células aeróbicas, las ATPasas tipo F funcionan como ATP sintasas que se encargan de producir ATP a partir del gradiente de protones generado [57, 58]. Las tipo V inicialmente observadas en vacuolas, se encargan de transportar protones y se relacionan procesos vitales como endocitosis, tráfico de proteínas, transporte activo de metabolitos, homeostasis y liberación de neurotransmisores [58-60]. Finalmente, los transportadores tipo ABC (cassette de unión a ATP, siglas en inglés) se encargan de transportar moléculas más grandes como carbohidratos, aminoácidos, lípidos, medicamentos, entre otras macromoléculas [61].

Las enzimas ATPasas se han asociado con algunas enfermedades y episodios de resistencia a medicamentos (Figura 1-5). Por ello su conocimiento es de gran valor en el desarrollo de nuevas terapias para múltiples enfermedades tales como cáncer, enfermedades cardíacas y mitocondriales, osteoporosis, degeneración macromolecular, deficiencia inmune, fibrosis quística, diabetes, úlceras, nefro-toxicidad, pérdida del oído, desordenes de la piel, lupus y malaria [53]. Por lo general estas enfermedades son el resultado directo de una mutación en uno o varios genes que codifican a las ATPasas, la mayoría de estas mutaciones ocurren en los transportadores tipo ABC que en el humano existen alrededor de 50 clases [62].

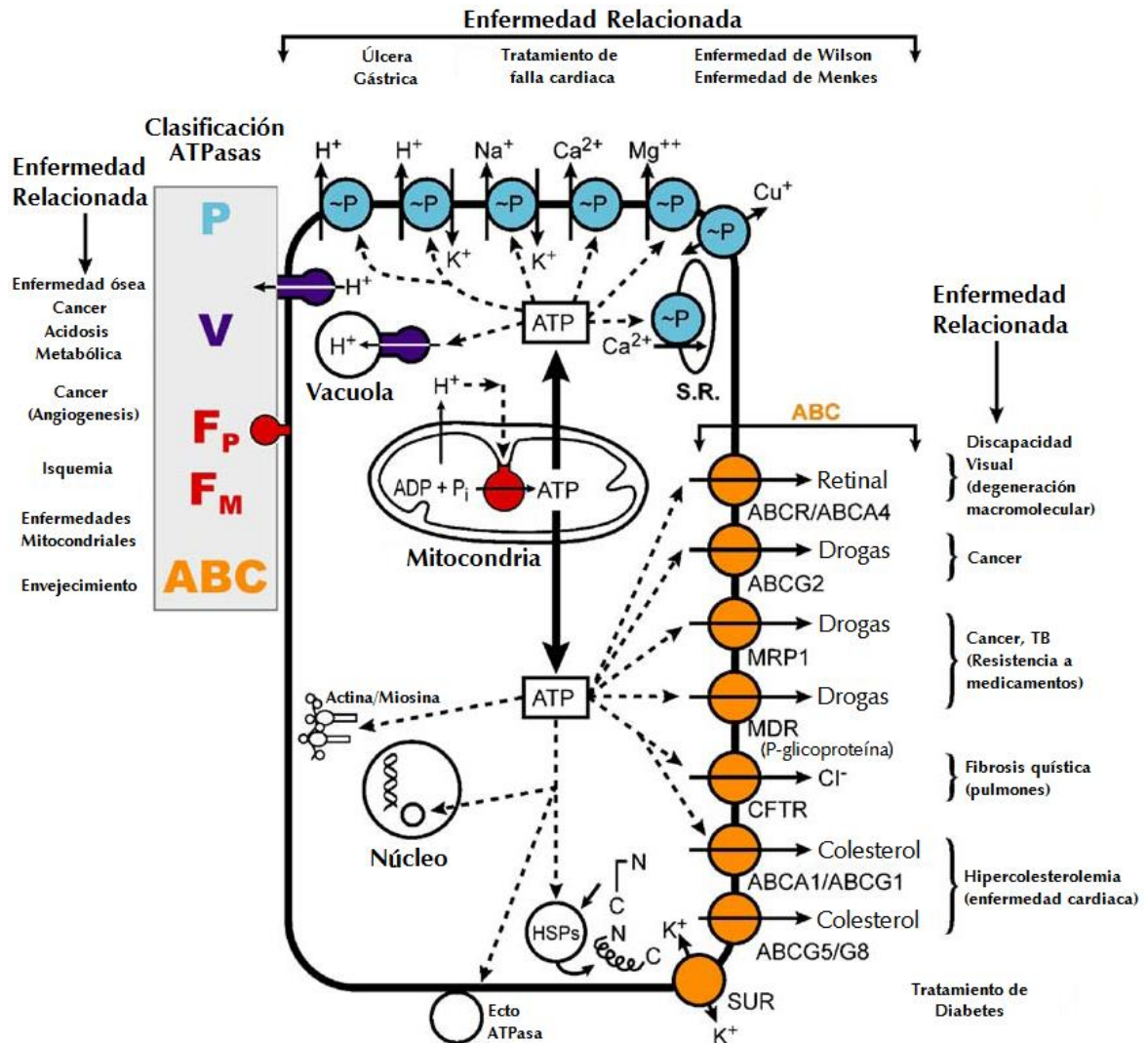
### 1.9.1 ATPasas tipo P

El nombre de las ATPasas tipo P se deriva del hecho de la formación transitoria de un intermediario fosforilado en un residuo invariante de aspartato, que pertenece al motivo DKTGTLT, durante el ciclo catalítico de la enzima [54]. Pertenecen a una superfamilia de proteínas ubicua y diversa presente en las membranas de las células, y se encargan del transporte de cationes y lípidos en contra del potencial electroquímico hidrolizando ATP[54]. Estas proteínas son esenciales para todas las formas de vida ya que interconvierten la energía metabólica en gradientes electroquímicos aprovechados para procesos de captación de nutrientes que pueden ser ligandos de metaloenzimas o sustratos encargados de la señalización celular. Las ATPasas tipo P se clasifican en cinco diferentes subfamilias ( $P_1$ - $P_5$ ) según su especificidad y topología membranal. Cada subfamilia puede dividirse en varios subgrupos (A, B, etc) [63], de acuerdo a la subclasificación propuesta por Lutsenko y Kaplan, 1995 [55]. Sin importar su clasificación todas utilizan el mismo mecanismo catalítico y la misma estructura base [54]. En la



Tabla 1-1 se muestran todas las subfamilias que se conocen de las ATPasas tipo P, los organismos en las que se han encontrado, su especificidad y funciones biológicas.

**Figura 1-5:** Resumen esquemático de algunas enfermedades asociadas con enzimas ATPasas. Figura tomada de [53].



Estructuralmente todas las ATPasas tipo P se caracterizan por contener entre 8-10 segmentos transmembranales (TMS) y un núcleo estructural conservado entre arqueas, procariontas y eucariotas. La mayoría están involucradas en el transporte de cationes a través de los sistemas membranales celulares y subcelulares. Actualmente se han identificado bombas específicas para iones de Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, H<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> también para aminofosfolípidos [54, 55]. Todas las ATPasas

tipo P reportadas contienen cinco dominios funcionales y estructurales distintos (Figura 1-6), entre ellos tres son citoplasmáticos (A, actuador; N, unión a nucleótido; P, fosforilación) y dos membranales (T, transporte; S, dominio de soporte específico de la clase), pero en algunos casos se encuentra otro dominio citoplasmático, regulatorio (R) [54], el que se sitúa en la región N-terminal y/o C-terminal. Cada uno de estos dominios tiene una función específica durante cada ciclo catalítico [54]. Primero el dominio N produce una fosforilación en un residuo D situado en el dominio P; posteriormente, el dominio A produce la defosforilación del residuo D para dejar a la enzima en su estado inicial [54]. Por lo tanto se puede considerar que el dominio N actúa como una quinasa, y el dominio A como una fosfatasa que tienen el mismo sustrato. Con certeza se conoce que el sitio de fosforilación se encuentra en la región citoplasmática de la proteína, al igual que los sitios de unión al ATP. La región de unión del metal tienen motivos altamente conservados y dependen de la especificidad del catión transportado [54].

Las características específicas de cada uno de los cinco dominios de las ATPasas son:

El dominio A cumple la función de una fosfatasa, y se compone por un módulo globular conectado a dos o tres regiones transmembranales dependiendo de la subfamilia que pertenezca la ATPasa (Las tipo P<sub>1</sub> están conectadas a dos regiones transmembranales y las tipo P<sub>2</sub>-P<sub>5</sub> a tres). La unión del dominio con los segmentos transmembranales es flexible para facilitar su rotación, y así controlar la disposición espacial del el motivo TGE [54], lo que caracteriza el dominio y se hace necesario para la reacción de defosforilación. Algunas ATPasas tipo P, especialmente aquellas encargadas del transporte de metales pesados, tienen extremos N-terminales largos fusionadas al dominio A, que incluyen 2 o más TMS adicionales, motivos de unión a los iones y posibles actividades regulatorias [54, 63-65].

El dominio P aporta el residuo de aspartato que es fosforilado y pertenece al motivo conservado DKTGTLT. En el dominio se encuentran también dos secuencias que involucran la interacción con el ion Mg<sup>2+</sup> para facilitar el acercamiento del ATP con el sitio de fosforilación (Motivos TGDN y GDGXND) [54, 64]. En algunas ATPasas tipo P se ha encontrado un sitio citoplasmático de unión de K<sup>+</sup>, que no es transportado, pero facilita la defosforilación por la estabilización del acoplamiento con el dominio A [54].

**Tabla 1-1:** Distribución, especificidad y función de las subfamilias de las ATPasas tipo P. Tabla tomada y adaptada de [62].

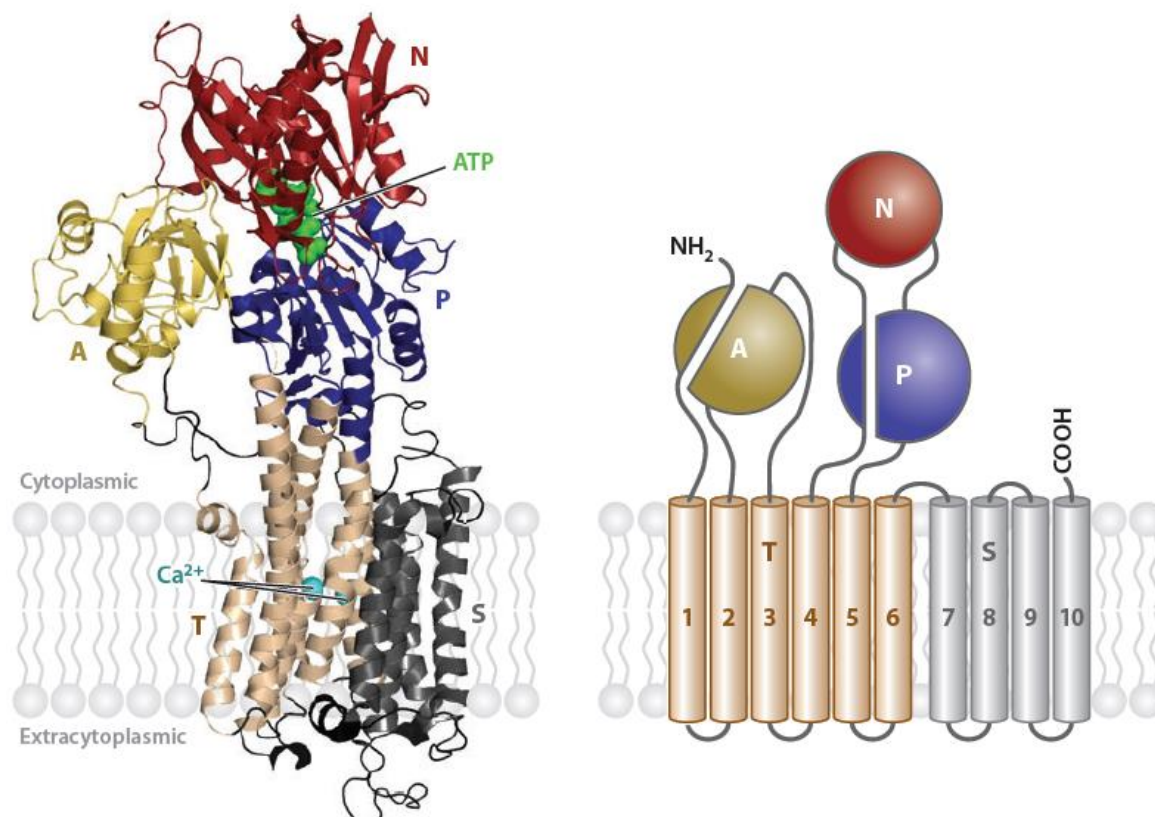
| Subgrupo   | Organismo |          |        |         |               |             | Especificidad  | Función   |
|------------|-----------|----------|--------|---------|---------------|-------------|--|---|
|            | Bacterias | Archaeas | Hongos | Plantas | Invertebrados | Vertebrados |  |   |
| <b>P1A</b> | X         | X        |        |         |               |             | K <sup>+</sup>   | Regular presión osmótica  |
| <b>P1B</b> | X         | X        | X      | X       | X             | X           | Cu <sup>+</sup> , Cu <sup>2+</sup> , Ag <sup>+</sup> ,<br>Cd <sup>2+</sup> , Zn <sup>2+</sup> , Pb <sup>2+</sup> y<br>Co <sup>2+</sup> | Desintoxicación, homeostasis de elementos trazas  |
| <b>P2A</b> | X         | X        | X      | X       | X             | X           | Ca <sup>2+</sup> , Mn <sup>2+</sup> (SERCA)  | Transporte de Ca <sup>2+</sup> , señalización, relajación muscular, homeostasis de elementos trazas |
| <b>P2B</b> |           |          | X      | X       | X             | X           | Ca <sup>2+</sup> (PMCA)  | Transporte de Ca <sup>2+</sup> (en la membrana plasmática), señalización                            |
| <b>P2C</b> |           |          | X      |         | X             | X           | Na <sup>+</sup> /K <sup>+</sup> , H <sup>+</sup> /K <sup>+</sup>   | Regular potencial de membrana, funcionamiento del riñón, acidificación del estomago                 |
| <b>P2D</b> |           |          | X      |         | X             |             | Na <sup>+</sup> , Ca <sup>2+</sup>   | Desconocida   |
| <b>P3A</b> | X         | X        | X      | X       |               |             | H <sup>+</sup>   | Regular potencial de membrana, homeostasis del pH   |
| <b>P3B</b> | X         |          |        |         |               |             | Mg <sup>2+</sup>   | Desconocida   |
| <b>P4</b>  |           |          | X      | X       | X             | X           | Fosfolípidos   | Transporte de lípidos, mantener la asimetría de la bicapa lipídica                                  |
| <b>P5</b>  |           |          | X      | X       | X             | X           | Desconocida  | Desconocida   |

El dominio N contiene residuos necesarios para la interacción de la enzima con el ATP, la unión se da solo por la parte del adenosín permitiendo la exposición del grupo trifosfato [66]. Entre los dominios citoplasmáticos, N es el más variable tanto en tamaño como en secuencia [54, 63-65, 67].

El dominio T es el encargado de unir el ion que va a ser transportado en la enzima. Consta de seis segmentos transmembranales; el sitio de unión a ion es localizado en la parte media de las hélices que atraviesan de la membrana. Dependiendo del sustrato puede acomodar diferente número de iones con diferentes cargas, radios y geometrías de coordinación. Este dominio es altamente flexible y se mueve durante el ciclo catalítico

cuando el ion es asociado y disociado [54], y aunque presenta baja identidad de secuencia entre las diferentes ATPasas tipo P, su estructura tridimensional es muy similar entre ellas. Los sitios de unión al ion están ubicados estrictamente a la medida para acomodar diferente número de iones con diferentes cargas, radios y geometrías de coordinación [54, 63-65].

**Figura 1-6:** Esquema de la organización estructural de las ATPasas tipo P. En la primera figura (izquierda) se muestra un modelo de cintas de la estructura terciaria de la  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPasa tipo P SERCA2a (ID PDB 1T5S [68]), en la que se ilustra el sitio de unión transmembranal del metal y el sitio de unión al nucleótido. En la segunda figura (derecha) se muestra una representación esquemática de la misma estructura con los dominios en letras mayúscula. Figura tomada de [54].



El dominio S es una unidad auxiliar que funciona como soporte estructural para el dominio T, puede tener funciones especializadas como proveer un sitio de unión al ion adicional en algunas ATPasas. A diferencia del dominio T, este dominio es mucho más rígido sin muchas variaciones conformacionales durante el ciclo catalítico. Puede ubicarse en los extremos N o C- terminal o en ambos [54], se ha encontrado que las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  se localiza en la región N-terminal mientras que las tipo  $\text{P}_{2\text{.P}_3}$  en el C-terminal.

### 1.9.1.1 ATPasas tipo P<sub>1B</sub> encargadas de transportar metales pesados

Se conocen como ATPasas tipo P<sub>1B</sub>, a la subfamilia de ATPasas encargada de catalizar la translocación de metales pesados, y que tienen como función tomar, compartimentalizar, y expulsar los metales en la célula. Todas ATPasas tipo P<sub>1B</sub> son ubicuas y se encuentran comúnmente en bacterias y arqueas [54]. Filogenéticamente la subfamilia P<sub>1B</sub> esta dividida en bombas que transportan iones monovalentes (Cu<sup>+</sup>, Ag<sup>+</sup>) y divalentes (Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>) [54]. Pero también son clasificadas en cinco subgrupos, entre ellos las ATPasas tipo P<sub>1B-1</sub>, que son bombas encargadas del transporte de Cu<sup>+</sup>; P<sub>1B-2</sub> que transportan Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup>; P<sub>1B-3</sub> que transporta Cu<sup>2+</sup> se parece al primer grupo pero se diferencian en el motivos de la TM 6 [3, 69] y en la región del N-terminal [70]; el grupo P<sub>1B-4</sub> en el que se encuentran las ATPasas tipo P que transportan Co<sup>2+</sup> [69]; y finalmente en el grupo P<sub>1B-5</sub> que son las enzimas de la que no se conocen su sustrato [3]. Los genes que codifican a algunas de estas bombas pueden ser transferidos horizontalmente [71], ya que han sido encontrados en plásmidos [72].

En cuanto a la estructura, a diferencia de las otras ATPasas tipo P que poseen diez, las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> posee ocho TMS [70]. Estas ATPasas tienen un motivo CPX o XPC (donde X=C, S, o H) en la sexta hélice (TM6), que es esencial para el transporte [10]. Se han observado que la especificidad al sustrato viene dada por las secuencias conservadas cortas en las hélices TM 6-8. Un ejemplo son las bombas Zn<sup>2+</sup>/Cd<sup>2+</sup> que presentan el motivo CPX en TM6 el que está precedido por un motivo WIYR/K [69], mientras que en las bombas Cu<sup>+</sup>/Ag<sup>+</sup> este último motivo se encuentra ausente. El dominio N de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> tiene menor grado de similitud al de otras bombas, a excepción de las ATPasas tipo P<sub>1A</sub> bacterianas [54]. En el caso del dominio A de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> su estructura tridimensional es comparable con las otras ATPasas tipo P, aunque su secuencia de aminoácidos presente baja homología [54].

Otra característica de algunas ATPasas tipo P<sub>1B</sub> es que presentan un sitio adicional de unión a metal, conocido como dominios de unión al metal (MBD), localizado en los extremos N y/o C-terminal ubicados en el citosol. Estos sitios difieren en longitud y secuencia, pero comparten el jugar un papel regulatorio de la enzima y no ser requeridos en el transporte del ion [70]. Los MBD son formados principalmente por extensiones terminales ricas en C y a veces en residuos de H, los que son capaces de coordinar con

los iones metálicos con una alta afinidad. Se ha reportado que estos MBD tienen varios sitios de unión y por lo tanto funcionan como un sensor al metal transportado [54]. Un ejemplo de estos dominios es el encontrado en la ATPasa tipo P transportadora de  $\text{Cd}^{2+}$  en levaduras (Pca1p), que aumenta su tiempo de vida media cuando está presente el ion metálico [73].

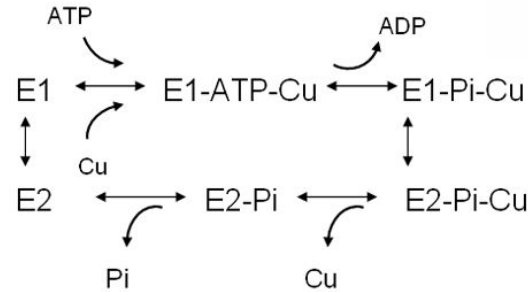
Actualmente, las ATPasas tipo  $P_{1B}$  que han sido bien caracterizadas son: CadA, ZntA y CopA de bacterias y transportan  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Cu}^+$  respectivamente; en plantas HMA4 transportadora de  $\text{Zn}^{2+}$ ; y en humanos ATP7A y ATP7B que son transportadoras de  $\text{Cu}^{+2}$ . En la naturaleza la ATPasa tipo  $P_{1B}$  que se encuentra en mayor abundancia es la encargada de transporte del ion  $\text{Cu}^+$  [54]. En el caso de *M. tuberculosis* se ha relacionado con la virulencia la ATPasa tipo  $P_{1B}$ , CtpV, encargada del transporte de  $\text{Cu}^+$  [6]. Otra ATPasa tipo P, CtpC, se conoce que protege al bacilo tuberculoso del exceso de  $\text{Zn}^{2+}$  [74] y también transporta  $\text{Mn}^{2+}$  [75].

### 1.9.1.2 Mecanismo catalítico

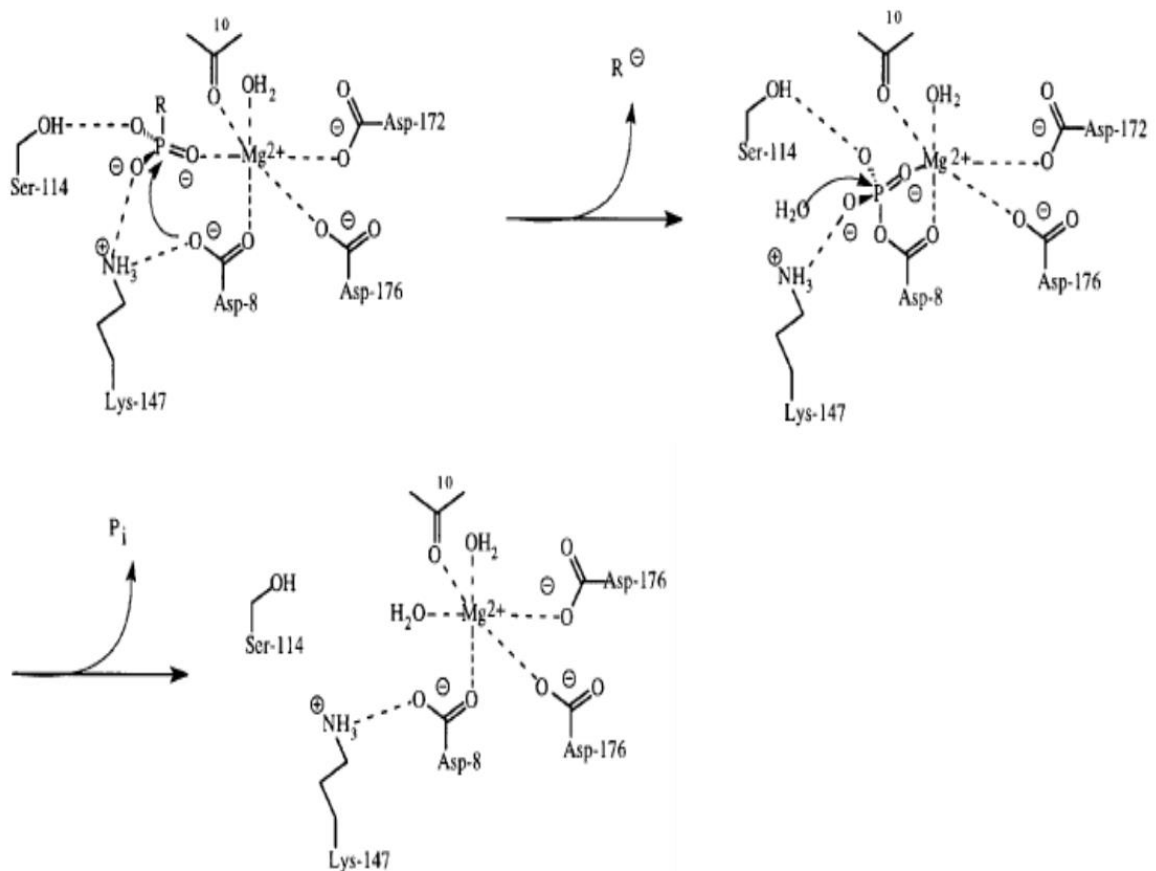
La Figura 1-7 muestra el mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P siguiendo el modelo propuesto por Post-Albers [54]. Para el inicio del ciclo catalítico, los sitios transmembranales de unión al metal (TM-MBS) que son responsables de capturar el ion durante la translocación en la membrana, están expuestos al citoplasma. El ion es recibido de una chaperona asociada a  $\text{Cu}^+$  [76]; luego, el metal se une junto con el ATP para poder producir la fosforilación de la enzima [69] (formación del intermediario E1P-Cu) permitiendo la oclusión transitoria del  $\text{Cu}^+$  dentro de la región transmembranal. El transporte del metal es realizado siguiendo la apertura del TM-MBS al compartimiento extracelular (vesicular/luminal) [76] produciendo un cambio conformacional de la enzima para generar el intermediario E2P el cual presenta una menor afinidad por el  $\text{Cu}^+$  [69], generando así la disociación de  $\text{Cu}^+$  acompañada de la defosforilación por el ataque nucleofílico de una molécula de agua. La enzima vuelve a su estado E1 [69], quedando lista para un nuevo ciclo catalítico.

La unión del ion a la ATPasa induce rearrreglos en la hélice de la enzima que son capaces de modificar el dominio P, lo que permite el acercamiento del ion  $\text{Mg}^{2+}$  al residuo aspartato para evitar las repulsiones electrostáticas que existen entre el  $\gamma$ -fosfato del ATP, y así para facilitar su fosforilación del residuo D (Figura 1-8) [54].

**Figura 1-7:** Modelo del mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P propuesto por Post-Albers. Figura tomada de [69]



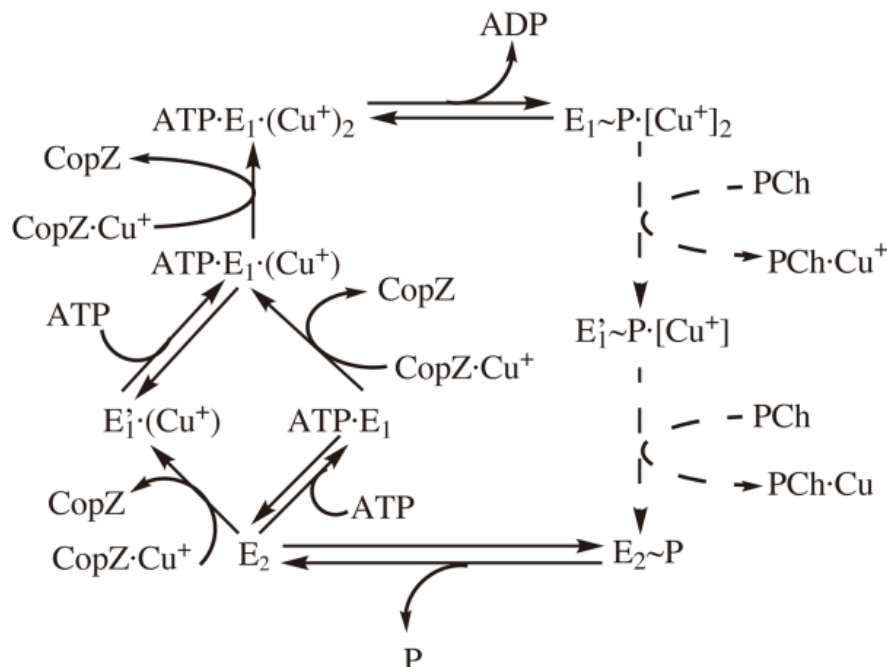
**Figura 1-8:** Mecanismo del proceso de fosforilación y defosforilación de las ATPasas tipo P. (R=ADP). Figura tomada de [77].



Los cambios conformacionales de la enzima entre los estados de transición E1P-Cu y E2P-Cu se asocian con el paso limitante de la reacción enzimática [54, 69]. Cuando el

ion es difundido fuera de la parte externa de la membrana, la bomba es defosforilada por el dominio A, como consecuencia de la coordinación de una molécula de agua con el residuo de glutamato del motivo TGE y el residuo fosforilado de aspartato permitiendo el ataque nucleofílico para romper el enlace fosfato [54, 77]. Finalmente cuando la enzima se encuentra defosforilada en el estado E2, sucede una rotación del dominio A alejándose del dominio P, lo que relaja la enzima y la retorna a su estado conformacional E1 [69].

**Figura 1-9:** Ciclo catalítico de las  $\text{Cu}^+$  ATPasas tipo P que transportan dos cationes por cada ciclo. CopZ y PCh son chaperonas, la primera está presente en la mayoría de organismos y la segunda es hipotética aceptora de  $\text{Cu}^+$  en el periplasma. El  $\text{Cu}^+$  citoplasmático se une a los dos TM-MBS y se acopla con la hidrólisis de ATP y la fosforilación de la enzima formando el estado  $(\text{E1}(\text{Cu}^+)_2)$ . Luego la enzima sufre un cambio conformacional ( $\text{E2P}$ ) en el que se exponen los TM-MBS hacia el periplasma permitiendo la salida del metal. Seguido, la enzima se defosforila y vuelve a su estado E1 donde queda lista para un nuevo ciclo catalítico. Aquí es relevante que la transición entre  $\text{E2} \rightarrow \text{E1}$  es acelerada por ATP (o ADP) el cual actúa con baja afinidad (de modo modulador) [78]. Nótese que la transferencia del  $\text{Cu}^+$  por CopZ es un paso irreversible, y que la unión del ATP es requerida para ocupar totalmente el sitio de transporte. Las líneas discontinuas indican que estos pasos son propuestos durante el ciclo catalítico. PCh indica una chaperona hipotética aceptara de  $\text{Cu}^+$  del periplasma. Figura tomada de [3].



El mecanismo catalítico anterior se ajusta a todas las ATPasas tipo P, pero en el caso específico de las transportadoras de  $\text{Cu}^+$  se ha encontrado que el mecanismo tiene

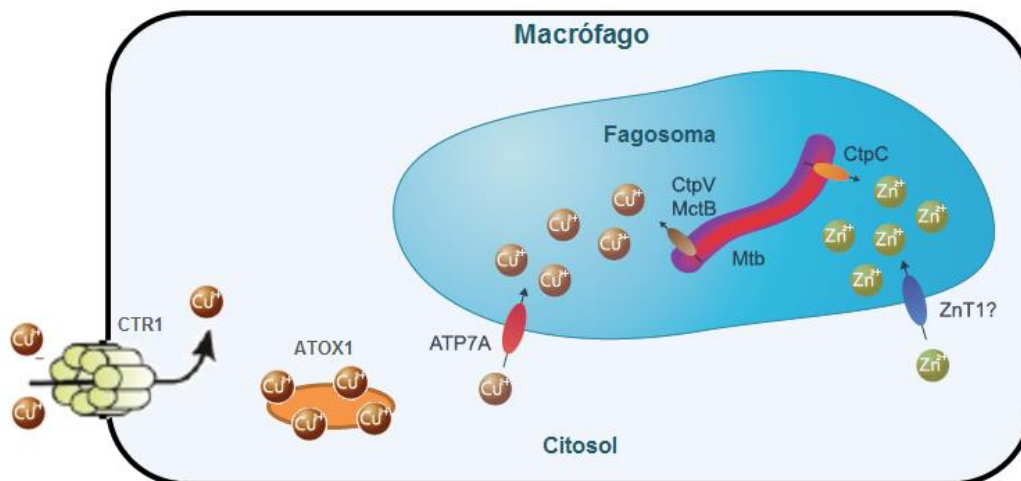


variaciones. En particular, las bombas que son capaces de transportar dos iones durante cada ciclo catalítico (Figura 1-9), donde la unión de cada ion se hace en dos pasos separados [3]. En este caso los iones no se encuentran libres cuando se unen a TM-MBS [79], ellos se encuentran acomplejados por proteínas chaperonas que se encargan de transferir el  $\text{Cu}^+$  a la bomba para transportarlo.

### 1.9.1.3 Las ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ como posibles factores de virulencia

Como el transporte de iones metálicos interviene en la adaptación a la supervivencia intracelular y la replicación de células patógenas[55], las ATPasas tipo P deben tener un papel importante en la importación y exportación de metales esenciales y tóxicos. Recientemente se ha reportado la relación de CtpV y CtpC (encargada del transporte de  $\text{Zn}^{2+}$ ) con la virulencia [6] y patogénesis [74]del bacilo tuberculoso.

**Figura 1-10:** Papel de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en la actividad bactericida de macrófagos y modelo del mecanismo de resistencia utilizado por *M. tuberculosis* [80]. El  $\text{Cu}^{2+}$  es transportado hacia el fagosoma del macrófago haciendo uso de los transportadores CTR1 y ATP7A, y la chaperona citoplasmática ATOX1. El  $\text{Zn}^{2+}$  es posiblemente transportado desde el citosol del macrófago hacia el fagosoma por el transportador ZnT1. *M. tuberculosis* (Mtb) responde al aumento de estos metales usando las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  (CtpV y CtpC) y la porina de Cu MtcB. Figura tomada y adaptada de [4] y [80].

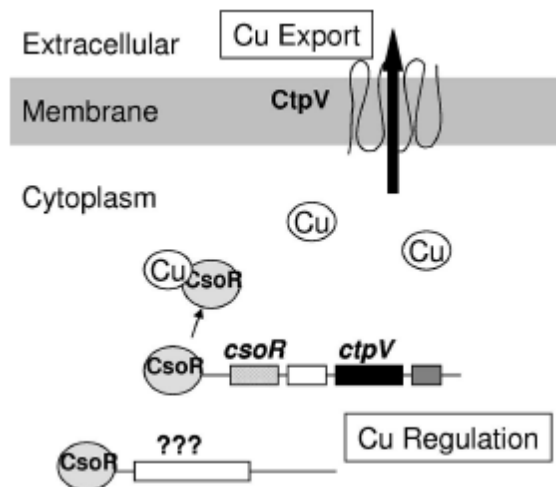


La bomba CtpV ayuda a regular el contenido intracelular  $\text{Cu}^+$  para facilitar la supervivencia del bacilo dentro de macrófago [80]. Los macrófagos internalizan el  $\text{Cu}^{2+}$  del medio extracelular por el transportador de Ctr1, y una vez en el citosol el metal es unido a una chaperona específica de Cu Atox1 que lo transporta cerca de la ATPasa tipo

P<sub>1B</sub>, ATP7A, para así poder transferir el metal dentro del fagosoma. En una infección exitosa, el efecto del Cu<sup>2+</sup> después de atravesar la pared y la membrana interna de la micobacteria es minimizado por su acomplejamiento con la metalotioneína MymT y su expulsión por la ATPasa tipo P<sub>1B</sub>, CtpV, presente en la membrana interna [80, 81]. El mecanismo de eflujo mediado por CtpV deja el Cu<sup>2+</sup> libre en el periplasma, donde finalmente sale por el canal MctB, encontrado en la membrana externa (OM) [80, 81] (Figura 1-10).

Recientemente se ha identificado un regulador transcripcional de unión a Cu<sup>+</sup> en *M. tuberculosis* (CsoR), que se activa en respuesta del contenido de Cu del macrófago [7]. En la micobacteria, el regulador CsoR se expresa en ausencia de Cu<sup>+</sup> reprimiendo su operón [6], el que es expresado cuando CsoR se une al Cu<sup>+</sup> [6] (Figura 1-11). En modelo murino, la expresión de los genes *cso* durante la infección tuberculosa sugiere que la concentración de Cu muestra una fluctuación dentro del fagosoma: por lo tanto, la habilidad de la micobacteria para responder a esta fluctuación iónica se considera esencial para la virulencia [7].

**Figura 1-11:** Modelo de respuesta Cu<sup>+</sup> de *M. tuberculosis* mediado por CsoR. Figura tomada de [7].



## 1.10 Recombinería en micobacterias

Los intentos iniciales de mutar genes de *M. tuberculosis* mediante recombinación fue poco exitoso debido a las altas tasas de recombinación ilegítima, que causan el intercambio de secuencias con poca o ninguna homología. Este tipo de recombinación genera reordenamientos no deseados en el genoma [82]. Las frecuencias relativas de las recombinaciones ilegítimas y homólogas varían entre las especies de micobacterias. *M. smegmatis* presenta las tasas más bajas de recombinación ilegítima permitiendo la obtención de los mutantes deseados con mayor facilidad que en otras especies de este género de bacterias [82]. Por el contrario, *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, micobacterias de crecimiento lento exhiben niveles de recombinación ilegítima inusualmente altos [83].

Los intentos iniciales para la sustitución o delección de genes en micobacterias se centraron en el uso de "vectores suicidas" cuyo método incluye varios eventos de recombinación homóloga que permiten la integración de la secuencia deseada en el cromosoma de la bacteria [82]. Aunque este método es efectivo, se ve limitado por la necesidad de realizar construcciones genéticas complejas y/o varios pasos de la manipulación y selección [84].

La construcción de mutantes defectivos en un gen en particular se puede lograr utilizando sistemas basados en plásmidos y transducción especializada mediada por fagos y usando marcadores de selección como genes de resistencia antibiótica [84, 85]. Avances en la genética de *E. coli* han mostrado la utilidad de los bacteriófagos y la proteínas codificadas por ellos como herramientas para el desarrollo de una técnica de mutagénesis sencilla, rápida y eficaz, denominada recombinería [82] o ingeniería genética de proteínas recombinantes de fagos [86]. Ejemplos en *E. coli* son los sistemas de recombinación codificadas por el fago  $\lambda$ ; -Red y por el profago Rac (genes RecE y RecT) que aumentan las frecuencias de recombinación homóloga a tal punto que permiten obtener los mutantes deseados con relativa facilidad [84]. La técnica hace posible generar gran variedad de tipos de mutación: delecciones totales o parciales en genes cromosomales, mutaciones puntuales, inserciones pequeñas y mutagénesis en cromosomas bacterianos artificiales [84]. Extrapolar la técnica de recombinería a las micobacterias significó buscar proteínas con funciones similares a las del fago  $\lambda$ ; -Red y el profago Rac entre los fagos que infectan las micobacterias, o micobacteriófagos. La

bioinformática permitió identificar en el micobacteriófago Che9c dos genes con alta probabilidad de codificar para las proteínas de recombinación [84]. Luego de confirmar la actividad de las proteínas gp60 y gp61 de Che9c se estableció con ellas el sistema de recombinación para las micobacterias [87], aplicable tanto a *M. smegmatis* como a *M. tuberculosis* [82].

Para la construcción de los mutantes es necesario generar un sustrato de intercambio alélico (AES) con la homología suficiente para que la maquinaria de recombinación realice el intercambio de cadenas. Dichos AES son DNA de cadena sencilla (ssDNA) generados por la acción de una fago-exonucleasa (RecE ó gp60) partiendo de un sustrato de cadena doble (dsDNA). Las recombinasas RecT y gp61 forman una estructura toroidal alrededor del AES para catalizar la vinculación e intercambio de las cadenas de DNA. Con el fin de facilitar la selección final de los mutantes es recomendable que el AES tenga un marcador de selección generalmente flanqueado por las secuencias de homología al gen a mutar [82]. Una vez construido el AES se transforma en la cepa de recombinación deseada y se verifica el genotipo mutante por Southern Blot [88]. La recombinación en micobacterias ha sido ampliamente implementada para la rápida obtención de mutantes, ya que la mayoría de manipulaciones genéticas se realizan en una bacteria de fácil manipulación y crecimiento acelerado como lo es *E. coli*, y que en general supera muchos de los inconvenientes de las técnicas precedentes.

## 2. Hipótesis experimental

Las ATPasas tipo P son consideradas como indispensables para el correcto funcionamiento celular, ya que ayudan a la homeostasis iónica, así como el equilibrio osmótico y potencial de la pared [54, 89, 90]. Por lo tanto, resulta de interés evaluar la importancia de estas enzimas en la latencia, patogénesis, virulencia y demás aspectos responsables del éxito del bacilo tuberculoso como patógeno. Se ha establecido que las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> se encarga de transportar cationes de metales pesados para eliminar excesos que resultan nocivos para las células [3, 54]. Todo esto, con el fin de determinar si es posible utilizar este tipo de bombas como dianas terapéuticas adecuadas para el diseño de fármacos y/o vacunas, que permitan el rápido y eficaz tratamiento y prevención de la TB.

La reciente descripción que la ATPasa tipo P<sub>1B</sub> codificada por el gen *ctpA* de *M. tuberculosis* se sobreexpresa durante la infección del bacilo tuberculoso en humanos [11], induce a pensar sobre su importancia en el proceso infectivo de las micobacterias. La información suministrada al sobreexpresar este gen en micobacterias, será de gran utilidad para estimar su papel en la homeostasis iónica y en la resistencia, y su posible potencial como diana terapéutica.



## 3. Objetivos

### 3.1 Objetivo general

Describir el sistema de transporte catiónico generado por la ATPasa tipo P<sub>1B</sub>, CtpA, y su posible relación con la homeostasis iónica en membrana plasmática de *M. tuberculosis*.

### 3.2 Objetivos específicos

- Mediante herramientas bioinformáticas identificar el posible metal pesado que puede ser transportado por cada una de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv.
- Amplificar mediante PCR, clonar en un vector tipo T y confirmar la secuencia de nucleótidos del gen *ctpA* de *M. tuberculosis* H37Rv.
- Construir recombinantes de expresión de CtpA usando los vectores pET302 y pMV261, para expresar en *E. coli* y micobacterias, respectivamente.
- Utilizando complementación heteróloga en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, determinar la especificidad del metal pesado transportado por la bomba CtpA de *M. tuberculosis*. Utilizando ensayos de toxicidad frente a metales pesados y actividad ATPasa.
- Construir el sustrato de intercambio alélico (AES) y cepa de recombinería de *M. tuberculosis* H37Ra para la obtención de una cepa mutante defectiva en el gen *ctpA*, mediante la técnica de recombinería de micobacterias.





## 4. Materiales y métodos

El desarrollo metodológico de la presente investigación tuvo un componente de análisis bioinformático, manipulaciones genéticas y biología molecular, finalmente un componente bioquímico que responden a los objetivos propuestos.

### 4.1 Análisis bioinformático

Recientemente se demostró que en el genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv existen 12 marcos de lectura que codifican para ATPasas tipo P transportadoras de cationes metálicos, de las que 7 pertenecen a bombas que se encargan de transportar metales pesados [91]. La especificidad de estas enzimas fue determinada mediante el siguiente análisis *in silico*.

#### 4.1.1 Comparación topológica de la ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis*

La comparación topológica se hizo entre los perfiles de hidrofobicidad de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* [92] y secuencias consenso de ATPasas tipo P<sub>1B</sub> cuyo sustrato o catión de transporte es conocido a nivel de proteína (Tomadas de [91]). Se usó el programa *TMHMM 2.0* (usando parámetros por defecto) para obtener perfiles hidrofobicidad; el análisis de los gráficos resultantes se hizo manualmente comparando cada perfil.

#### 4.1.2 Búsqueda de motivos funcionales que diferencian a las ATPasa tipo P<sub>1B</sub>

La búsqueda de motivos funcionales se hizo sobre los alineamientos obtenidos con la herramienta *Praline* (usando como matriz BLOSUM62 y *Phobius* como predictor de estructura transmembranal) de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* H37Rv y las secuencias consenso. Manualmente se buscaron los motivos característicos de cada

subgrupo de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> [3, 69], teniendo en cuenta su ubicación a lo largo de la secuencia de aminoácidos.

### 4.1.3 Análisis *in silico* de CtpA de *M. tuberculosis*

El punto isoeléctrico y peso molecular de la proteína CtpA de *M. tuberculosis* H37Rv se analizaron utilizando los programas *Compute pI/Mw* [93] y *GeneRunner* [94]. También se analizó su posible topología, la presencia de motivos funcionales y se realizó la predicción de su estructura terciaria, como se relaciona a continuación.

#### ➤ **Predicción de la topología:**

La topología y ubicación de los TMS se evaluaron mediante las herramientas mostradas en la Tabla 4-1. Todos los programas se utilizaron con parámetros por defecto, excepto *TopPred* que permite seleccionar el tipo de organismo del que provienen las secuencias a analizar, en este caso de procariontes. Las herramientas *TMDet* y *PPM server* predicen los TMS a partir de archivos de estructura terciaria (formato PDB), intentando ubicar los TMS predichos entre los planos de la bicapa lipídica.

#### ➤ **Modelamiento de la estructura terciaria:**

Para modelar la estructura terciaria de la proteína CtpA se usó el servidor *Swiss-Model* en su modo automático [32]. Se construyeron dos modelos usando como plantilla dos Cu<sup>+</sup> ATPasa tipo P, CopA de *Archeoglobus fulgidus* (PDB ID 3j09B) y CopA de *Legionella pneumophila* (PDB ID 3rfuB).

Las estructuras terciarias modeladas se validaron usando el paquete de herramientas *Whatif* (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). Inicialmente se evaluó la calidad del modelo usando la herramienta *Protein Model Check* que identifica errores relacionados con los ángulos de enlace, posición de cadenas laterales, y ubicación atómica coherente con hidrofobicidad, entre otros aspectos. Posteriormente se usó la herramienta *Complete a structure* que intenta modelar correctamente la proteína corrigiendo los errores encontrados, y finalmente se evaluó la calidad del modelo corregido calculando el *Z-score* con la herramienta *Ramachandran plot evaluation*, que también hace parte de *Whatif*. El valor del *Z-score* es una medida de la calidad del modelo basado en el gráfico de Ramachandran y en las estructuras reportadas en el

PDB; modelos de alta calidad tendrán Z-scores cercanos a cero, en tanto que valores de -4.0 o menores indican problemas con la estructura [95].

**Tabla 4-1:** Listado de las herramientas utilizadas para la predicción de TMS y topología de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis*.

| Nombre     | URL  | Referencias                 |
|------------|--|-----------------------------|
| TopPred    | <a href="http://mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred">mobyli.pasteur.fr/cgi-bin/portal.py?#forms::toppred</a> | Claros (1994) [96]          |
| DAS        | <a href="http://www.sbc.su.se/~miklos/DAS/">www.sbc.su.se/~miklos/DAS/</a>   | Cserzo (1997) [97]          |
| TMpred     | <a href="http://www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html">www.ch.embnet.org/software/TMPRED_form.html</a>                 | Hofmann y Stoffel (1993)    |
| TMHMM 2.0  | <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM">www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM</a>   | Krogh et al. (2001) [98]    |
| HMMTOP     | <a href="http://www.enzim.hu/hmmtop/">www.enzim.hu/hmmtop/</a>   | Tusnády y Simon (2001) [99] |
| Phobius    | <a href="http://phobius.sbc.su.se/">phobius.sbc.su.se/</a>   | Käll (2004) [100]           |
| TMDet      | <a href="http://tmdet.enzim.hu/index.php?go=home">tmdet.enzim.hu/index.php?go=home</a>                                       | Tusnády (2005) [101]        |
| PPM server | <a href="http://opm.phar.umich.edu/server.php">opm.phar.umich.edu/server.php</a>   | Pogozheva (2011) [102]      |

#### 4.1.4 Diseño de cebadores

Los cebadores utilizados en este trabajo (Tabla 4-2) fueron diseñados con ayuda de los programas *GeneRunner* [94] y *A Plasmid Editor – ApE* [103]. El diseño de los cebadores incluyeron las siguientes características: longitud entre 18 y 29 nucleótidos, %GC entre 50 y 60 %, T<sub>m</sub> entre 55 y 71 °C, garantizando que la secuencia diana esté solo una vez en el molde, evitando las auto-complementariedades y la formación de dímeros. Adicionalmente se buscó en su extremo (3') la presencia de una G o C, o GC, CC, CG, GG, para evitar la apertura de los extremos e incrementar la eficiencia de anillamiento [104].

Los cebadores usados para las clonaciones dirigidas se diseñaron introduciendo los sitios de restricción adecuados teniendo en cuenta que estuvieran presente en el sitio múltiple de clonación (MCS) del vector y ausentes en el gen clonado. Para el caso de la clonación en vectores de expresión, se tuvo en cuenta que después de la ligación el inserto quedara en marco de lectura apropiada para la expresión de la proteína recombinante. El sitio de restricción en los cebadores se encuentra su extremo 5', pero para mejorar la eficiencia de digestión por parte de la enzima de restricción se adicionaron cuatro T en este mismo extremo, para que la diana de restricción quedara más lejos del extremo del cebador. En el anexo A, se muestran los mapas de los vectores usados en el presente estudio, y la lista de cebadores utilizados en el estudio se muestra en la Tabla 4-2.

**Tabla 4-2:** Cebadores utilizados en el estudio. Para amplificación del gen *ctpA* y su clonación en vectores de expresión, construcción del AES y PCR de confirmación.

| Nombre   | Secuencia 5'-3' (sitio de restricción subrayado) | Sitio de restricción | Función                                 |
|--|--|----------------------|---|
| <b>Cebadores para la construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpA</b> |  |                      |   |
| ctpA sm dir  | TGAGGTGAGTAATTTGGTC                              | ----                 | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| ctpA sm rev  | CACGCGGATTTTGACTC                                | ----                 | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| ctpA pET dir   | TTTTCTCGAGATGACGACGGCCGTGACC                     | XhoI                 | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| ctpA pET rev   | TTTTGGATCCGCCCGACAACGCATCACG                     | BamHI                | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| ctpA pMV dir   | TTTTGGATCCGATGACGACGGCCGTGACC                    | BamHI                | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| ctpA pMV rev   | TTTTGAATTCTGATCGGCGCGGTCTCTGG                    | EcoRI                | Amplificar el gen <i>ctpA</i>           |
| <b>Cebadores para la obtención del AES de ctpA</b>                                   |  |                      |   |
| Aol ctpA   | ACTACGGCACCATCCTGACC                             | ----                 | Amplificar sección ABol                 |
| Bol ctpA   | CGGCAGCTTGTTGAGGGTCG                             | ----                 | Amplificar sección ABol                 |
| Col ctpA   | TTTTCTAGATCTCATCGTTCTTCGTGG                      | XbaI                 | Amplificar sección CDol                 |
| Dol ctpA   | TTTTAAGCTTCGATGACCTGGCGACGTTGG                   | HindIII              | Amplificar sección CDol                 |
| Eol ctpA   | GACCCTCAACAAGCTGCCGGCTGCAGGTCGTCGAGGTCC          | ----                 | Amplificar sección DEol                 |
| Up ctpA dir  | TTTTCTAGGACTACGGCACCATCCTGACC                    | AvrII                | Amplificar sección A                    |
| Up ctpA rev  | TTTTGGTACCCCGGCAGCTTGTTGAGG                      | KpnI                 | Amplificar sección A                    |
| Down ctpA dir  | TTTTCTCGAGTCTCATCGTTCTTCGTGG                     | XhoI                 | Amplificar sección B                    |
| Down ctpA rev  | TTTTAAGCTTCGATGACCTGGCGACGTTGG                   | HindIII              | Amplificar sección B                    |
| <b>Cebadores para la comprobación de clonaciones</b>                                 |  |                      |   |
| RT ctpA dir  | GACCACCTCGACGTTGTACC                             | ----                 | Comprobación <i>ctpA</i>                |
| RT ctpA rev  | CAAGCTGTTTGAGACCACGA                             | ----                 | Comprobación <i>ctpA</i>                |
| Hyg dir out  | ACTTCGAGGTGTTGAGGAG                              | ----                 | Comprobación cassette Hyg <sup>R*</sup> |
| Hyg inv out  | AATTCCTGGTCGTTCCGCAG                             | ----                 | Comprobación cassette Hyg <sup>R*</sup> |
| Tm903 A  | CTCGTGAAGAAGGTGTTGCT                             | ----                 | Comprobación cassette Km <sup>R</sup>   |
| Tm903 B  | CCGACCATCAAGCATTTTAT                             | ----                 | Comprobación cassette Km <sup>R</sup>   |
| PMV comp up  | CAGCGAGGACAACCTTGAGC                             | ----                 | Comprobación en pMV261                  |

|                     |                      |       |                           |
|---------------------|----------------------|-------|---------------------------|
| PMV<br>comp<br>down | TATTTGATGCCTGGCAGTCG | ----- | Comprobación<br>en pMV261 |
| T7                  | TAATACGACTCACTATAGGG | ----- | Comprobación<br>en pET302 |
| PET<br>comp<br>down | TAGTTATTGCTCAGCGGTGG | ----- | Comprobación<br>en pET302 |

\*Cebadores facilitados por el laboratorio de genética de micobacterias (Universidad de Zaragoza-España)

➤ **Cebadores usados para la construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpA:**

Los cebadores utilizados para amplificar el gen *ctpA* se diseñaron a partir de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv [92]. Se utilizó una estrategia de doble amplificación, primero utilizando una pareja de cebadores externos (*ctpA* sm dir y *ctpA* sm rev) totalmente complementarios a la secuencia del genoma, para a partir del amplímero obtenido utilizar una pareja de cebadores internos que crearán los sitios de restricción para la clonación dirigida individualmente en los vectores pMV261 y pET302. Los cebadores *ctpA* PMV dir y *ctpA* PMV rev crean los sitios BamHI y EcoRI, adecuados para la clonación en pMV261, mientras que los cebadores *ctpA* PET dir y *ctpA* PET rev crean los sitios XhoI y BamHI para la clonación en pET302.

➤ **Cebadores para la obtención del AES de *ctpA*:**

Para la obtención del AES por la doble clonación en sistema pYUB854, se diseñaron cebadores para amplificar secciones de aproximadamente 500 bp corriente arriba y abajo del gen *ctpA* (Figura 4-1a), con sitios de restricción adecuados para la clonación dirigida dentro de los MCS I (Up *ctpA* dir y rev; AvrII y KpnI) y MCS II (Down *ctpA* dir y rev; XhoI y HindIII) del vector pYUB854, cuyo mapa se muestra en el Anexo A. Para la obtención del AES por PCR solapante los cebadores que se diseñaron se representan en la Figura 4-1b. Para la región corriente arriba de *ctpA* se diseñaron un par de cebadores totalmente complementarios sin sitios de restricción (Aol *ctpA* y Bol *ctpA*) y para la región corriente abajo se diseñaron cebadores para una clonación dirigida entre los sitios XbaI y HindIII del vector pDH- Hyg<sup>R</sup> (Col *ctpA* y Dol *ctpA*). Finalmente, el cebador Eol *ctpA* de 39 nt, base de la PCR solapante, tiene su extremo 5' complementario al cebador Bol *ctpA* y su extremo 3' idéntico a los primeros 18 nt del cassette de resistencia a higromicina (Hyg).

➤ **Cebadores para comprobación de clonaciones:**

Estos cebadores se diseñan para identificar insertos dentro de los vectores, por ello se diseñan totalmente complementarios a secuencias corriente arriba y abajo de los MCS, o dentro de marcadores de selección como los cassettes de resistencia a antibióticos. Lo ideal son productos de máximo 1000 bp.

## 4.2 Componente de biología molecular

Los procedimientos experimentales que hacen parte de la investigación son descritos en detalle en los protocolos del Anexo B.

### 4.2.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo (Tabla 4-3) se conservaron como stocks glicerizados a -80 °C. Las cepas de micobacterias fueron revisadas con regularidad usando la tinción de Ziehl-Neelsen (Protocolo 1).

Las cepas de *E.coli* fueron cultivadas con agitación en medio Luria-Bertani (LB) caldo o agar, a 37°C durante 12-24 h. Aquellas que contenían plásmidos fueron puestas en este medio suplementado con el antibiótico de selección apropiado en las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Hyg 60 µg/mL (los medios sólidos se hacen sin NaCl) y kanamicina (Km) 25 µg/mL. En los ensayos que se utilizaba la selección blanco-azul por acción de la β-galactosidasa, los medios de cultivo se suplementaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal a 80 µg/mL) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG a 0,5 mM).

Las cepas de micobacterias se cultivaron en medio Middlebrook 7H9-ADC a 37°C sin agitación, durante 4-5 semanas para bacterias de crecimiento lento y una semana para *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. La cepa virulenta de referencia *M. tuberculosis* H37Rv se manipuló en condiciones de bioseguridad tipo III. En ocasiones se usó medio Middlebrook 7H9-ADC con: Amp (50 µg/mL), Hyg (50 µg/mL), Km (20 µg/mL), ácido oleico (50 µg/mL) y Tween80 (0,05%).

**Tabla 4-3:** Cepas bacterianas utilizadas a lo largo de este estudio.

| Cepa                                    | Características <sup>1</sup>  | Referencia/fuente       |
|---|---|-------------------------|
| <b><i>E. coli</i></b>                   |   |                         |
| <i>E. coli</i> BL21 (DE3)               | Expresión de proteínas inducidas por IPTG (no expresa proteasas lon y ompT)   | ATCC catalog [105]      |
| <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$             | RecA <sup>-</sup> , endA <sup>-</sup> , permite selección Blanco/Azul sin necesidad de IPTG   | Life Technologies [106] |
| <i>E. coli</i> HB101                    | str <sup>R</sup> , RecA <sup>-</sup> , endA <sup>+</sup> , actividad $\gamma\delta$ negativa  | ATCC catalog [105]      |
| <i>E. coli</i> XL1 blue                 | tet <sup>R</sup> , RecA <sup>-</sup> , endA <sup>-</sup> , permite selección Blanco/Azul  | Stratagene              |
| <b><i>M. smegmatis</i></b>              |   |                         |
| <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 | Micobacteria no patógena de crecimiento rápido, amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup>                                   | Snapper, 1993 [107]     |
| <b><i>M. tuberculosis</i></b>           |   |                         |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra            | Micobacteria avirulenta de referencia de crecimiento lento, amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup>                       | Zheng, 2008 [108]       |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra: pJV53     | Cepa de recombinería (transformada con el plásmido pJV53) amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup>       | Presente estudio        |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Ra: pLAM12    | Cepa control negativo de recombinería (transformada con pLAM12) amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup> , Km <sup>R</sup> | Presente estudio        |
| <i>M. tuberculosis</i> H37Rv*           | Micobacteria virulenta de referencia de crecimiento lento, amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup>                        | Cole, 1998 [109]        |

<sup>1</sup>Abreviaturas: RecA-Recombinasa; endA-endonucleasa; str-estreptomycin; chx-cicloheximida; cb-carbenicilina; tet-tetraciclina.

\*Por la patogenicidad de la cepa H37Rv su manipulación se hizo en cabinas de bioseguridad tipo III.

## 4.2.2 Construcción de recombinantes de sobreexpresión de CtpA

La Tabla 4-4 contiene todos los plásmidos construidos y usados en el presente trabajo. El gen *ctpA* fue clonado inicialmente en el vector de clonación pGEM-T easy, para facilitar la posterior construcción de los recombinantes de sobreexpresión usando los plásmidos pET302 y pMV261. Todos los fragmentos de DNA se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 0,7-2 % en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) y visualizados por tinción con bromuro de etidio (protocolo 2).

### 4.2.2.1 Clonación del gen *ctpA* en el vector tipo T pGEM-T easy (construcción de pALT1)

Esta clonación hace parte inicial de la estrategia de PCR anidada (Figura 5-5a), la que facilitó la obtención de amplímeros con sitios de restricción para una posterior clonación dirigida en los vectores de expresión.

**Tabla 4-4:** Plásmidos usados en el estudio. Los MCSs y mapas de los vectores se muestran en el anexo B.

| Plásmidos construidos por otros                                 |   |     |                                   |                       |  |
|---|---|-----|-----------------------------------|-----------------------|--|
| Nombre  | Características   | Ori | Resistencia                       | Referencia/Fuente     |  |
| pGEM-T Easy   | Vector para clonación tipo T de fragmentos de PCR   | E   | Amp <sup>R</sup>                  | Promega               |  |
| pMV261  | Vector lanzadera <i>E. coli</i> – Micobacteriano, expresión en micobacterias, promotor hsp60                        | E,M | Km <sup>R</sup>                   | [111]                 |  |
| pLNA1   | Recombinante de expresión de MgtC usando como vector pMV261 clonado entre los sitios BamHI y EcoRI                  | E,M | Km <sup>R</sup>                   | [91]                  |  |
| pET302  | Vector de expresión con His-Tag en N-terminal, promotor T7  | E   | Amp <sup>R</sup>                  | Invitrogen            |  |
| pLAM12  | Derivado de pJL37 sin promotor hsp60, promotor acetamidasa  | M   | Km <sup>R</sup>                   | [83], Unizar*         |  |
| pJV53   | Genes 60 y 61 de Che9c clonado en el vector pLAM12, promotor acetamidasa  | M   | Km <sup>R</sup>                   | [83], Unizar*         |  |
| pYUB854   | Vector obtener el AES por doble clonación. Cassette Hyg <sup>R</sup> flanqueado por MCSs y $\gamma\delta$ resolvasa | E   | Hyg <sup>R</sup>                  | [85], Unizar*         |  |
| pDH5-Hyg <sup>R</sup>   | Vector para la construcción del AES por PCR solapante   | E   | Hyg <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> | Unizar*               |  |
| Plásmidos construidos durante el desarrollo de la investigación |   |     |                                   |                       |  |
| Nombre  | Inserto   | Ori | Resistencia                       | Esqueleto             |  |
| pALT1   | Gen <i>ctpA</i> sin sitios de restricción   | E   | Amp <sup>R</sup>                  | pGEM-T Easy           |  |
| pALT2   | Gen <i>ctpA</i> con sitios BamHI y XhoI   | E   | Amp <sup>R</sup>                  | pGEM-T Easy           |  |
| pALT3   | Sección CDol del gen <i>ctpA</i> entre XbaI y HindIII   | E   | Hyg <sup>R</sup> Amp <sup>R</sup> | pDH5-Hyg <sup>R</sup> |  |
| pALT4   | Gen <i>ctpA</i> clonado entre los sitio BamHI y EcoRI   | E,M | Km <sup>R</sup>                   | pMV261                |  |
| pALT5   | Sección B del gen <i>ctpA</i> entre XhoI y HindIII  | E   | Hyg <sup>R</sup>                  | pYUB854               |  |
| pALT6   | Sección A del gen <i>ctpA</i> entre XhoI y HindIII  | E   | Hyg <sup>R</sup>                  | pALT5                 |  |
| pALT7   | Gen <i>ctpA</i> entre BamHI y XhoI  | E   | Amp <sup>R</sup>                  | pET302                |  |

\*Unizar: regalo del laboratorio de genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza - España

#### ➤ Amplificación de gen *ctpA* por PCR:

La amplificación del gen *ctpA* se hizo mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando los cebadores *ctpA* sm dir y *ctpA* sm rev (Tabla 4-2) utilizando como molde DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv aislado por el método CTAB-NaCl (Protocolo 3 y 4). Para el control negativo de la PCR se utilizó una reacción sin DNA. El



fragmento se amplificó usando la enzima Amplitaq Gold polimerasa (Applied Biosystems) utilizando las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 4-5. El producto obtenido de PCR fue purificado con el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, USA) siguiendo las especificaciones del proveedor.

➤ **Ligación del producto de PCR con el vector de clonación pGEM-T Easy:**

La ligación entre el producto de PCR del gen *ctpA* y el vector pGEM-T Easy se hizo con la enzima T4 DNA Ligasa, siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega, USA). Se utilizaron 20 fmoles de vector y 10 fmoles de inserto. La reacción se llevó a cabo a 4 °C durante toda la noche.

➤ **Transformación del producto de ligación y selección de colonias recombinantes:**

El producto de ligación fue transformado por electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* DH5 $\alpha$  preparadas según el Protocolo 5 y 6. La selección de recombinantes se hizo sobre placas de LB agar suplementadas con Amp y X-Gal. Las colonias de color blanco, que se espera sean recombinantes, se confirmaron por PCR de colonia usando cebadores RT *ctpA* dir y RT *ctpA* rev, complementarios al inserto clonado en el vector. Las colonias positivas se sometieron a extracción de plásmido (Protocolo 7) y posterior confirmaron por digestión con NotI (Protocolo 8).

#### **4.2.2.2 Clonación del gen *ctpA* en el vector de expresión de micobacterias pMV261 (construcción de pALT4)**

Para la clonación y expresión de CtpA se utilizó la siguiente metodología:

➤ **Amplificación del gen *ctpA* introduciendo los sitios de restricción BamHI y EcoRI:**

Para la amplificación de *ctpA* introduciendo los sitios de restricción BamHI y EcoRI se utilizaron los cebadores *ctpA* PMV dir y *ctpA* PMV rev usando como molde el plásmido pALT1 (construido anteriormente). Como controles negativos se usaron una reacción sin polimerasa y otra sin DNA. El fragmento fue amplificado utilizando la enzima Dream Taq polimerasa (Thermo Scientific), y una vez obtenido el producto de PCR fue purificado con

el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, USA) siguiendo las especificaciones del proveedor.

**Tabla 4-5:** Condiciones de las PCR realizadas en el presente estudio.

| Producto   | Molde           | Cebadores                        | Denat.<br>Inicial | Ciclos (C)      |                 |                         | #C | Elong.<br>Final  |
|--|-----------------|----------------------------------|-------------------|-----------------|-----------------|-------------------------|----|------------------|
|  |                 |                                  |                   | Denat.          | Anilla.         | Elong.                  |    |                  |
| <b>Construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpA</b> |                 |                                  |                   |                 |                 |                         |    |                  |
| ctpA sm  | DNA<br>H37Rv    | ctpA sm dir-<br>ctpA sm rev      | 94°C x<br>10 min  | 94°C x<br>1 min | 55°C x<br>1 min | 72°C x<br>3 min         | 35 | 72°C x<br>10 min |
| ctpA pET   | pALT1           | ctpA pET dir-<br>ctpA pET rev    | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 64°C x<br>1 min | 72°C x<br>3 min         | 35 | 72°C x<br>10 min |
| ctpA pMV   | pALT1           | ctpA pMV dir-<br>ctpA pMV rev    | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 64°C x<br>30 s  | 72°C x<br>3 min         | 35 | 72°C x<br>10 min |
| <b>Obtención del AES de ctpA</b>                                   |                 |                                  |                   |                 |                 |                         |    |                  |
| A ctpA   | DNA<br>H37Rv    | Up ctpA dir-Up<br>ctpA rev       | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| B ctpA   | DNA<br>H37Rv    | Down ctpA dir-<br>Down ctpA rev  | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| AES  | pALT6           | Down ctpA dir-<br>Up ctpA rev    | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| ABol ctpA  | DNA<br>H37Rv    | Aol ctpA-<br>Bol ctpA            | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| CDol ctpA  | DNA<br>H37Rv    | Col ctpA- Dol<br>ctpA            | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| DEol ctpA  | pALT3           | Dol ctpA-<br>Eol ctpA            | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>30 s  | 58°C x<br>30 s  | 72°C x<br>3 min         | 35 | 72°C x<br>10 min |
| <b>Comprobación de clonaciones</b>                                 |                 |                                  |                   |                 |                 |                         |    |                  |
| ctpA   | pALT1<br>pALT2  | RT ctpA dir-<br>RT ctpA rev      | 95°C x<br>10 min  | 95°C x<br>30 s  | 60°C x<br>30 s  | 72°C x<br>30 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| pMV261:ctpA  | pALT4           | RT ctpA dir-<br>PMV comp<br>down | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| Km <sup>R</sup>  | pMV261<br>pALT4 | Tm903 A-<br>Tm903 B              | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| pET302:ctpA  | pALT7           | RT ctpA dir-<br>PET comp down    | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| pDH5Hyg:CDol   | pALT3           | Hyg dir out-<br>Dol ctpA         | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| pYUB854:B  | pALT5           | Hyg dir out-<br>Down ctpA dir    | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>45 s          | 35 | 72°C x<br>10 min |
| pALT5:A  | pALT6           | Hyg inv out-<br>Up ctpA rev      | 94°C x<br>9 min   | 94°C x<br>1 min | 58°C x<br>1 min | 72°C x<br>1 min<br>30 s | 35 | 72°C x<br>10 min |

**Dent.** Denaturación; **Anilla.** Anillamiento; **Elong.** Elongación.

➤ **Digestión doble BamHI y EcoRI del amplímero del gen *ctpA* y el vector pLNA1:**

El plásmido recombinante pLNA1 contiene el gen *mgtC* clonado entre los sitios BamHI y EcoRI del vector pMV261; al hacer la doble digestión con estas enzimas se libera el inserto del gen *mgtC* y el vector pMV261 queda listo para la clonación del gen *ctpA* entre los mismos sitios de restricción. Las condiciones de la digestión doble se diseñaron utilizando la herramienta Doubledigest de Thermo Scientific [110], usando en la reacción el buffer BamHI 1X y el doble de cantidad de EcoRI en relación con BamHI. La reacción de digestión se realizó a 37 °C durante 2 h. La misma digestión también se hizo sobre el amplímero del gen *ctpA* obtenido por PCR, el que se obtuvo flanqueado por los sitios de restricción BamHI y EcoRI. Ambos productos de digestión fueron purificados.

➤ **Defosforilación de pMV261:**

El vector pMV261 cortado con BamHI y EcoRI se defosforiló utilizando fosfatasa alcalina termosensible FastAP de Thermo Scientific. Se utilizó 1 U de enzima siguiendo las indicaciones del fabricante (Protocolo 9); la reacción enzimática se llevó a cabo a 37 °C durante 15 min, y la enzima se inactivó al final a 75 °C durante 5 min. Una vez defosforilado, el plásmido se purificó finalmente con el kit *QIAquick Gel Extraction* (Qiagen, USA) siguiendo las especificaciones del proveedor.

➤ **Ligación de pMV261 con *ctpA*:**

La ligación entre el producto de digestión doble BamHI y EcoRI del amplímero del gen *ctpA* y el vector pMV261 cortado con las mismas enzimas de restricción y defosforilado, se realizó con la enzima T4 DNA Ligasa (Thermo Scientific), usando 1 U en la mezcla de reacción y suplementando con ATP a una concentración final de 0,5 mM (Protocolo 10). Se usó una relación molar de vector e inserto de 1:2 (partiendo de 20 fmoles de vector), se hicieron controles negativos de digestión, ligación e inserto, en donde las mezclas de reacción solo contenían vector, vector con ligasa e inserto, respectivamente. La reacción se llevó a cabo en dos pasos de temperatura: a 22 °C durante 2 h y luego a 20 °C durante 15 min. El tiempo de reacción se aumentó para favorecer la formación del recombinante esperado. Finalmente, el producto de ligación fue analizado por PCR usando el juego de cebadores RT *ctpA* dir y PMV comp down, y como control negativo se usó la reacción de ligación que solo contenía el vector digerido con ligasa.

➤ **Transformación del producto de ligación y selección de colonias recombinantes:**

Los productos de ligación se transformaron por electroporación en células electrocompetentes de *E. coli* BL21 (DE3) (Protocolo 6). Los recombinantes fueron seleccionados sobre placas de LB agar suplementadas con Km 25 µg/mL. Las colonias se confirmaron por PCR de colonia usando el juego de cebadores RT ctpA dir y PMV comp down que son complementarios al inserto y al vector, respectivamente (Protocolo 4). Las colonias positivas se sometieron a extracción de plásmido (Protocolo 7) y se confirmaron mediante la digestión con la enzima de restricción XhoI (Protocolo 8).

➤ **Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT4:**

El mapeo de restricción se hizo a los plásmidos extraídos de las colonias positivas obtenidas mediante tamizaje por PCR, y confirmadas parcialmente mediante digestión con XhoI. Para el mapeo se hizo una digestión en reacciones separadas con las enzimas de restricción NdeI y NheI, y digestión doble con BamHI y EcoRI (Protocolo 8). Finalmente el plásmido de una colonia considerada positiva fue extraído con el kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axygen) para su secuenciación y transformación en cepas de micobacterias.

➤ **Transformación del plásmido recombinante pALT4 en micobacterias:**

La transformación de pALT4 se hizo por electroporación en células electrocompetentes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Ra (Protocolo 5 y 6). Adicionalmente, se transformó pMV261 y se hizo controles de células. Los recombinantes de *M. smegmatis* fueron seleccionados sobre placas de LB agar suplementadas con Km 25 µg/mL y *M. tuberculosis* sobre placas de 7H9-ADC agar suplementadas con el mismo antibiótico.

➤ **Comprobación de cepas de micobacterias transformadas con pALT4 por PCR de colonia:**

Se seleccionaron 3 colonias producto de la transformación del plásmido pALT4 en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, las que se cultivaron en medio líquido LB suplementado con Km. Luego se hizo PCR de hervido (Protocolo 4) utilizando los mismos cebadores usados para la confirmación del recombinante pALT4 (RT ctpA dir y PMV comp down), además se amplificó un segmento cassette de Km usando los cebadores Tm903 A y Tm903 B.

Para *M. tuberculosis* H37Ra se seleccionaron 8 colonias producto de la transformación y fueron analizadas del mismo modo.

➤ **Sobreexpresión de la proteína CtpA:**

Al utilizar el vector de expresión pMV261 que contiene el promotor *hsp60*, la expresión de la proteína recombinante CtpA se indujo cultivando las micobacterias a 45°C, según se describe en el Protocolo 11. La expresión de la proteína se analizó mediante electroforesis denaturante de poliacrilamida (SDS-PAGE) (Protocolo 12) a partir de los lisados celulares obtenidos luego de la inducción (Protocolo 11). El recombinante de interés seleccionado se utilizó para analizar la actividad ATPasa específica estimulada por metales pesados, y ensayos de toxicidad de células completas a la presencia de metales pesados.

#### **4.2.2.3 Clonación del gen *ctpA* en el vector de expresión de *E. coli* pET302 (construcción de pALT7)**

La clonación se hizo para obtener el recombinante de expresión de CtpA en *E. coli*, siguiendo la siguiente metodología:

➤ **Amplificación y clonación en el vector pGEM-T easy, del gen *ctpA* flanqueado por los sitios de restricción XhoI y BamHI (construcción de pALT2):**

La PCR para amplificar el gen *ctpA* flanqueado por los sitios de restricción XhoI y BamHI se hizo con los cebadores *ctpA* PET dir y *ctpA* PET rev y utilizando como el plásmido pALT1 (construido anteriormente). El control negativo fue una reacción sin polimerasa. El fragmento fue amplificado utilizando la Dream Taq polimerasa (Thermo Scientific) siguiendo el Protocolo 4. El producto de PCR fue purificado y clonado en el vector pGEM-T easy usando la misma metodología para la construcción de pALT1. Las colonias recombinantes fueron confirmadas por PCR usando el juego de cebadores RT *ctpA* dir y RT *ctpA* rev. El plásmido recombinante (pALT2) fue analizado por mapeo de restricción con XhoI, BamHI, EcoRI, PvuII y NotI.

➤ **Clonación de *ctpA* en pET302:**

Para la clonación de *ctpA* en pET302 se hizo inicialmente una doble digestión con XhoI y BamHI de los plásmidos pALT2 y pET302, usando las condiciones de la digestión sugeridas por el programa DbleDigest de Thermo Scientific [110]. Ambos productos de digestión fueron purificados y ligados como en la construcción de pALT4. El producto de ligación fue evaluado por PCR usando los cebadores RT *ctpA* dir y PET comp down. Una vez confirmado se procedió a transformar la ligación en cepas de *E. coli* BL21 electrocompetentes y termocompetentes (Protocolo 6).

### 4.2.3 Construcción del sustrato de intercambio alélico (AES) de *ctpA*

En la construcción del sustrato de intercambio alélico (AES), que se utilizará para producir una mutación defectiva en el gen *ctpA* de *M. tuberculosis* H37Ra mediante la técnica de recombinación [83], se amplificaron segmentos génicos de aproximadamente 500 bp conformados por secuencias que flanquean el gen *ctpA* de *M. tuberculosis* corriente arriba y abajo. Los cebadores empleados se especifican en la Tabla 4-2.

Para la construcción del AES de *ctpA* se usó como marcador de selección un cassette de resistencia a Hyg (Hyg<sup>R</sup>). La construcción se buscó siguiendo dos estrategias, como se ilustra en la Figura 4-1:

1) Doble clonación de las regiones flanqueantes del gen *ctpA* en el vector pYUB854 (mostrado en Figura A3 de los anexos) que posee un cassette Hyg<sup>R</sup> flanqueado por sitios  $\gamma\delta$  resolvasa y MCSs. En la obtención del AES por este método fue necesario producir los plásmidos pALT5 y pALT6, donde el primero es la clonación de la sección corriente abajo del gen *ctpA* entre los sitios XhoI y HindIII del vector pYUB854 y el segundo la clonación de la sección corriente arriba del gen *ctpA* entre los sitios AvrII y KpnI del plásmido construido pALT5.

2) PCR solapante, en la que dos moldes que comparten secciones homólogas en sus extremos se solapan y se completan las cadenas por acción de la DNA polimerasa, obteniendo el amplímero deseado. Para llevar a cabo la PCR solapante se necesitó construir el plásmido pALT3, clonando la sección corriente abajo del gen *ctpA* entre los

sitios XbaI y HindIII del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup> (Figura A3 de los anexos), ubicando dicha sección adyacente al cassette de resistencia a Hyg.

#### **4.2.3.1 Clonación de la sección corriente abajo del gen *ctpA* en el plásmido pYUB854 (construcción de pALT5)**

La PCR para amplificar la sección B del gen *ctpA* (región corriente abajo) flanqueada por los sitios de restricción XhoI y HindIII se hizo con los cebadores Down *ctpA* dir y Down *ctpA* rev usando como molde DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y la enzima Amplitaq Gold polimerasa (Applied Biosystems). La digestión doble del producto de PCR y el vector pYUB854 se hizo en Buffer R 1X de Thermo Scientific y una relación de enzimas 1:1. La ligación se hizo usando tres relaciones molares de vector e inserto (1:1; 1:3 y 1:5), estos productos se confirmaron por PCR usando los cebadores Hyg dir out y Down *ctpA* dir. La transformación se realizó en células electrocompetentes de *E. coli* HB101, haciendo la selección de recombinantes en medio sólido LB sin NaCl suplementado con Hyg 50 µg/mL. Las colonias recombinantes fueron confirmadas por PCR usando el mismo juego de cebadores de confirmación del producto de ligación y el plásmido recombinante pALT5 fue confirmado por digestión con EcoRI y PCR. Finalmente pALT5 fue analizado por mapeo de restricción con la digestión doble HindIII-XhoI, y la digestión sencilla con las enzimas AvrII y KpnI.

#### **4.2.3.2 Clonación de la sección corriente arriba del gen *ctpA* en el plásmido pALT5 (construcción de pALT6) y obtención del AES**

La sección A del gen *ctpA* (corriente arriba) flanqueada por los sitios de restricción AvrII y KpnI se amplificó por PCR con los cebadores Up *ctpA* dir y Up *ctpA* rev, usando como molde DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y la Amplitaq Gold polimerasa (Applied Biosystems). El producto de PCR y pALT5 se cortaron con las dos enzimas de restricción usando las condiciones sugeridas por el programa DbleDigest de Thermo Scientific [110]. La ligación se hizo usando tres relaciones molares de vector e inserto (1:1; 1:3 y 1:5), los productos se confirmaron por PCR usando los cebadores Hyg inv out y Up *ctpA* rev. El mismo producto de ligación fue usado como molde para amplificar el AES completo usando los cebadores Down *ctpA* dir y Up *ctpA* rev, en este caso se usó la enzima Dream Taq Polimerasa (Thermo Scientific).

#### 4.2.3.3 Clonación de la sección corriente abajo del gen *ctpA* en el plásmido pDH5-Hyg<sup>R</sup> (construcción de pALT3)

La PCR para amplificar la sección CDol el gen *ctpA* (corriente abajo del gen) flanqueada por los sitios de restricción XbaI y HindIII se hizo con los cebadores Col *ctpA* y Dol *ctpA* usando como molde DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y la enzima Amplitaq Gold polimerasa (Applied Biosystems). El producto de PCR y el plásmido pDH5-Hyg<sup>R</sup> fueron sometidos a una digestión doble con XbaI y HindIII usando la condiciones sugeridas por el programa Doubledigest de Thermo Scientific [110].

Los productos de digestión se purificaron y se ligaron utilizando la T4 DNA ligasa y relaciones molares entre el vector e inserto de 1:3 y 1:5. Los productos de la reacción de ligación fueron transformados por electroporación en células competentes de *E. coli* DH5 $\alpha$ . Haciendo una selección de recombinantes sobre placas de LB agar suplementadas con Amp 100  $\mu$ g/mL; las colonias positivas se determinaron por PCR con el juego de cebadores Hyg dir out y Dol *ctpA* (Este producto de PCR fue digerido con XbaI). Una vez confirmado se procedió a amplificar el segmento DEol con los cebador Dol *ctpA* y Eol *ctpA*.

#### 4.2.4 Obtención de la cepa de Recombinería de *M. tuberculosis* H37Ra

Siguiendo el esquema general de la técnica de recombinería (Figura 4-1) una vez obtenido el AES del gen *ctpA* es necesario construir la cepa de recombinería, para ello se transforma por electroporación a *M. tuberculosis* H37Ra con el plásmido pJV53 que permite la expresión de las proteínas Gp60 y Gp61 del micobacteriófago Che9c bajo el estricto control del promotor acetamidasa (Figura 4-1c) [83].

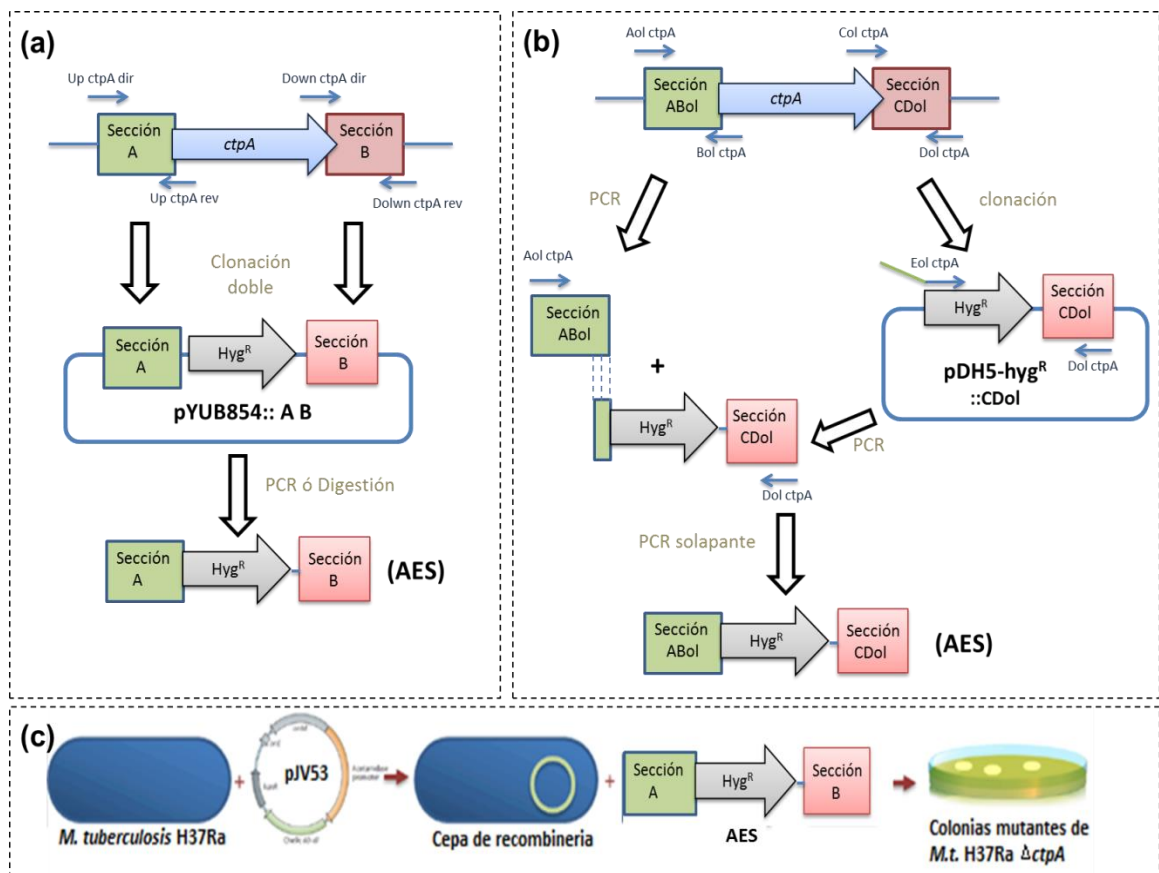
Luego de la transformación se seleccionaron las colonias transformantes por PCR en colonia usando los cebadores Tm903 A y Tm903 B que amplifican un fragmento de 846 pb correspondiente a una parte del cassette de resistencia a Km. Como control de transformación se usó el vector esqueleto pLAM12 sobre el cual se construyó pJV53.

La expresión de las proteínas de recombinería es inducida con acetamida, que funciona como fuente de carbono del medio de cultivo [83]. El medio de cultivo de la cepa de recombinería usado para preparar las células competentes para la transformación del



AES, se llama medio de inducción. Este, contiene succinato en lugar de ADC, el cual puede interferir en la expresión de las funciones de recombinería [88].

**Figura 4-1:** Esquema general de la técnica de recombinería usada para la construcción de la cepa mutante *M. tuberculosis* H37Ra  $\Delta$ *ctpA*. La primera parte de la técnica es la obtención del AES, que se hizo mediante dos metodologías diferentes **(a)** la clonación doble de los segmentos corriente arriba y abajo del gen *ctpA* en el vector pYUB854 y posterior liberación del AES por digestión o PCR. **(b)** PCR solapante: la sección B (corriente abajo) es clonada en el vector pDH5-Hyg<sup>R</sup> obteniendo el plásmido pALT3, que se usa como molde para una PCR con los cebadores Dol *ctpA* y Eol *ctpA*, generando el fragmento DEol *ctpA* que comparte en un extremo homología con la sección A (corriente arriba). La PCR solapante cuyo amplímero el AES, usa la sección A y el amplímero DEol como moldes y los cebadores Aol *ctpA* y Dol *ctpA*. **(c)** La cepa de recombinería se obtiene con la transformación de la cepa silvestre *M. tuberculosis* H37Ra con el plásmido pJV53 que posteriormente se transforma con el AES para obtener el mutante defectivo en el gen *ctpA*.



## 4.3 Componente bioquímico

Los ensayos de este componente bioquímico se hacen con el fin de describir el transporte iónico de CtpA cuando se sobreexpresa heterológicamente en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

### 4.3.1 Ensayos de toxicidad frente a metales pesados

Los ensayos de toxicidad consisten en determinar cómo el crecimiento celular se ve afectado cuando este se encuentra en presencia de diferentes concentraciones de un metal pesado. El análisis se realizó siguiendo el Protocolo 13, el que evalúa el crecimiento celular mediante cambios en las medidas de absorbancia a 595 nm. Los iones metálicos usados en este análisis fueron Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>.

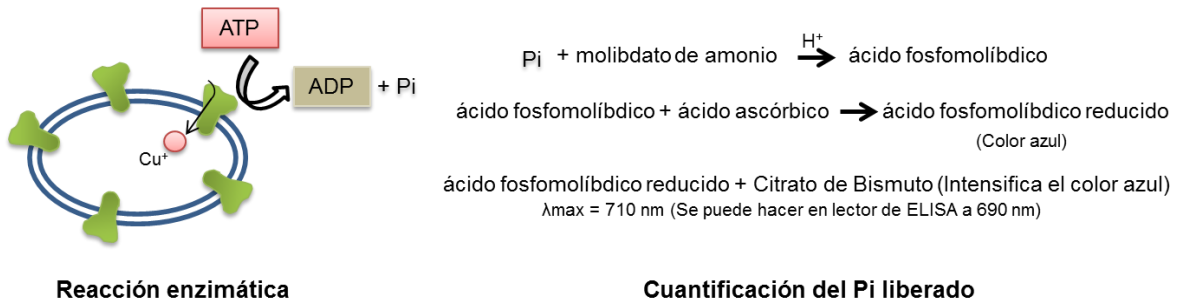
El experimento se realizó en placas de 96 pozos, haciendo diluciones seriadas a la mitad de la concentración de cada ion a lo largo de cada columna. En el experimento se usó un rango amplio de concentraciones para todos los iones: Cu<sup>2+</sup> entre 4 y 0,125 mM, Co<sup>2+</sup> entre 12 y 0,375 mM, Mn<sup>2+</sup> entre 4 y 0,125 mM, Ni<sup>2+</sup> entre 12 y 0,375 mM y Zn<sup>2+</sup> entre 4 y 0,125 mM. Se evaluaron tres cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155: cepa silvestre, cepa transformada con pMV261 y con pALT4.

### 4.3.2 Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados

Los ensayos de actividad ATPasa se hicieron sobre vesículas de membrana plasmática extraídas de tres cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155: silvestre, transformada con pMV261 y transformada con pALT4; la extracción membrana se hizo siguiendo el protocolo 14 y 15. El ensayo de actividad consiste en determinar el fosfato (PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> o Pi) que es liberado por la hidrólisis de ATP producto del transporte del ión particular mediado por la ATPasa tipo P<sub>1B</sub>, CtpA, u otra ATPasa afín al ión analizado (Protocolo 16). El Pi liberado se cuantificó siguiendo el método de Fiske-Subbarow [112], el que se modificó haciendo uso de citrato de bismuto que aumenta la sensibilidad del método [113]. La técnica se fundamenta en la reacción del Pi con molibdato en medio ácido para generar ácido fosfomolíbico, luego es reducido por el ácido ascórbico formando el ácido fosfomolíbico reducido que forma un complejo azul cuyo color se intensifica en presencia de bismuto y puede ser leído a 690 nm (Figura 4-2). El bismuto se usa para estabilizar el complejo de ácido

fosfomolibdico reducido y como agente secuestrante del exceso de molibdato, el que previene la reacción del molibdato con Pi liberado por la hidrolisis espontánea del ATP después de la reacción enzimática [113].

**Figura 4-2:** Fundamento de la determinación de la actividad ATPasa mediante la cuantificación del Pi liberado durante el ciclo catalítico de una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P. La Figura izquierda muestra la reacción enzimática realizada sobre vesículas de membranas. El Pi liberado se cuantifica mediante el método de Fiske-Subbarow modificado haciendo uso de citrato de bismuto [113]. En la reacción se forma el ácido fosfomolibdico por la reacción entre el molibdato de amonio y el Pi; este ácido es reducido por acción del ácido ascórbico, generando un color azul el cual se intensifica con bismuto ( $\lambda_{\text{max}}$  710 nm) y puede ser leído espectrofotométricamente a 690nm en placas de ELISA.



Una unidad de actividad ATPasa (U) se define como 1 nmol de Pi liberado en 1 min de reacción (nmol Pi/min), y una unidad de actividad específica como 1 U por cada mg de proteína (nmol Pi/min-mg proteína). En los ensayos de actividad se emplearon los cationes de  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ , para determinar cuál de ellos estimula en mayor magnitud la actividad ATPasa sobre membranas enriquecidas con CtpA. En el medio de reacción enzimática se utilizó el ion metálico en una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , 4  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana, 37°C, pH 7,5 y un tiempo de 30 min.

### 4.3.3 Determinación de condiciones de actividad óptimas de las membranas enriquecidas con CtpA

La actividad enzimática fue evaluada considerando a CtpA como una  $\text{Cu}^+$  ATPasa. Se evaluó el efecto de concentración de proteína, concentración de  $\text{Cu}^+$ , pH y temperatura (Protocolo 17). En todos los casos, se cuantificó la liberación del Pi como se hizo en el ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados y la Unidad enzimática fue definida de la misma forma. En cada condición la actividad ATPasa atribuida a CtpA de *M. tuberculosis* H37Rv se obtuvo restando el valor de la actividad de las vesículas de

membrana de la cepa que contiene pALT4 con la actividad de la cepa transformada con pMV261.

Para evaluar el efecto de concentración de proteína de membrana, la cantidad de proteína añadida a la reacción enzimática varió entre 2 y 10  $\mu\text{g}$ , determinando en cada caso la actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa con 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^+$ , pH 7,9 y 37°C. La determinación del pH óptimo se evaluó en un rango entre 5,9 y 8,7; para pH menores de 7,9 se usó buffer MOPS 100 mM y para pH mayores de 8,2 buffer TRIS 100 mM (las reacciones enzimáticas se hicieron a 37 °C usando 4  $\mu\text{g}$  de proteína y  $\text{Cu}^+$  10  $\mu\text{M}$ ). El efecto de la temperatura fue evaluado a 4, 18, 37 y 60 °C y a pH 7,5 usando 4  $\mu\text{g}$  de proteína y  $\text{Cu}^+$  10  $\mu\text{M}$ . Finalmente, se varió la concentración de  $\text{Cu}^+$  entre 0,01 y 10  $\mu\text{M}$  en la reacción enzimática a pH 7,5, 37°C y 4  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana. Todas las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo durante 30 min y la reacción se detuvo con la adición de la solución reveladora que contiene ácido ascórbico 3%, molibdato de amonio 0,5%, SDS 3% en HCl 0,5 M.

## 5. Resultados y discusión

Los análisis bioinformáticos realizados permitieron sugerir el posible catión transportado por las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> codificadas en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, que a su vez tienen su contraparte en el genoma de todos los miembros del MTBC. Se encontró que este tipo de enzimas son capaces de transportar principalmente Cu<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>.

Aunque la primera parte del estudio bioinformático se realizó para todas las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* H37Rv, posteriormente se hizo mayor énfasis en la proteína CtpA por su importancia en la infección tuberculosa, evidenciado en ensayos de infección *in vivo* en humanos [11]. Logrando demostrar que esta bomba se encarga del transporte de Cu<sup>+</sup> y ayuda al proceso de desintoxicación bacteriana de este metal.

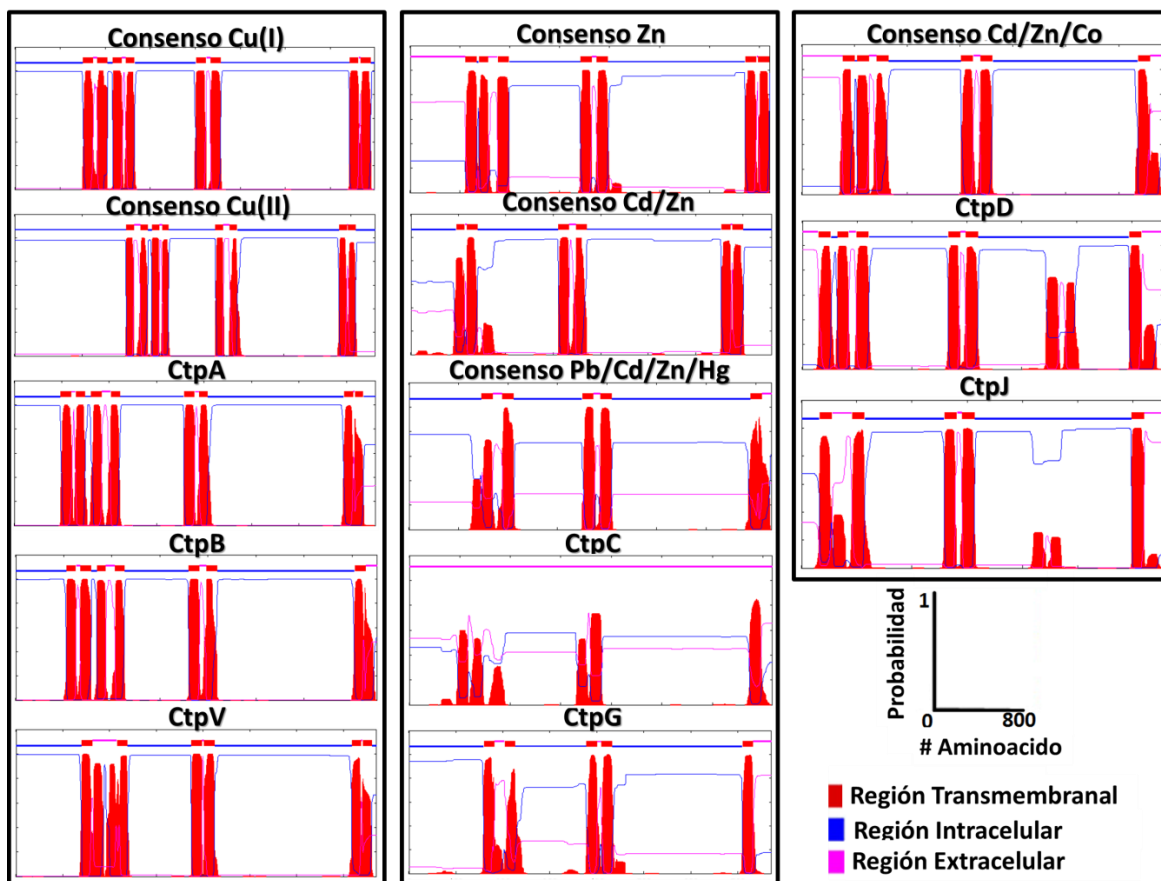
### 5.1 Comparación topológica de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis*

En la Figura 5-1, se muestran los perfiles de hidrofobicidad obtenidos con la herramienta *TMHMM 2.0*. de las diferentes ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* y las secuencias consenso de las bombas cuyo sustrato ha sido determinado experimentalmente. Los perfiles pudieron ser agrupados para hacer una comparación topológica entre estas enzimas [10]. La comparación se hizo por semejanza de las regiones transmembranales entre los perfiles. El análisis permitió determinar que CtpA, CtpB y CtpV tienen un comportamiento parecido al obtenido para las secuencias consenso de Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup> ATPasas tipo P; CtpC y CtpG es comparable con los perfiles obtenidos para las diferentes Zn<sup>2+</sup> ATPasa tipo P; CtpD y CtpJ tiene regiones parecidas al perfil obtenido para el consenso Cd<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> ATPasa tipo P.

Los perfiles de hidrofobicidad de las secuencias consenso Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup> ATPasa tipo P son muy parecidos al comparar solo las regiones transmembranales, pero la posición en la

que aparecen es diferente. Esto se debe principalmente a la longitud de las secuencias, que en el caso la  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P es más corta que la  $\text{Cu}^{2+}$ , 798 y 1072 aminoácidos respectivamente. Para la secuencia consenso de la bomba transportadora de  $\text{Cu}^{2+}$  se tiene una región N-terminal más larga que posiblemente sea asociada con varios MBD [114]. Con lo anterior, al agrupar a CtpA, CtpB y CtpV con estas secuencias consenso se determina que estas bombas transportan Cu, aunque no es posible discriminar entre sus dos estados de oxidación.

**Figura 5-1:** Perfiles de hidrofobicidad de las ATPasas tipo  $P_{1B}$  de *M. tuberculosis* H37Rv y secuencias consenso de bombas caracterizadas bioquímicamente.



Se hizo un segundo grupo de perfiles de hidrofobicidad con las bombas CtpC, CtpG y las secuencias consenso de  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}/\text{Cd}^{2+}/\text{Zn}^{2+}/\text{Hg}^{2+}$  ATPasas tipo P. Al comparar las regiones transmembranales de los miembros de este grupo se observan algunas variaciones que pueden deberse al cambio de solo un aminoácido, que dependiendo de su naturaleza química puede afectar de diferente manera la

hidrofobicidad. En el caso específico del perfil de CtpC, el programa no detecta ninguna región transmembranal, posiblemente porque las secuencias donde se encontraran estas regiones no se ajustan con los parámetros exigidos por el programa. Al considerar que los máximos del gráfico (Figura 5-1) corresponden a TMS, se puede agrupar a CtpC con este tipo de ATPasas tipo P<sub>1B</sub>. Por otro lado, los perfiles de hidrofobicidad de este grupo y el de la secuencia consenso de la Cd<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> ATPasa tipo P son comparables, sin embargo se encuentra una diferencia entre los TMS que se encargan de aportar el sitio de unión al metal y a su vez dar la especificidad de transporte, los que están localizados cerca al extremo C-terminal.

Las bombas CtpD y CtpJ se agruparon con la secuencia consenso de la Cd<sup>2+</sup>/Zn<sup>2+</sup>/Co<sup>2+</sup> ATPasas tipo P. El parámetro tomado para clasificarlas en este grupo ha sido la región C-terminal del perfil de hidrofobicidad y no se tuvo en cuenta los picos encontrados entre los TMS 5 y 6 de las bombas de *M. tuberculosis* H37Rv. Estas corresponden a regiones hidrofóbicas encontradas en el dominio citoplasmático de la enzima y no están asociadas con la membrana. Finalmente, al ubicar estas bombas en este grupo no se descarta que ellas transporten Zn<sup>2+</sup>; según la subclasificación de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub>, el Co<sup>2+</sup> diferencia a estas bombas con las demás y las clasifica en otro subgrupo.

La clasificación de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> haciendo uso de la comparación entre perfiles de hidrofobicidad producto del programa *TMHMM 2.0* permitió diferenciar entre los sustratos de este tipo de enzimas y catalogar estas bombas como ATPasas tipo P<sub>1B-1</sub> ó 3, P<sub>1B-2</sub> y P<sub>1B-4</sub>.

## **5.2 Motivos característicos de las ATPasa tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis***

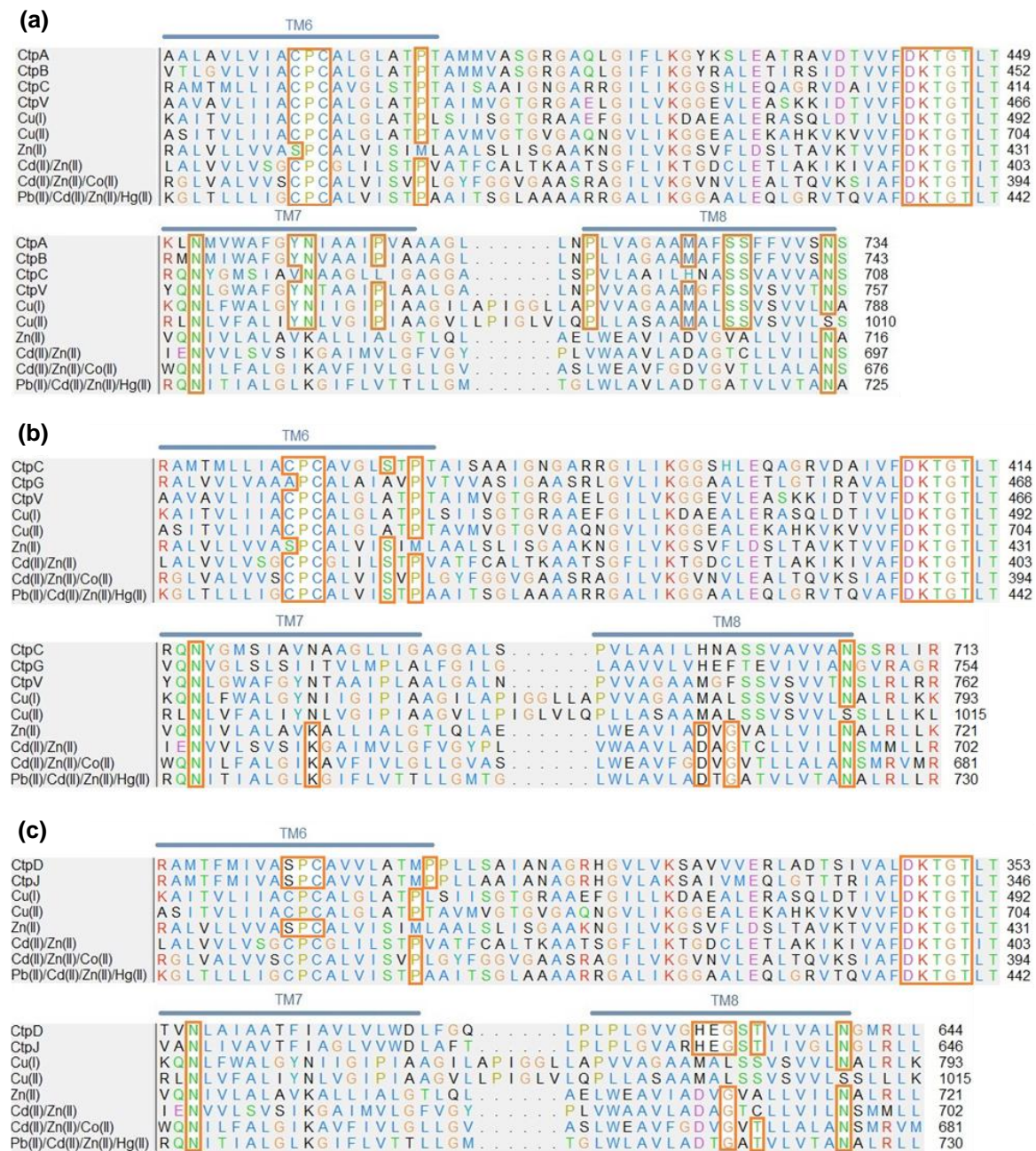
Los motivos transmembranales que diferencian a los diferentes subgrupos de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> [3, 69, 115, 116] fueron buscados sobre los alineamientos de las secuencias consenso de las bombas caracterizadas y los transportadores de *M. tuberculosis* H37Rv. En la Figura 5-2 se muestran los alineamientos obtenidos, señalando la secuencia de los TMS y los motivos a estudiar, que a su vez se resumen en la Tabla 5-1.

Las bombas CtpA, CtpB y CtpV contienen los motivos transmembranales característicos del subgrupo P<sub>1B-1</sub>, lo que sugiere que estas enzimas transportan Cu como lo predicho en los perfiles de hidrofobicidad, pero en un estado de oxidación de +1. El motivo CPH del TMS6 característico de las Cu<sup>2+</sup> ATPasas tipo P no se observó en la secuencia consenso de estas bombas (Figura 5-2a), ya que de las secuencias usadas para la construcción, solo CopB de *Archaeoglobus fulgidus* (ID O30085) [117] exhibía dicho motivo. Por otro lado, al revisar las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> que presentan el motivo CPH en la referencia [3], se encuentra que solo dos bombas han sido caracterizadas y una de ellas presenta una contradicción con la clasificación del subgrupo P<sub>1B-3</sub>, ya que CopB de *Enterococcus hirae* (P05425) transporta Cu<sup>+</sup> y no Cu<sup>2+</sup> [118]. La explicación de la selectividad dada por el residuo de H hacia el Cu<sup>2+</sup>, se debe a su naturaleza química. Este aminoácido se comporta como una base de Lewis intermedia que tiene mayor afinidad al Cu<sup>2+</sup> que al Cu<sup>+</sup>, ya que el primero es un ácido de Lewis intermedio y el segundo uno débil [119]. Otro hecho que demuestra que la micobacteria tenga bombas exportadoras de Cu<sup>+</sup> y no en otro estado de oxidación, es la condición reductora dentro del citoplasma de las bacterias [10]. Además, se ha reportado que CtpV es una Cu<sup>+</sup> ATPasa tipo P encargada de exportar el metal, lo que da mayor peso a la predicción [6].

Para CtpC solo se evidenció el motivo CPCX<sub>4</sub>S en el TMS6 característico del subgrupo P<sub>1B-2</sub>; los otros dos motivos no fueron encontrados. Esto sugiere que esta enzima posiblemente transporte Zn<sup>2+</sup> pero los aminoácidos que se encargan de coordinar con el ion en los TMS7 y 8 no son los mismos a los que se han reportado [3]. Comparando la posición de los aminoácidos responsables de la coordinación del Zn<sup>2+</sup> dentro de los TMS en las secuencias consenso, se encuentra que CtpC podría usar los residuos N (TMS 7) y H (TMS 8) para coordinar con el metal, que por la naturaleza química de estos aminoácidos es permitida la unión. En este análisis se clasificó a CtpC en el subgrupo P<sub>1B-2</sub> y se confirmó esta clasificación porque recientemente esta enzima se caracterizó como una Zn<sup>2+</sup> ATPasa tipo P [74]. CtpG no presentó ninguno de los motivos transmembranales, pero se clasificó como una ATPasa tipo P<sub>1B-2</sub> por la presencia del motivo WI(YE)(RG) localizado después del TMS6 (entre las posiciones 406 y 409) y el motivo LS localizado en TMS7 que es asociado con Zn<sup>2+</sup> ATPasas tipo P [10, 69]. Los aminoácidos encargados de coordinar el Zn<sup>2+</sup> en la enzima CtpG no son los mismos que la mayoría de las Zn<sup>2+</sup> ATPasas tipo P, porque al comparar la posición de los aminoácidos con la secuencia consenso se tiene que CtpG presenta en el TMS6 el



**Figura 5-2:** Alineamiento de las secuencias consenso de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> caracterizadas con las bombas de *M. tuberculosis* H37Rv. **(a)** Motivos del grupo P<sub>1B-1</sub>, **(b)** motivos del grupo P<sub>1B-2</sub> y **(c)** motivos del grupo P<sub>1B-4</sub>.



motivo APC, en el TMS7 un residuo de I y en el TM8 un residuo de H. Los residuos de A y I no contienen heteroátomos (como O ó N) en sus cadenas laterales para poder coordinar con algún ion metálico, por lo tanto se tendrían solo dos ligandos de Zn<sup>2+</sup> (los residuos C y H) en CtpG y el resto falta determinarlos.

Finalmente, CtpD y CtpJ presentan los motivos transmembranales característicos del subgrupo P<sub>1B-4</sub>, SCP y HEGT encontrados en los TMS 6 y 8 respectivamente. En algunos casos se ha mostrado que los aminoácidos involucrados en el transporte de Co<sup>2+</sup> no están determinado satisfactoriamente [3], por esta razón la ausencia del residuo N en el TMS7 no es razón para descartar que estas dos bombas sean transportadoras de Co<sup>2+</sup>. Además, se ha encontrado que la transcripción gen *ctpJ* está controlada por el represor transcripcional NmtR, que es dependiente de la concentración de Co<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> [120], dándole mayor validez a la predicción hecha sobre CtpJ como un transportador de Co<sup>2+</sup>.

**Tabla 5-1:** Motivos transmembranales asociados con los diferentes subgrupos de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> y posible clasificación de estas enzimas presentes en *M. tuberculosis* H37Rv.

| Subgrupo          | Especificidad    | TMS6                | TMS7  | TMS8   | ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>M. tuberculosis</i> |
|-------------------|------------------|---------------------|---|--|--|
| P <sub>1B-1</sub> | Cu <sup>+</sup>  | CPC                 | YN  | MXSS   | CtpA<br>CtpB<br>CtpV                                   |
| P <sub>1B-2</sub> | Zn <sup>2+</sup> | CPCX <sub>4</sub> S | K   | DXG  | CtpC*  |
| P <sub>1B-3</sub> | Cu <sup>2+</sup> | CPH                 | YN  | MXXS   | ----   |
| P <sub>1B-4</sub> | Co <sup>2+</sup> | SCP                 | N   | HEGT   | CtpD*<br>CtpJ*   |
| P <sub>1B-5</sub> | Indeterminado    | TPCP                | QX <sub>4</sub> GX <sub>3</sub> SX <sub>3</sub> M | PX <sub>5</sub> QEX <sub>2</sub> DX <sub>5</sub> N | ----   |

\*ATPasas tipo P<sub>1B</sub> que presentan uno o más de los motivos transmembranales.

En resumen mediante el análisis bioinformático se pudo predecir que posiblemente las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* H37Rv CtpA, CtpB y CtpV transportan Cu<sup>+</sup>; CtpC y CtpG transportan Zn<sup>2+</sup>; y CtpD y CtpJ transportan Co<sup>2+</sup>.

### 5.3 Elección de la ATPasa tipo P<sub>1B</sub> a estudiar

Uno de los parámetros para la elección de la ATPasa tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* H37Rv a estudiar fue la posible asociación de alguna de estas enzimas con el proceso de infección del bacilo tuberculoso. Para ello, se hizo una búsqueda bibliográfica, en la que se encontró que CtpA parece ser un buen candidato a estudiar, ya que el gen *ctpA* se expresa cuando *M. tuberculosis* se encuentra en un estado de persistencia no replicativo [121] similar al ambiente experimentado dentro del granuloma caracterizado por sus condiciones de hipoxia e inanición. Además en este estado fisiológico particular, el bacilo

es más resistente a varios agentes antituberculosos [2]. También se encontró que *ctpA* hace parte del grupo de genes que se expresan durante la infección en humanos con el bacilo tuberculoso [11]. En *M. tuberculosis* extraído de pacientes con TB pulmonar, TB extrapulmonar, coinfección TB-VIH, infección con cepas TB-MDR y XDR, se encontró que en todos los casos el bacilo exhibe un aumento en la expresión de *ctpA* [11], lo que fuertemente sugiere que CtpA es una importante para la infección independiente de la cepa infectiva y el estado del paciente.

Con estos estudios se puede inferir que *ctpA* juega un papel importante en la infección y la supervivencia de bacilo dentro del macrófago, por lo tanto es de vital interés conocer la especificidad del transporte mediado por esta enzima para poder plantear su función biológica real.

## 5.4 Análisis *in silico* de CtpA

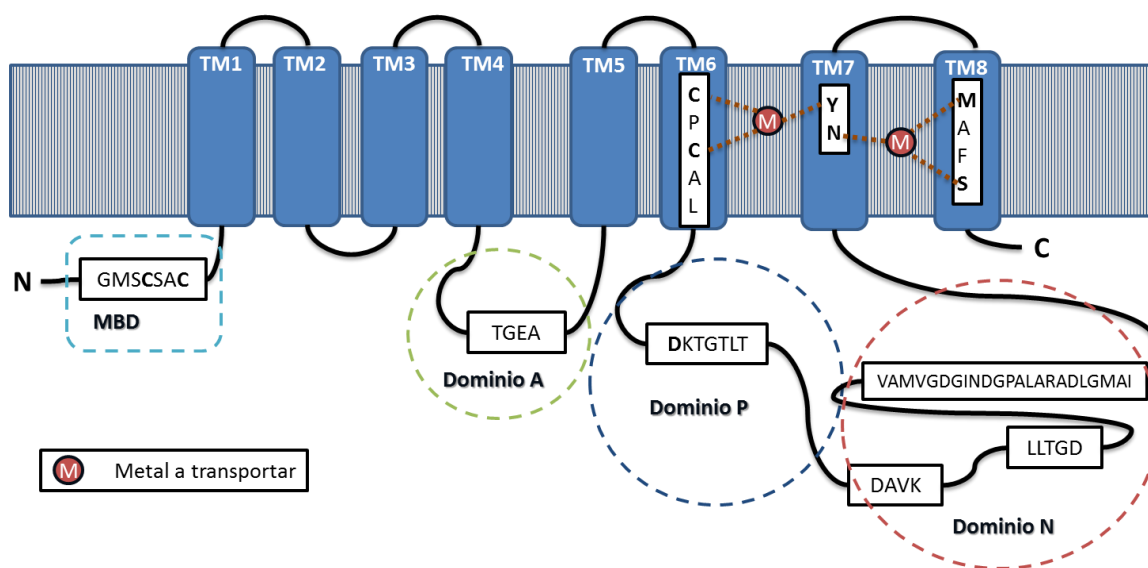
El gen *ctpA* de 2286 pb es anotado en el genoma de *M. tuberculosis* cepa H37Rv como *rv0092*, y se localiza en la posiciones 100.583 y 102.868 [92]. Este codifica una proteína de membrana de 761 aminoácidos que posiblemente se encarga de transportar metales pesados y pertenece a la familia de las ATPasas tipo P que se clasifican en el grupo de las hidrolasas de anhídridos ácidos (EC 3.6.3.-). La proteína tiene una masa molar de 78850,74 Da y un punto isoeléctrico predicho de 6,69.

La predicción de topología de esta enzima es acorde a la clasificación de ATPasas tipo P<sub>1B</sub>; según el esquema mostrado en la Figura 5-3, la disposición de CtpA en la membrana plasmática muestra una topología tipo I con 8 TMS [65] y no una tipo II con 10 TMS como es el caso de las ATPasas que utilizan iones de metales alcalinos y alcalinotérreos como sustrato. Estos ocho TMS también pueden verse en la estructura terciaria modelada y validada (Figura 5-4a y b).

Con el análisis de motivos funcionales utilizando el servidor *InterProScan* se confirmó que se trata de una ATPasa tipo P transportadora de metales pesados y que posiblemente transporte Cu; este programa no confirma la especificidad del ión ni la existencia de los 9 motivos característicos de esta familia de enzimas. Estos motivos ya se habían buscado en trabajos anteriores [91]. En estos estudios se encontraron los

motivos PGD y PAD, encargados de facilitar los cambios conformacionales de la enzima en los estados E1 y E2. El motivo 3 (TGEA) se ubica en el dentro del bucle menor citoplasmático y se asocia con la actividad fosfatasa de la enzima. El motivo 4 (CPCAL) es ubicado en el TMS 6, y aporta los residuos de cisteína que se encargan de coordinar el metal y facilitar su transporte en la regiones transmembranales [79]. El sitio de fosforilación, es dado por el motivo 5 (DKTGLT) que se encuentra en el bucle mayor citoplasmático entre los TMS 4 y 5. Los últimos cuatro motivos son los encargados de facilitar la unión del ATP. (AATVE), catalizar la transferencia del grupo fosfato a la enzima (DAKV) y (LLTGD), y el ultimo motivo conocido como Bisagra (VAMVGDGINDGPALARADLGMAI) participa en los cambios conformacionales que sufre la enzima durante el ciclo catalítico [65].

**Figura 5-3:** Esquema de la topología, motivos funcionales y dominios de la proteína CtpA.



En el caso de las  $\text{Cu}^+$  ATPasas tipo P seis aminoácidos de transmembrana están involucrados en la coordinación con el metal. Los residuos que pueden cumplir esta función en CtpA son: dos cisteínas del TMS6, tirosina y asparagina del TMS7, y metionina y serina del TMS8 (Figura 5-3). La coordinación del  $\text{Cu}^+$  en sistemas proteicos se hace por lo menos con tres enlaces de coordinación [79], por lo tanto la bomba es capaz de coordinar con dos iones durante cada ciclo catalítico.

A parte del dominio de unión al metal encontrado en la región transmembranal, CtpA contiene un MBD en el N-terminal adicional, el que se evidencia por el motivo GMSCSAC. Al comparar con ATPasas tipo P transportadoras de Cu encontradas en anteriores reportes [70, 76, 122], posiblemente este dominio no interviene en el proceso de transporte porque no hace parte de las regiones TMS, aunque en algunas bombas juegan un papel regulatorio [70, 76, 122] y funcionan como sensores específicos del metal a transportar [54].

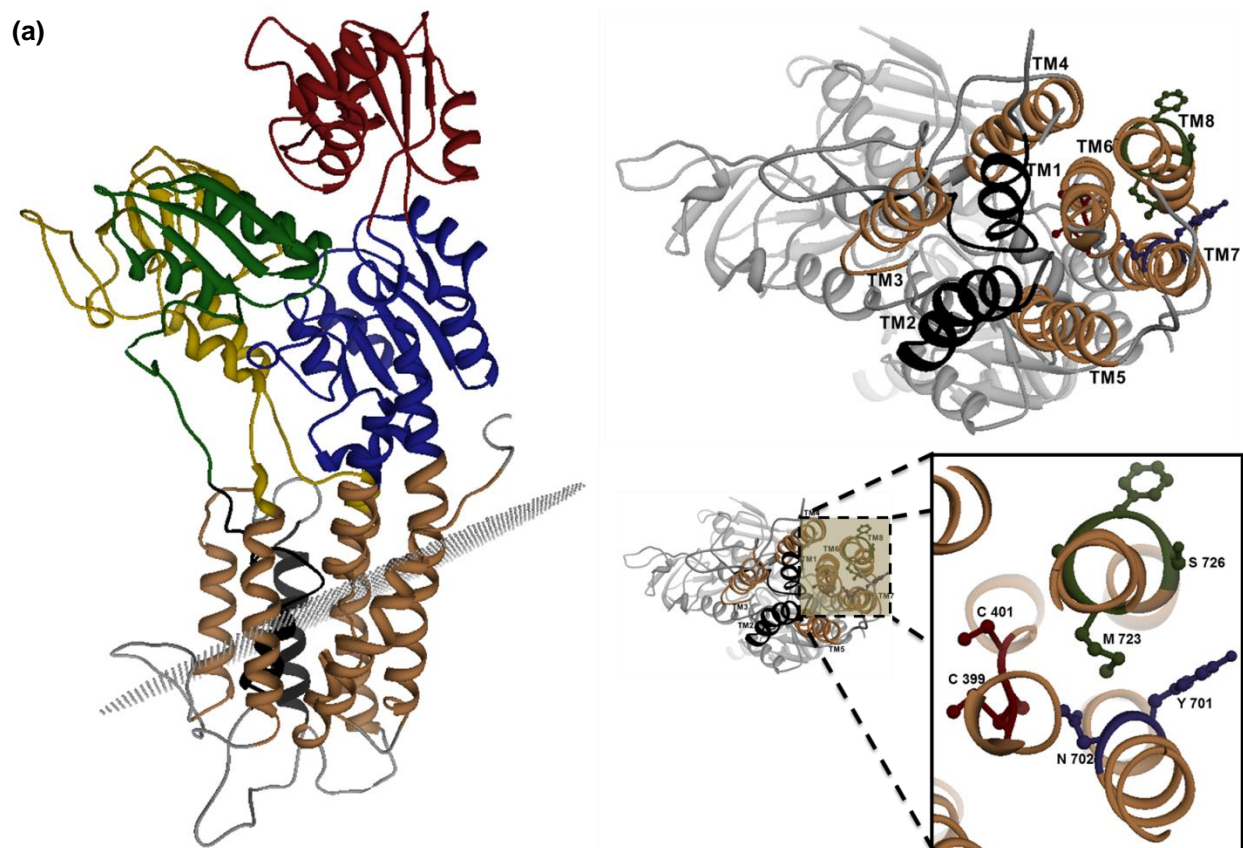
## 5.5 Estructura terciaria de CtpA

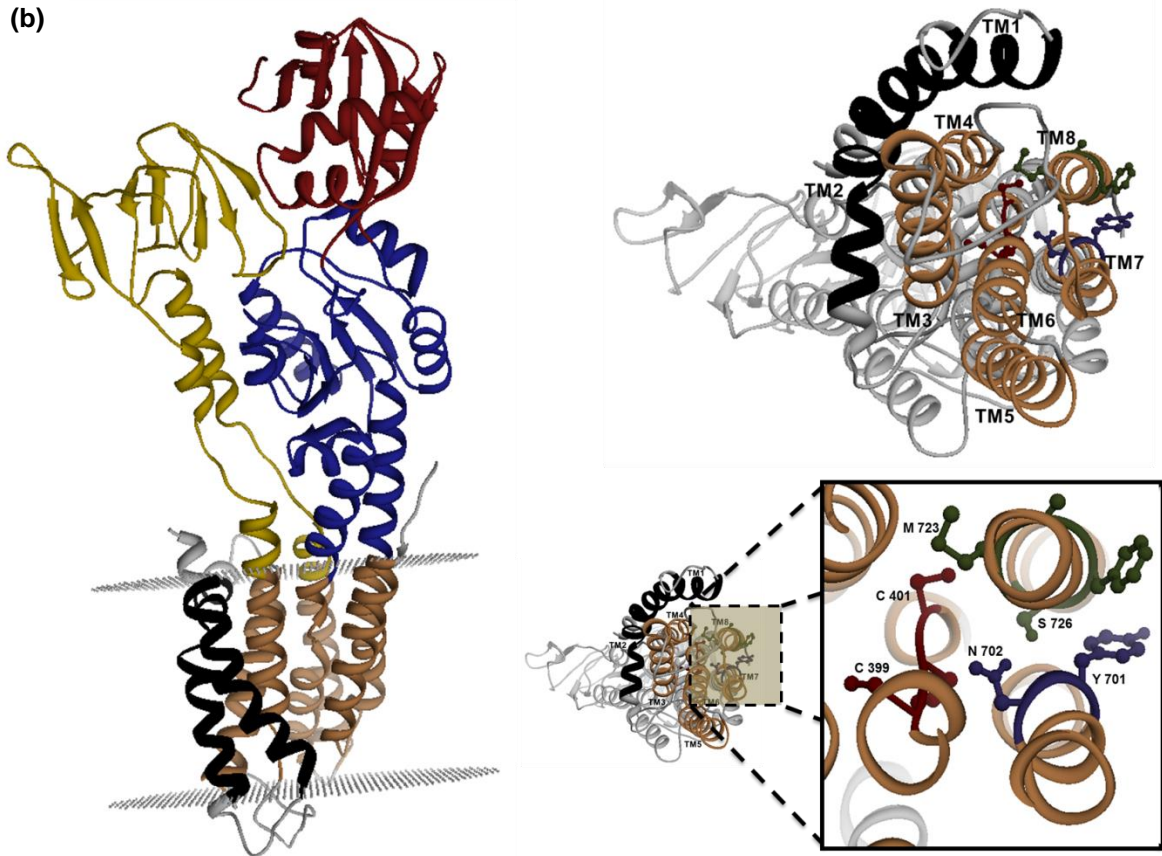
La estructura terciaria de CtpA se modeló por homología mediante el uso del servidor *Swiss model*. Inicialmente se hizo el primer modelo usando como molde CopA, una Cu<sup>+</sup> ATPasa tipo P de *Archeaoglobus fulgidus* (PDB ID 3j09B, estructura determinada por microscopía crio-electrónica con una resolución de 10,00 Å [123]) ya que su secuencia comparte una identidad del 34,23 %. El modelo generó un Z-score de -3,550, sugiriendo una buena calidad [95] y teniendo en cuenta que se trata de una proteína de membrana cuyos valores son más alejados de cero [124]. El modelo utiliza un rango amplio de aminoácidos modelados, del residuo 14 al 745, lo cual abarca la mayoría de la longitud de la proteína. En la Figura 5-4a se muestra el modelo, en él se representan los tres dominios citoplasmáticos A, N y P los cuales se muestran en color amarillo, rojo y azul, respectivamente. Adicionalmente, se muestra el dominio MBD en verde ubicado cerca al dominio A, mostrando que puede tener un papel regulatorio sobre los dominios citoplasmáticos y no en el sitio de unión al metal de transmembrana. Este tipo de regulación puede ser mediada por la interacción entre el MBD y el dominio de unión de ATP, como se ha encontrado en otras Cu<sup>+</sup> ATPasas tipo P [78, 125, 126].

Las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> se caracterizan por tener un dominio S constituido por los dos TMS cercanos al N-terminal y que no hacen parte de los seis TMS encargados de hacer el canal de transporte. En la organización de los TMS del dominio T y S en este modelo de CtpA se evidencia que las hélices del dominio de soporte (color negro) no se encuentran en la disposición esperada. El TMS1 haría parte del dominio T (color café) y no del S, mientras que el TM3 se encuentra alejado y no haría parte del dominio T, por lo tanto los TM estarían invertidos. Por otro lado, al observar los aminoácidos involucrados en el transporte de Cu<sup>+</sup> ubicados en los motivos CPC, YN y MAFS de los TMS 6-8 se

encuentran en el mismo plano, pero la disposición espacial de la S 726 no es la esperada ya que ella se encuentra fuera canal de transporte y hace parte de la cara de la hélice que interacciona con los lípidos de la membrana. Por estos dos motivos se decidió utilizar otro molde para hacer un nuevo modelo que permitiera ubicar correctamente los TMS y dejar ver con mayor claridad la disposición espacial de los aminoácidos involucrados en el transporte.

**Figura 5-4:** Modelos de la estructura terciaria de la proteína CtpA. Se hizo un modelamiento por homología usando como molde **(a)** CopA, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P de *Archaeoglobus fulgidus* (PDB ID 3j09B, estructura determinada por microscopía crio-electrónica con una resolución de 10,00 Å [123]) y **(b)** CopA, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P de *Legionella pneumophila* (PDB ID 3rfuB, estructura determinada por rayos X con una resolución de 3,20 Å [127]). Los dominios citoplasmáticos A, N y P se representan en amarillo, rojo y azul, respectivamente; El dominio MBD en verde y los dominios transmembranales T y S en café y negro, respectivamente. De cada modelo se muestra toda la ATPasa tipo P, otra imagen de los TMS desde la cara externa de la membrana y finalmente un enfoque que muestra la ubicación de los aminoácidos involucrados en el transporte de  $\text{Cu}^+$  que pertenecen a los motivos CPC, YN y MAFS.





La Figura 5-4b muestra el segundo modelo construido, usando como molde CopA, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P de *Legionella pneumophila* (PBD ID 3rfuB, estructura determinada por rayos X con una resolución de 3,20 Å [127]). La secuencia de esta  $\text{Cu}^+$  ATPasas tipo P comparte una identidad del 36,90% con CtpA y el rango de aminoácidos modelados está ubicado entre los residuos el 93 y 741. El modelo presenta un Z-score de -4,259, lo que sugiere que el modelo no es muy bueno, pero comparado con el molde de partida (Z-score de -4,562) el valor es más cercano a cero. Aunque este parámetro es una buena aproximación, el Z-score en el caso de las proteínas de membrana varía porque las características estructurales de estas proteínas no siguen la misma distribución que las proteínas en solución y el Z-score se ajusta a este último tipo de proteínas [124], por lo tanto se debería utilizar otro parámetro que aún no se ha desarrollado para este tipo de enzimas.

El modelo permite ver los tres dominios citoplasmáticos, pero en este caso el MBD no fue modelado porque el rango de aminoácidos usado es menor. Usando el programa *PPM*

server con este modelo, se logró ubicar correctamente los dos planos de las cabezas polares de una bicapa lipídica (las cuales se representa como puntos grises llamados dummies), a diferencia del primer modelo. Por otro lado, la organización de los TMS en este nuevo modelo de CtpA se acomodan a lo esperado, el dominio T está compuesto por 6 TMS que se encuentran juntos formando el canal por el que se transporta el metal. Por lo tanto este modelo se consideró más apropiado para ver la estructura terciaria de los dos dominios transmembranales. Además, como se hizo en el modelo anterior se ubicaron los TMS que contienen los aminoácidos involucrados en la coordinación de  $\text{Cu}^+$  para su transporte, mostrando que el modelo presenta los residuos dentro del canal formado y no en la cara de la hélice que se encuentra expuesta a los lípidos de la membrana.

## 5.6 Recombinante de sobreexpresión de la proteína CtpA

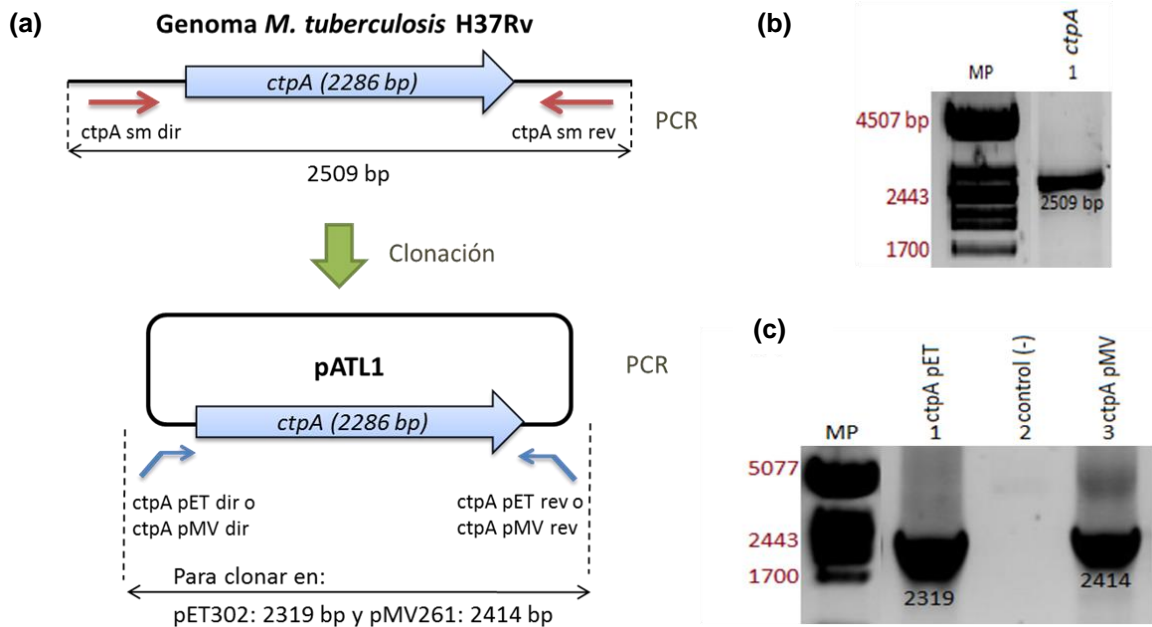
El gen *ctpA* fue clonado en el vector lanzadera pMV261, un vector para expresar proteínas en micobacterias, que contiene un origen de replicación para *E. coli* y otro para micobacterias. Inicialmente se intentó amplificar el gen flanqueado por los sitios de restricción BamHI y EcoRI, partiendo de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv pero no fue posible obtener un amplímero. Para sobrepasar este problema se empleó la estrategia de PCR anidada, partiendo de cebadores totalmente complementarios al genoma, obteniéndose un amplímero que luego fue clonado en el vector pGEM-T easy. El constructo obtenido (pALT1) se usó como molde para amplificar el gen introduciendo en los extremos los sitios de restricción adecuados, y así posteriormente hacer una clonación dirigida en los vectores pMV261 y pET302 (Figura 5-5a), este último para expresar la proteína recombinante en *E. coli*, aunque todavía se está en proceso de comprobar cepas recombinantes utilizando este vector.

### 5.6.1 Clonación de *ctpA* en el vector pGEM-T easy (Construcción de pALT1)

El plásmido pALT1 resulto de la clonación del gen *ctpA* en el vector pGEM-T easy (Tabla 4-5). Brevemente, la clonación se hizo a partir del amplímero de 2509 pb (Figura 5-5b) producto de la amplificación del gen *ctpA* flanqueado por parte de las secuencias corriente arriba y corriente abajo del mismo gen. Como el fragmento obtenido es producto de amplificación con una polimerasa que agrega A en el extremo 3', es posible



**Figura 5-5:** Amplificación por PCR del gen *ctpA*. **(a)** Diagrama esquemático de la técnica de PCR anidada. **(b)** Producto de PCR del gen *ctpA* con 88 nucleótidos adicionales corriente arriba y 135 nucleótidos corriente abajo (2509 bp) usando los cebadores *ctpA* sm dir y *ctpA* sm rev (Carril 1). **(c)** Producto de PCR usando cebadores para la clonación dirigida de *ctpA* en pET302 (Carril 1) y pMV261 (Carril 3). MP: Marcador de peso molecular.

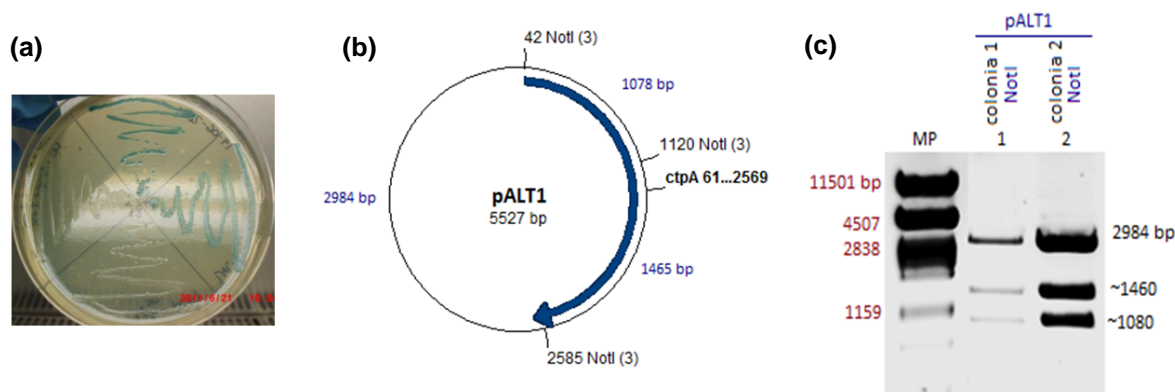


ligarlo en un vector con una T extra en sus extremos. El sistema utilizado permite La selección blanco-azul por lo tanto fue posible identificar colonias con plásmido recombinante, ya que se está interrumpiendo el gen que expresa la  $\beta$ -galactosidasa, por lo que no es posible metabolizar el sustrato (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido, X-gal) produciendo la formación de colonias blancas (Figura 5-6a y b). Se seleccionaron 2 posibles colonias recombinantes (Figura 5-6a), a partir de las que se hizo extracción de plásmido y análisis de los mismos por digestión con la enzima de restricción NotI. La enzima reconoce tres sitios en la secuencia del plásmido recombinante (Figura 5-6b), por lo tanto se esperan tres bandas de diferente tamaño según la dirección en la que se encuentra el inserto dentro del vector (inserción directa: 2984, 1465 y 1078 bp; inserción inversa: 2984, 1461 y 1082 bp). La Figura 5-6c confirma la existencia del plásmido recombinante en ambas colonias y no de vector recircularizado. La dirección del inserto no es posible conocerla con la digestión NotI porque existe una diferencia de 4 bp para reconocer entre las dos formas de inserción, y no es resuelta por electroforesis. Finalmente no importa la dirección del inserto ya que el

plásmido pALT1 va a ser usado como molde para próximas PCR que van a facilitar la clonación en vectores de expresión.

La Figura 5-5c muestra los amplímeros que van a ser usados para la clonación dirigida en los vectores pET302 y pMV261, que son obtenidos al usar como molde pALT1 y los juegos de primers ctpA pET dir-ctpA pET rev y ctpA pMV dir-ctpA pMV rev. Demostrando que esta técnica de PCR anidada fue satisfactoria y ayudo a sobrepasar el problema inicial de la no amplificación de estos productos de PCR a partir del DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Rv.

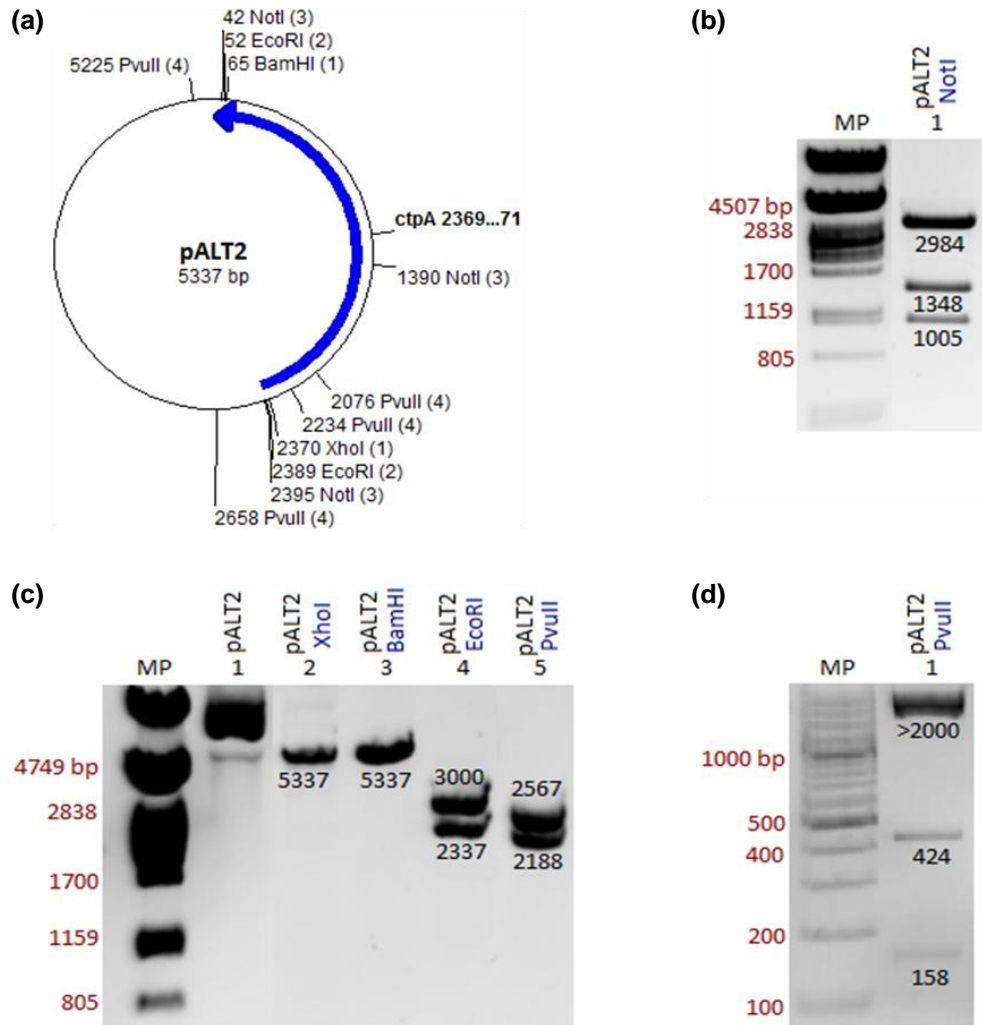
**Figura 5-6:** Clonación del gen *ctpA* en pGEM-T easy y confirmación del plásmido pALT1. **(a)** Colonias recombinantes utilizadas para la extracción de plásmido. **(b)** Mapa del recombinante pALT1 que indica las posiciones donde hace corte la enzima de restricción NotI y la longitud de los productos de digestión. **(c)** Electroforesis para el análisis mediante digestión con NotI del plásmido extraído pALT1 a partir de las dos colonias blancas (Carril 1 y 2). MP: Marcador de peso molecular.



### 5.6.2 Construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA en *E. coli*

En la construcción del plásmido recombinante para la expresión de CtpA en *E. coli*, inicialmente se intentó clonar el producto de PCR de 2319 bp que contiene el gen *ctpA* flanqueado por los sitios de restricción XhoI y BamHI, mostrado en carril 1 de la Figura 5-5c directamente en el vector pET302, pero no se obtuvieron colonias recombinantes. Por ello se decidió hacer el paso previo de la clonación del inserto en el vector pGEM-T easy para luego hacer su subclonación hasta el vector pET302. Este paso asegura que el inserto sea cortado con las dos enzimas (XhoI y BamHI) para favorecer la clonación

**Figura 5-7:** Confirmación del plásmido pALT2. **(a)** Mapa del recombinante pALT2 que indica las posiciones donde hacen cortes las enzimas XhoI, BamHI, EcoRI, PvuII y NotI. **(b)** Digestión de confirmación del plásmido pALT2 con NotI (Carril 1). **(c)** Mapeo de restricción del plásmido pALT2 con las enzimas XhoI (Carril 2), BamHI (Carril 3), EcoRI (Carril 4) y PvuII (Carril 5). **(d)** Electroforesis en agarosa al 2% de la digestión del plásmido pALT2 con PvuII (Carril 1). El mapeo de restricción *in silico* de pALT2 se muestra en la Figura A-3 (Anexos A). MP: Marcador de peso molecular.



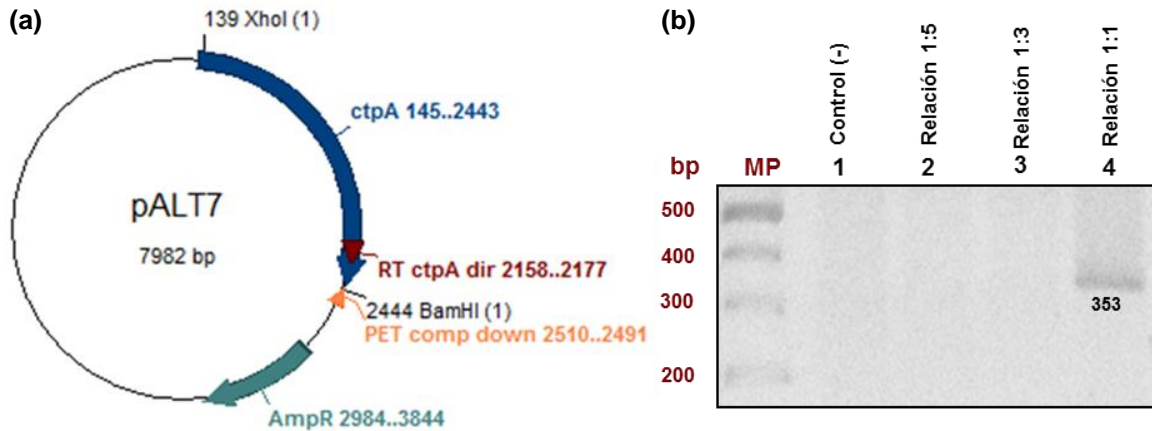
dirigida en pET302. El plásmido producto de la clonación en pGEMT-easy fue nombrado pALT2, cuyo mapa se muestra en la Figura 5-7a.

En la obtención de pALT2 se obtuvieron 15 colonias blancas que fueron analizadas por PCR usando los cebadores RT ctpA dir y rev, que amplifican un segmento de 192 bp

interno al gen *ctpA*. De las colonias seleccionadas solo se encontró una positiva (Resultado no mostrado). El plásmido aislado a partir de la colonia seleccionada se sometió a una digestión de confirmación con la enzima de restricción NotI, cuya digestión permite diferenciar satisfactoriamente entre el plásmido recombinante y el vector sin inserto; en ambos casos la enzima debe cortar en tres sitios originando fragmentos de diferente tamaño. Después de la digestión, el recombinante mostró tres fragmentos de 2984, 1348 y 1005 bp (Figura 5-7b) confirmando que se trata del plásmido recombinante deseado. El plásmido pALT2 se analizó por mapeo de restricción con las enzimas XhoI, BamHI, EcoRI y pVUII (Figura 5-7c y d) y los resultados esperados se muestran en el mapeo *in silico* de pALT2 mostrado en la Figura A-3 (Anexo A). Las dos primeras enzimas confirmaron el tamaño del plásmido (5337 bp) y además indicaron que posee los sitios de restricción para una posterior subclonación en pET302. Tal como se esperaba la digestión con EcoRI generó dos bandas (3000 y 2337 bp) y con PvuII 4 bandas (2567, 2188, 424 y 128 bp). Para la visualización de la digestión con PvuII se hizo necesario hacer dos electroforesis diferentes: la primera en agarosa al 1 % para observar las dos primeras bandas como se muestra en el pozo 5 de la Figura 5-7c y la segunda en un gel del 2% evidenciando tres bandas (Figura 5-7d), pero en esta última, la banda que se encuentra por encima de 2000 bp en realidad corresponde a los dos fragmentos de mayor tamaño que no se alcanzan a separar y a resolver en el gel. El anterior análisis sirvió para determinar que el amplímero fue clonado en dirección inversa como se muestra en la Figura 5-7a.

La subclonación del gen *ctpA* partiendo de pALT2 mediante el corte con XhoI y BamHI y la ligación en el vector pET302, produjo el recombinante pALT7 (Figura 5-8). Para su obtención se hizo necesario hacer una ligación en una relación molar de vector e inserto de 1:1. El éxito de la ligación se confirmó por PCR usando los cebadores PET comp down y RT *ctpA* dir que anillan en el vector e inserto (Figura 5-8a) y generan un producto de 353 bp (Figura 5-8b). El resultado obtenido demuestra que el inserto se clonó en el vector de expresión en la dirección correcta. Por otra parte, de forma sorprendente en el momento de hacer la transformación del recombinante pALT7 en *E. coli* BL21 se obtuvieron solo colonias negativas mediante el tamizaje por PCR con los cebadores PET comp down y RT *ctpA* dir. Además, los controles de ligación produjeron el resultado esperado lo que descartó una posible recircularización del plásmido.

**Figura 5-8:** Identificación del plásmido pALT7. **(a)** Mapa de pALT7 que indica donde anillan lo cebadores RT *ctpA* dir y PET comp down. **(b)** PCR de confirmación de los productos de ligación, evaluado las tres diferentes relaciones molares de vector e inserto: 1:5 (Carril 2), 1:3 (Carril 3) y 1:1 (Carril 4). MP: Marcador de peso molecular.



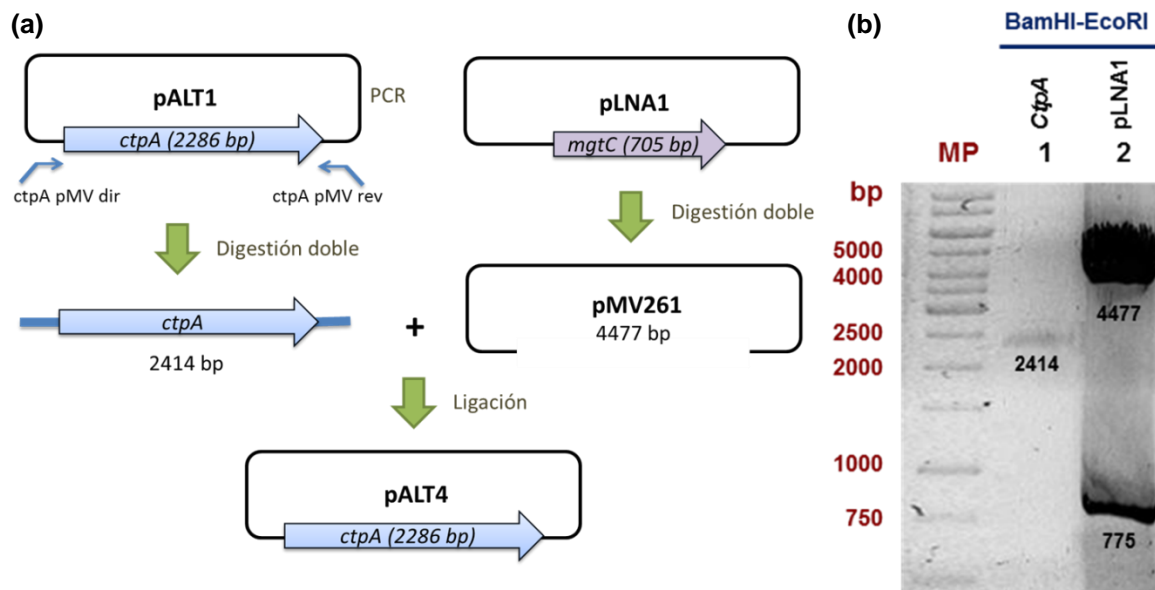
### 5.6.3 Construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA en micobacterias (pALT4)

La construcción del plásmido pALT4 se hizo usando como inserto una secuencia de 2414 bp que contiene el gen *ctpA* flanqueado por los sitios de restricción BamHI y EcoRI (Figura 5-4b), que posteriormente se clonó en el vector pMV261 cortado con las mismas enzimas de restricción. El inserto se obtuvo por PCR usando los cebadores *ctpA* pMV dir y *ctpA* pMV rev y como molde el plásmido pALT1, el amplímero se ligó en pMV261 cortado por digestión doble con BamHI y EcoRI. El análisis de las colonias transformadas mostró solo colonias sin inserto, que de acuerdo a los controles utilizados se dedujo la presencia de solo plásmido recircularizado. Por esta razón el vector se defosforiló luego de la digestión con las enzimas de restricción; después de la defosforilación los resultados obtenidos mostraron ausencia de vector recircularizado. Al ligar *ctpA* en pMV261, se varió la relación molar vector e inserto, además que se utilizaron alternativamente electroporación y termocompetencia para la transformación de bacterias, sin ningún éxito en los experimentos. Por ello, se decidió analizar el producto de ligación utilizando PCR con los cebadores PMV comp up y RT *ctpA* dir para confirmar la formación del plásmido recombinante, obteniendo resultados positivos (un amplímero de 445 bp), lo que deduce de algún problema en el experimento de transformación.

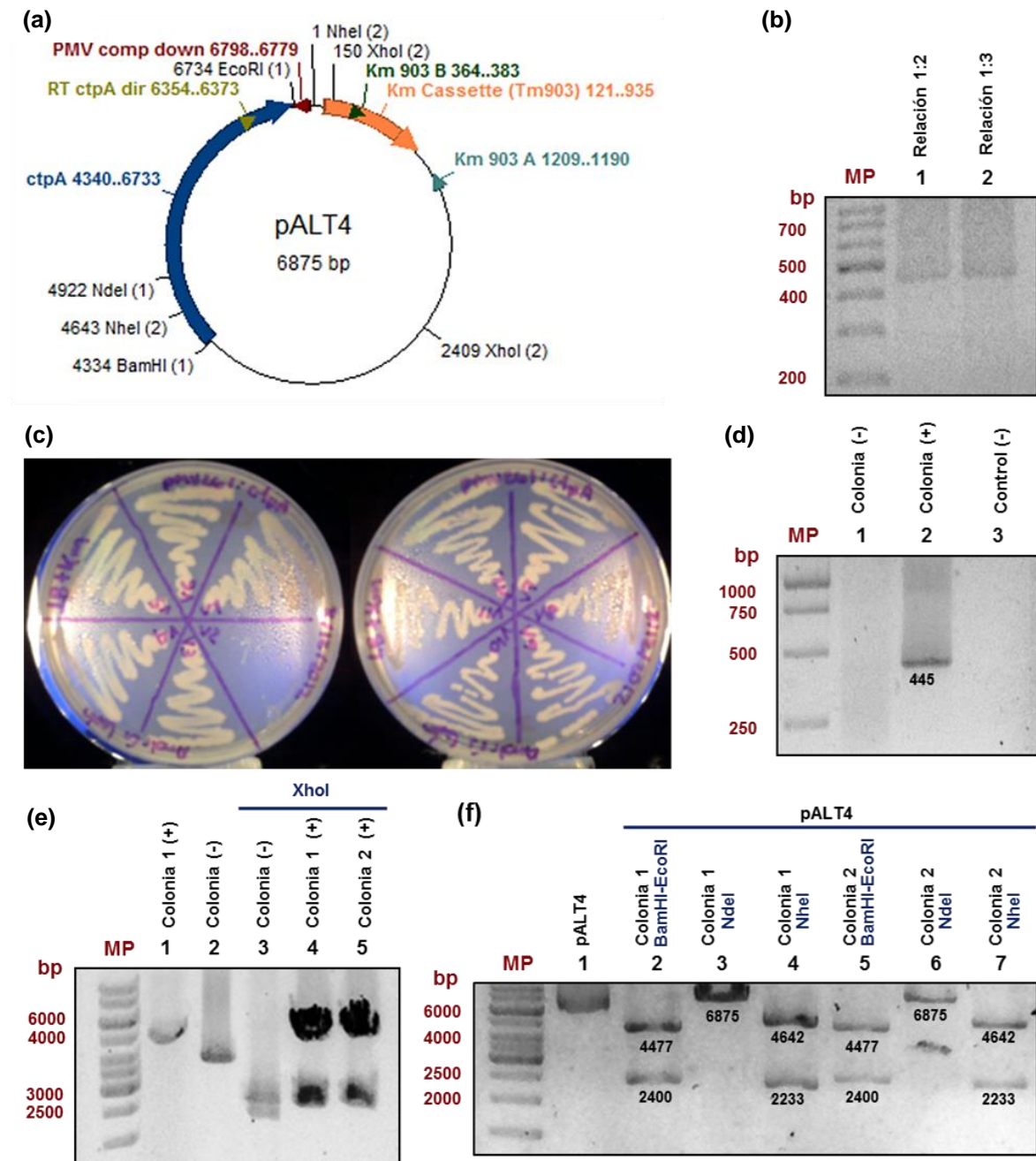
Posiblemente la cantidad de DNA del plásmido recombinante fue muy baja comparada con el vector linealizado y no pudo ser captada por las células de *E. coli* transformadas.

Posteriormente se planteó usar el plásmido pLNA1, que contiene el gen *mgtC* de *M. tuberculosis* H37Rv clonado en pMV261 entre los sitios de restricción BamHI y EcoRI (Figura 5-9a). Con pLNA1 era posible ver que efectivamente las dos enzimas de restricción cortan en los sitios del vector, ya que se libera el inserto del gen *mgtC* de 775 bp, y el vector linealizado de 4477 bp como se muestra en la Figura 5-9b. Con esta estrategia se evitó en la reacción de ligación una posible recircularización del vector por la presencia una población de plásmidos que hayan sido cortados con una sola enzima de restricción. Además se facilitó el corte de ambas enzimas, ya que se necesitan por lo menos 12 bp entre los dos sitios de restricción para que ambas enzimas reconozcan los sitios y corten satisfactoriamente [128], y en el caso del vector pMV261 se tienen solo 7 bp.

**Figura 5-9:** Esquema de la estrategia final para clonación de *ctpA* en el vector lanzadera pMV261. **(a)** Esquema de la metodología empleada para obtener el plásmido recombinante pALT4, el que se construyó partiendo del gen *ctpA* flanqueado por los sitios de restricción XhoI y BamHI los que fueron adicionados por PCR. Para la clonación se usó el vector pMV261 cortado con las mismas enzimas de restricción; para asegurar que el vector fuera digerido por ambas enzimas se partió del plásmido recombinante pLNA1 (recombinante de expresión de *mgtC* usando como esqueleto el vector pMV261 clonado entre los sitios de restricción BamHI y XhoI). **(b)** Productos de la digestión doble con BamHI y EcoRI del inserto (Carril 1) y vector (Carril 2). MP: Marcador de peso molecular.



**Figura 5-10:** Identificación y análisis del plásmido pALT4. **(a)** Mapa de pALT4 con cebadores y sitios de restricción empleado para su análisis. **(b)** PCR de confirmación de los productos de ligación, evaluado las dos diferentes relaciones molares de vector e inserto: 1:2 (Carril 1) y 1:3 (Carril 2). **(c)** Colonias candidato a recombinantes (V1-12) sembradas por estría en medio de cultivo solido LB + Km 25. **(d)** PCR de confirmación de colonias recombinantes, colonia 1 (Carril 2) y 2 (Carril 3). **(e)** Digestión de comprobación de recombinantes con XhoI, colonia 1 (Carril 4) y 2 (Carril 5). **(f)** Mapeo de restricción del plásmido pALT4 extraídos de las dos colonias positivas con las enzimas BamHI-EcoRI (Carril 2 y 5), NdeI (Carril 3 y 6) y NheI (Carril 4 y 7). El mapeo de restricción *in silico* de pALT4 se muestra en la Figura A-3 (Anexos A). MP: Marcador de peso molecular.



El análisis del producto de ligación con los cebadores PMV comp down y RT ctpA dir (Figura 5-10a) mostró que las proporciones de vector e inserto (1:2 y 1:3) fueron exitosas para la obtención del plásmido recombinante (Figura 5-10b). La transformación de estos productos se hizo mediante electroporación a las condiciones de tiempo constante de 18ms y voltaje de 2500 V. La eficiencia de transformación fue de  $1,3 \times 10^3$  y  $0,5 \times 10^3$  UFC/ $\mu$ g de DNA, para la relación 1:2 y 1:3, respectivamente. Al transformar los controles de digestión, ligación, inserto y transformación no se presentó crecimiento de colonia como era lo esperado.

Se analizaron 12 recombinantes por PCR de colonia y digestión de sus plásmidos con XhoI. Solo se obtuvo una colonia positiva por PCR y el análisis por digestión de los plásmidos extraídos de cada colonia mostró dos recombinantes positivos, (fragmentos de 4616 y 2259 bp) coincidiendo en la positiva mediante el análisis por PCR. Al parecer, la segunda colonia se trataba de un falso negativo de PCR. Luego de este análisis preliminar, se hizo un análisis de restricción de los plásmidos recombinantes con las enzimas NdeI (corta 1 vez, en el inserto), NheI (corta 2 veces, una en el inserto y otra en el vector generando fragmentos de 4642 y 2233 bp) y BamHI-EcoRI (libera inserto de 2400 bp). En ambos casos se encontró que efectivamente se trataba del plásmido recombinante (pALT4). Además, en la Figura A-4 del Anexo A se muestra el resultado de la secuenciación de pALT4 con los cebadores PMV comp down y PMV comp up, que confirmó la formación del recombinante y además que el gen *ctpA* se encuentra en marco de lectura, demostrando que pALT4 está listo para producir la proteína CtpA recombinante.

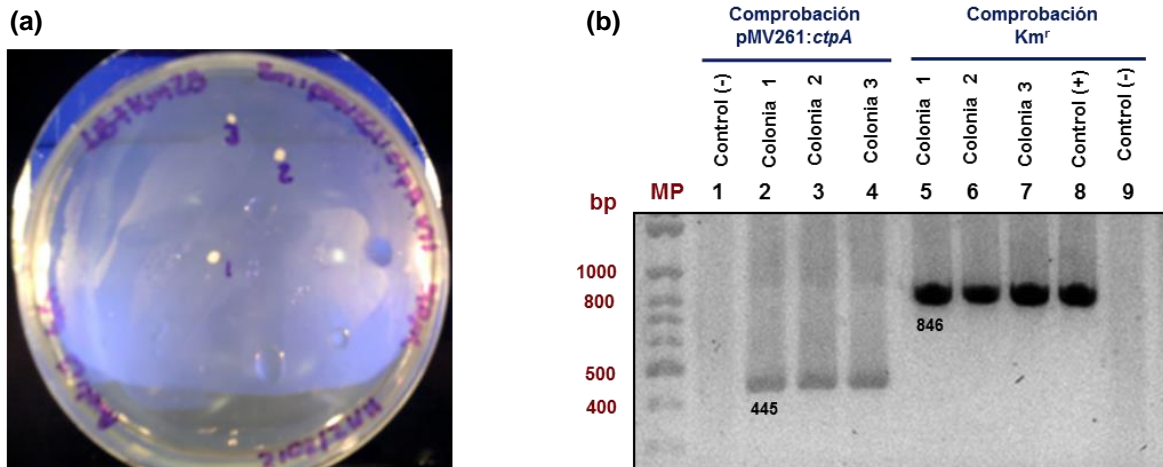
#### **5.6.4 Transformación de micobacterias con el plásmido pALT4**

Células electrocompetentes de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 fueron transformadas con 164 ng de pALT4, obteniéndose 3 colonias aisladas con el morfotipo característico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 al cabo de tres días de cultivo. La identidad de estas colonias se comprobó por PCR de hervido usando los cebadores PMV comp down-ctpA RT dir y Tm903A-Tm903B. En la Figura 5-11b se muestra el resultado de estas PCR de comprobación indicando que las tres están transformadas con el plásmido de interés. Para ensayos posteriores se decidió trabajar con la colonia 2, selección que se hizo de forma aleatoria.



Por otro lado, se hizo la transformación de pALT4 y pMV261 en células electrocompetentes de *M. tuberculosis* H37Ra. Se usaron 164 ng de pALT4 obteniéndose una eficiencia de transformación de 1102 UFC/ $\mu$ g de DNA; para el caso de pMV261 se utilizaron 102 ng de plásmido recombinante obteniéndose una eficiencia de transformación de 8081 UFC/ $\mu$ g de DNA. Las colonias obtenidas de *M. tuberculosis* crecieron a las 4 semanas y presentaron el morfotipo de la cepa silvestre. 8 colonias seleccionadas al azar se analizaron por PCR utilizando los cebadores PMV comp down-ctpA RT dir y Tm903A-Tm903B, resultando el tamizaje positivo tanto para el recombinante pALT4 como el vector pMV261 (resultados no mostrados, son iguales a los de la Figura 5-11b). Esta cepa transformada se utilizó para hacer una sobreexpresión de la proteína CtpA y corroborar los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad y actividad ATPasa dependiente de metales pesados con la cepa recombinante *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155:pALT4.

**Figura 5-11:** Transformación del plásmido pALT4 en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. **(a)** Colonias producto de la transformación sembrada en medio solido de LB + Km. **(b)** Comprobación por PCR de colonia de la transformación de pALT4 usando los dos juegos de cebadores: PMV comp down-ctpA RT dir (Carril 2 a 4) y Tm903A-Tm903B (Carril 5 a 7). MP: Marcador de peso molecular.



### 5.6.5 Sobreexpresión de la proteína CtpA en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

La expresión del gen *ctpA* clonado corriente abajo del promotor *hsp60* de pMV261, se indujo cultivando las bacterias a 45°C durante 30 minutos, justo antes de la lisis bacteriana. Inicialmente, el análisis de dicha sobreexpresión se realizó por SDS-PAGE

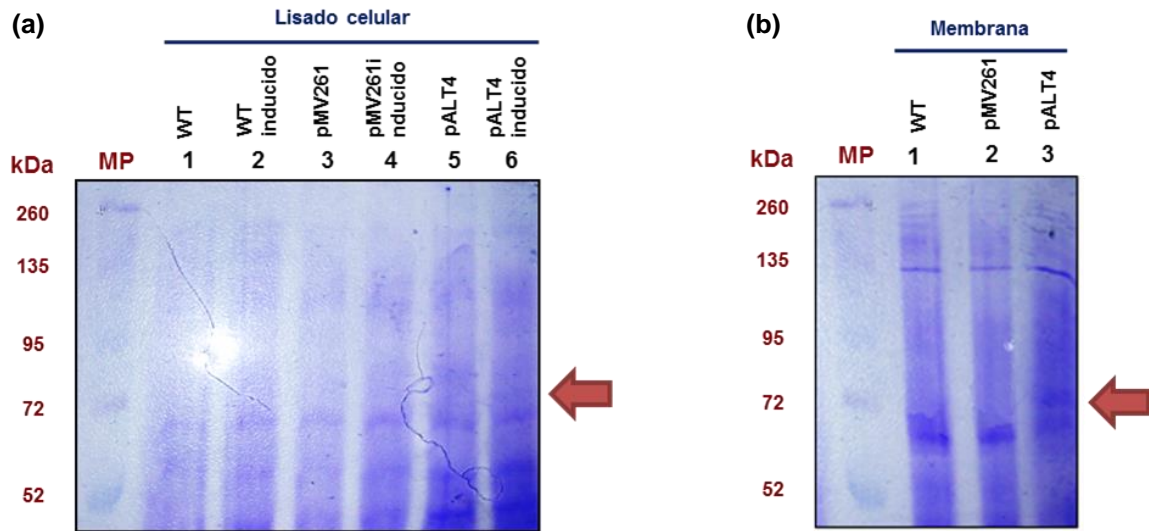
(Figura 5-12a), comparando la cepa recombinante, con aquella transformada con el vector pMV261 y con la cepa silvestre, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. En el gel se observa la aparición de una proteína de aproximadamente 80 kDa solo apreciable en el lisado de la cepa recombinante (transformada con el plásmido pALT4), un primer indicio que comprueba que el plásmido pALT4 expresó la proteína CtpA de *M. tuberculosis*, cuyo peso molecular calculado es de 79,68 kDa (769 aminoácidos) considerando el péptido adicionado en el N-terminal (MAKTIADP) por del vector pMV261. Además se hizo un aislamiento de vesículas de membrana a partir de los extractos de lisis celular para corroborar la presencia de la proteína en la membrana plasmática. En la Figura 5-12b se observa que efectivamente existe una proteína a la altura de CtpA en la membrana plasmática de la cepa transformada con pALT4 y que no es observado en las vesículas de membrana extraídas de la cepas control de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (cepa silvestre y transformada con pMV261). Los resultados obtenidos están acorde a las dificultades inherentes al expresar proteínas directamente en micobacterias, como lo es la resistencia a la lisis celular y la menor expresión del vector pMV261 en comparación al expresar proteínas en *E. coli* utilizando el sistema pET [129].

El haber detectado CtpA en las membranas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, no implica necesariamente que la proteína esta embebida de una manera funcional. Para comprobar esto se tiene que recurrir a estrategias experimentales que permitan concluir acerca de la integridad de la proteína a partir de su función. En este caso se supone que la proteína es una ATPasa tipo P, es decir transportadora de sustratos como cationes de metales pesados a través de la membrana a expensas de la hidrólisis de ATP.

## **5.7 Ensayos de toxicidad frente a metales pesados de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando CtpA**

Los ensayos de toxicidad se basaron en evaluar cómo afecta el crecimiento bacteriano la concentración de un catión metálico en cultivo; para ello se estimó el crecimiento celular mediante la determinación del OD<sub>595 nm</sub> de los cultivos, tomando como referencia el crecimiento en ausencia de iones. En cada caso, los blancos se establecieron para cada punto, como la coloración producida por la concentración de metal añadido a las células en crecimiento.

**Figura 5-12:** Sobreexpresión de la proteína recombinante CtpA en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 inducido por calentamiento. **(a)** SDS-PAGE de lisado celular de la cepa que sobreexpresa CtpA (Carril 5 y 6) y cepas de control (Carril 1 a 4), inducidas y no inducidas. **(b)** SDS-PAGE de las vesículas de membrana extraídas de las tres cepas (Carril 1 a 3). MP: Marcador de peso molecular; WT: Cepa silvestre; pMV261: Cepa transformada con pMV261; pALT4: Cepa transformada con pALT4.

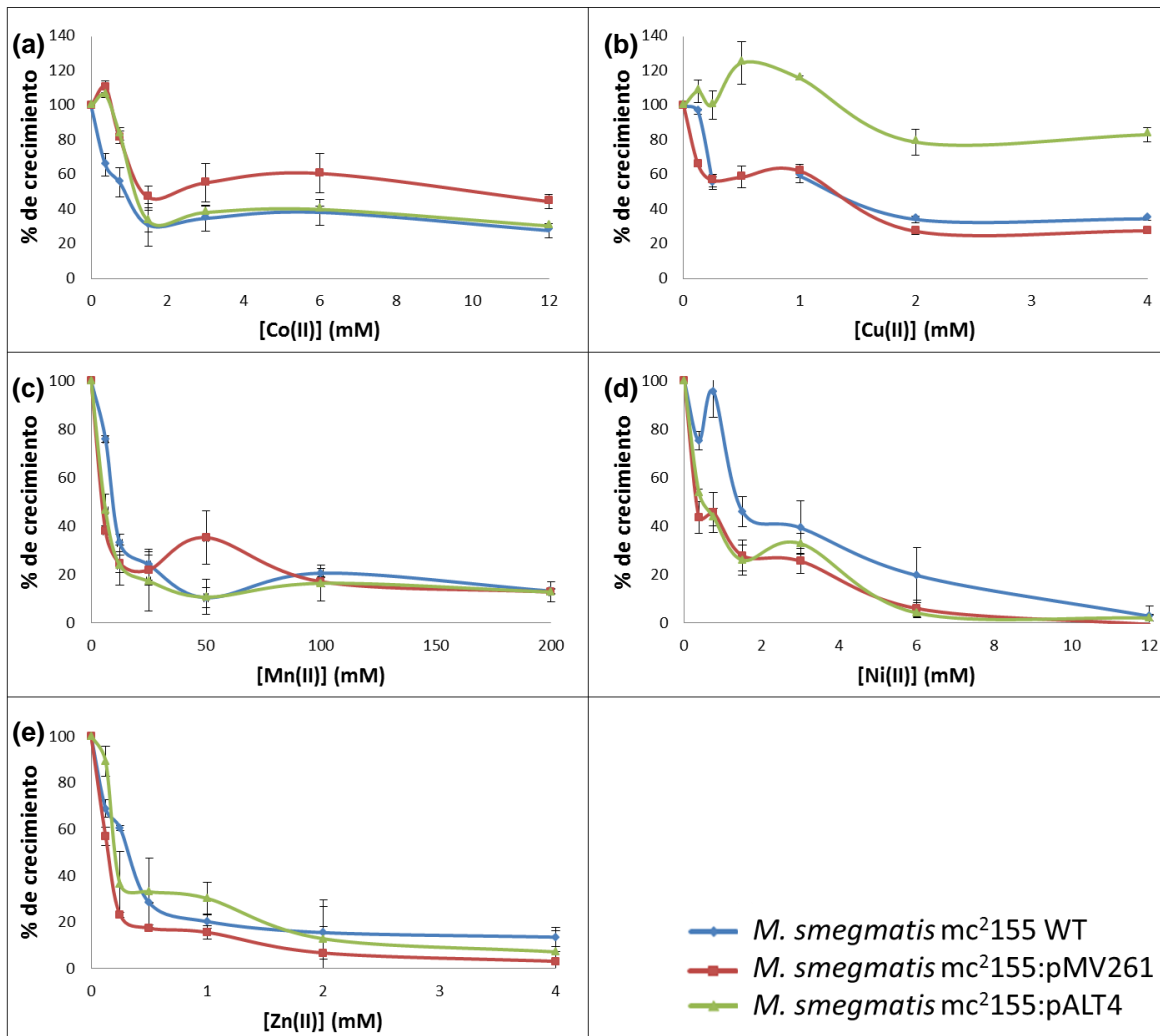


La Figura 5-13 muestra los resultados de los ensayos de toxicidad usando los posibles sustratos metálicos que pueden ser transportados por CtpA. Solo en presencia de  $\text{Cu}^{2+}$  se observaron cambios en el crecimiento de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando CtpA. El porcentaje de crecimiento bacteriano se calculó tomando como el 100 % de crecimiento al  $\text{OD}_{595\text{nm}}$  de las bacterias que no contiene el metal pesado durante su incubación. Al suplementar los cultivos con 4 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  (una cantidad tóxica para las cepas control de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155) *M. smegmatis* sobreexpresando CtpA exhibió un crecimiento del 83,5 % mientras que la cepa silvestre y transformada con pMV261 presentan un crecimiento del 34,9 y 27,9 %, respectivamente. Lo anterior muestra un aumento en más del doble en el porcentaje crecimiento bacteriano asociado a la sobreexpresión de CtpA, demostrando que esta bomba le podría aportar a *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 tolerancia al crecimiento por concentraciones extracelulares de  $\text{Cu}^{2+}$  por encima de la CIM (2 mM).

La dirección del transporte de un metal pesado por parte de un transportador de membrana, se puede deducir si en la célula completa existe un cambio en la tolerancia a concentraciones tóxicas del metal [10]. Cuando se produce un aumento en los niveles de

tolerancia al metal, se está produciendo un fenómeno de expulsión del metal tóxico desde el interior celular; mientras que una disminución de la tolerancia al metal tóxico induce por parte de la célula a la captación del ión extracelular disponible [10]. El razonamiento anterior induce a pensar que CtpA está relacionada con el transporte de Cu desde el interior hacia el exterior celular. Por lo tanto el  $\text{Cu}^{2+}$  que entra inicialmente a la célula es reducido en el interior celular por el ambiente reductor de citosol bacteriano, y posteriormente sería transportado desde el interior celular en el que ahora se encontraría en un estado de oxidación de +1 [10].

**Figura 5-13:** Ensayos de toxicidad frente a diferentes metales pesados de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando CtpA. Las graficas muestran el porcentaje de crecimiento bacteriano frente diferentes concentraciones del metal divalente de (a)  $\text{Co}^{2+}$ , (b)  $\text{Cu}^{2+}$ , (c)  $\text{Mn}^{2+}$ , (d)  $\text{Ni}^{2+}$  y (e)  $\text{Zn}^{2+}$ . En ensayo se hizo midiendo el OD a 595nm, comparando el crecimiento bacteriano de la cepa transformada con pALT4 y con las cepas control (silvestre y transformada con pMV261). En cada punto se hicieron medidas por triplicado, las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.



Por otra parte, al observar los resultados al suplementar los cultivo con  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  o  $\text{Zn}^{2+}$ , no muestran una diferencia significativa entre *M. smegmatis* sobreexpresando CtpA y la cepas control (Figura 5-13a, c-e). Por lo tanto, este ensayo de toxicidad permitiría afirmar que es solo  $\text{Cu}^+$  el sustrato transportado por CtpA.

## 5.8 Ensayos de Actividad ATPasa dependiente de metales pesados

El ensayo de actividad ATPasa se basa en la cuantificación de Pi liberado cuando la ATPasa tipo P transporta iones específicos a través de la membrana. Por lo tanto, una manera indirecta de determinar la especificidad de CtpA expresada en membranas de *M. smegmatis* es determinar frente a que iones se estimula en mayor proporción la actividad ATPasa, es decir, se produce mayor cantidad de Pi.

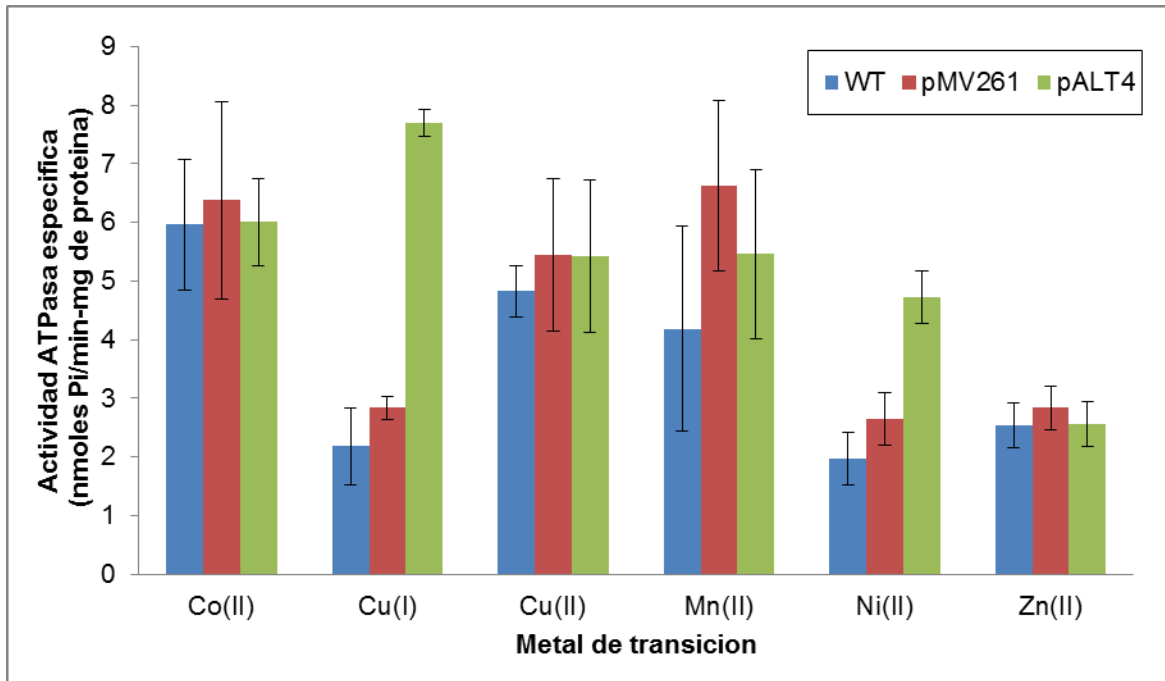
La estimulación de la actividad ATPasa específica de cada ion probado se llevó a cabo sobre vesículas de membrana plasmática de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 que contenían la proteína CtpA expresada (cepa transformada con pALT4).

La actividad determinada se comparó con la obtenida a partir de vesículas de membrana de la cepa silvestre y a partir de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformado con pMV261. Los iones utilizados para la estimulación de la actividad ATPasa específica fueron  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  (Figura 5-14) porque son los principales sustratos de los subgrupos de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> y son los mismos metales empleados en los ensayos de toxicidad iónica.

Como el ensayo de actividad se hizo a partir de vesículas de membrana nativas, estas contienen además de la enzima sobreexpresada, las proteínas propias de esta estructura en la célula. El fundamento del ensayo es colocar las vesículas de membrana en presencia de uno de los iones de metales pesados a ensayar, y el ATP se añade justo para empezar la reacción enzimática, siendo el control de la reacción una mezcla si catión. Este control elimina el fosforo inorgánico que puede ser liberado por otras enzimas diferentes a las ATPasas, como las fosfatasa. La actividad ATPasa asociada a CtpA se calculó restando el valor obtenido a partir de vesículas de membrana de la cepa

transformada con pALT4 y a partir de vesículas de membrana obtenidas a partir de células transformadas con el vector pMV261.

**Figura 5-14:** Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados. La grafica muestra el valor de la actividad ATPasa específica estimulada por los siguientes iones:  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en una concentración de  $10 \mu\text{M}$ . El ensayo se hizo sobre la membrana plasmática de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 cepa silvestre (Barras azules), transformada con pMV261 (Barras rojas) y pALT4 (Barras verdes). En cada condición se hicieron medidas por triplicado, las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos. Se uso la prueba T de student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



Las vesículas de membrana de la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 presentaron una estimulación apreciable en la actividad ATPasa específica en presencia de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$ . Al ser una bacteria ambiental, *M. smegmatis* posee diferentes transportadores específicos para cationes metálicos, entre ellos ATPasas. Se ha encontrado tres ATPasas tipo  $P_{1B}$  en el genoma de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 [130], actualmente se han caracterizado dos de ellas CtpD y CtpC, que transportan  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  respectivamente [75, 131]. También se ha encontrado que la bomba CtpD transporta  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en una menor magnitud [131]. La tercera ATPasa tipo  $P_{1B}$  de *M. smegmatis*, MSMEG2, se ha considerado como una bomba hipotética transportadora de Cu [130]. Posiblemente, la estimulación observada en los resultados de la Figura 5-14 sea debida

principalmente a la presencia de estas ATPasas tipo  $P_{1B}$ , pero también hay que tener en cuenta que se está trabajando con vesículas de membrana que contiene otras ATPasas, diferente a la tipo P, que puede presentar actividad con estos metales.

Entre las vesículas de membrana con CtpA y las vesículas control existen diferencias significativas en la actividad ATPasa al estimular con los iones  $Cu^+$  y  $Ni^{2+}$  ( $4,86 \pm 0,57$  U/mg de proteína y  $2,1 \pm 1,19$  U/mg de proteína, respectivamente). En el resto de iones evaluados no se presentaron diferencias significativas entre las vesículas de membrana extraídas de las tres cepas. En el caso de las medidas de actividad ATPasa en presencia de  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  se obtienen barras de error grandes que indican una alta desviación en los datos, que posiblemente sean producto de la actividad de otras ATPasas que estén presentes en la membrana celular. Finalmente, al revisar los valores obtenidos de la actividad ATPasa estimulada con  $Co^{2+}$  y  $Mn^{2+}$  no se encuentra un cambio significativo producto de la expresión de CtpA en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, en el caso específico de  $Mn^{2+}$  la actividad ATPasa de las membranas plasmáticas de la cepa transformada con pALT4 está en medio de los valores de actividad obtenidos para la cepa silvestre y la cepa transformada con pMV261. Estos resultados sugieren que el  $Cu^+$  es el principal sustrato de CtpA por la estimulación obtenida en la actividad ATPasa y además la enzima es capaz de transportar en menor magnitud  $Ni^{2+}$ .

Los resultados obtenidos en el ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados soportan a los resultados de toxicidad iónica, donde CtpA expulsa el  $Cu^+$  de la célula y no el  $Cu^{2+}$ . Además, teniendo en cuenta que las vesículas de membrana presentan una mayor configuración con la cara citosólica expuesta hacia el exterior [132], que es completamente al contrario a la configuración en la célula, lo que supondría que CtpA toma el  $Cu^+$  del medio de reacción y lo transporta hacia el interior de la vesícula (Figura 4-2) y por analogía en la célula lo estaría expulsando. Por otro lado, no se observó un cambio apreciable en la toxicidad de las células cultivadas en presencia de  $Ni^{2+}$ , aunque la actividad ATPasa de CtpA sea estimulada por este metal la bomba no logra producir tolerancia a la micobacteria posiblemente por su baja capacidad de transporte. El transporte de iones  $Ni^{2+}$  por ATPasas tipo  $P_{1B}$  se ha encontrado en la bomba CtpD de *M. smegmatis* cuyo sustrato principal el  $Co^{2+}$  [131], pero hasta el momento no se ha reportado que una misma bomba sea capaz de transportar  $Cu^+$  o  $Ni^{2+}$  [3], lo que es un resultado sorprendente. Se conoce que las ATPasas tipo P

transportadoras de  $\text{Cu}^+$  pueden transportar  $\text{Ag}^+$  [133] y en algunos casos es capaz de transportar  $\text{Cu}^{2+}$  [117].

## 5.9 Determinación de parámetros cinéticos de las vesículas de membrana enriquecidas con CtpA

La actividad ATPasa dependiente de  $\text{Cu}^+$  y mediada por CtpA, ha sido evaluada teniendo en cuenta en la reacción enzimática variaciones de pH, temperatura, concentración de enzima y concentración de sustrato. Todos estos parámetros cinéticos fueron determinados considerando la actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa asociada a CtpA como la diferencia entre la actividad obtenida en las membranas enriquecidas con la bomba (transformadas con pALT4) y la membranas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada con el vector pMV261 (para descartar actividad asociada con el vector vacío). Por otra parte, no se determinó la actividad específica ATPasa tipo P, ya que las tipo P<sub>1B</sub> son inhibidas por una concentración de vanadato mayor que las bombas encargadas del transporte de metales alcalinos y alcalinotérreos [134], para conocer la cantidad necesaria de vanadato para inhibir a CtpA se debe hacer un estudio cinético del efecto del inhibidor. Finalmente, por las limitaciones en la cantidad de membrana no se hizo este ensayo.

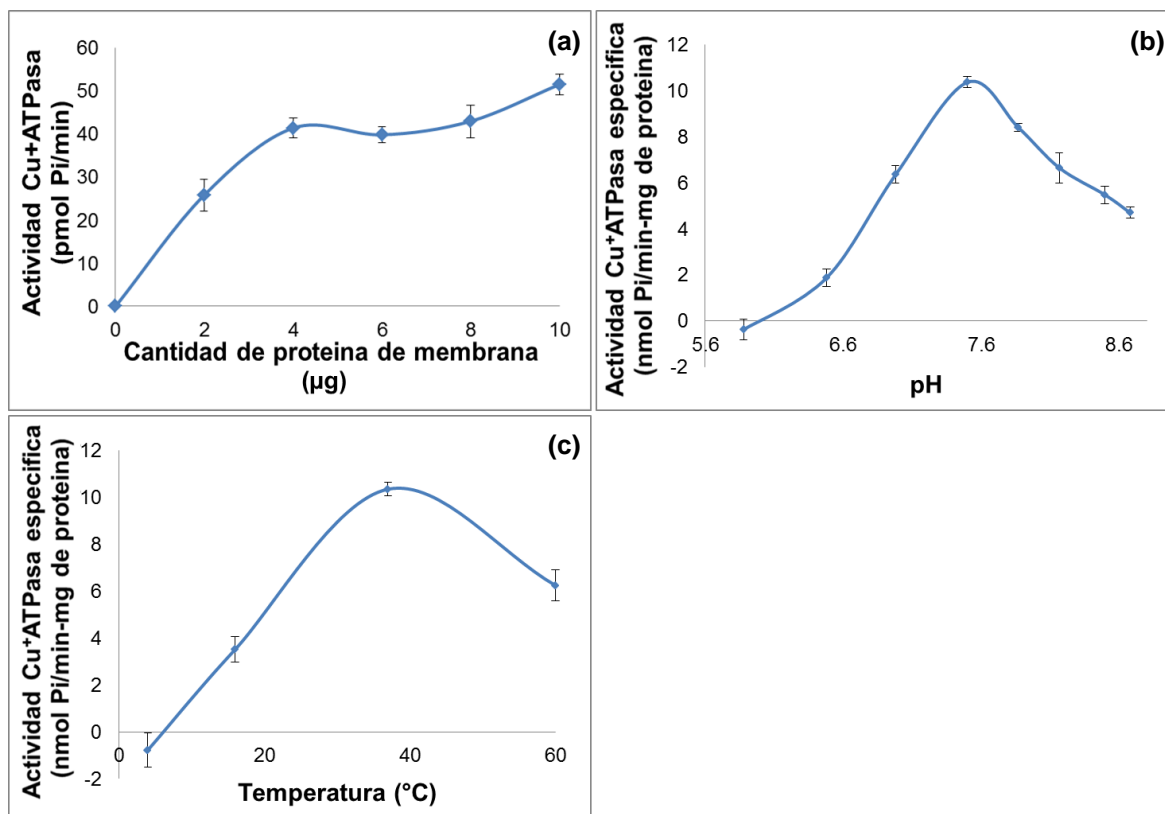
### 5.9.1 Efecto de la concentración de proteína de membrana

En una reacción enzimática con exceso en la concentración de sustrato, la velocidad de reacción depende de la cantidad de enzima presente. En nuestro caso se obtuvo la tendencia esperada (Figura 5-15a), lo que significa un aumento en la actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa al aumentar la cantidad de proteína de membrana hasta llegar a un valor máximo, donde el sustrato es el reactivo limitante de la reacción; en este caso se obtuvo el valor máximo de actividad al utilizar 10  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana. Debido a la baja disponibilidad de extracto, se utilizaron 4  $\mu\text{g}$  de proteína, los que a su vez mostraron valores de actividad apropiados para desarrollar el resto de los ensayos diseñados. Al tratarse de vesículas nativas no es correcto afirmar que la proteína presente en la reacción sea solo CtpA, para ello es necesario disponer de proteína purificada. No obstante, al comparar con el ensayo de actividad ATPasa hecho para la proteína purificada CopA de *A. fulgidus* [123], donde se utilizaron 2 y 4  $\mu\text{g}$  de proteína, muestra que el extracto usado de las vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155



enriquecidas con CtpA tiene una actividad comparable; ya que en teoría se usa la misma cantidad de proteína para observar un valor de actividad apreciable.

**Figura 5-15:** Condiciones óptimas de la actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa a partir de vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 enriquecidas con CtpA. **(a)** Efecto de la cantidad de proteína de membrana. **(b)** Efecto del pH. **(c)** Efecto de la temperatura. En cada condición se hicieron medidas por triplicado, las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos. Se usó la prueba T de student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



### 5.9.2 Efecto del pH

La Figura 5-15b muestra la variación de actividad ATPasa específica estimulada por  $\text{Cu}^+$  en función del pH, a partir de vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 enriquecidas con CtpA. Se encontró que la bomba CtpA presenta un valor óptimo de actividad cuando la enzima se encuentra a un pH de 7,5. Este valor de pH fue corregido usando el coeficiente de temperatura  $\Delta\text{pKa}/\Delta\text{T}$  correspondiente a cada buffer (MOPS -0,011 y TRIS -0,028 [135]) para tener el valor real de pH a 37  $^{\circ}\text{C}$ , ya que el pH varía con la temperatura y se debe reportar el valor real en la reacción enzimática.

El valor obtenido de pH óptimo es cercano a la neutralidad, mostrando que la bomba es capaz de trabajar al pH intracelular de las bacterias [136, 137]. Durante la infección, el bacilo tuberculoso se expone a un pH medianamente ácido y a limitación de nutrientes [138-140], pero *M. tuberculosis* mantiene su pH intracelular neutro debido a la activación de sistemas de intercambio de protones por cationes, protón ATPasas y producción de macromoléculas citoplasmáticas que funcionan como reguladores de pH [136]. Por otra parte, se observa que el rango de pH en el que CtpA es activa, cubre parte del rango de pH extracelular que *M. tuberculosis* H37Rv necesita para crecer (6,2 a 7,3 con marcada atenuación a pH 5 y 8,4) [141]. Lo anterior muestra que la enzima es capaz de actuar cuando existe un cambio en el pH durante la infección, en caso tal que el pH intracelular del bacilo se igualara al intrafagosomal.

### 5.9.3 Efecto de la temperatura

La temperatura en la que se presenta mayor actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa específica en la membrana enriquecida con CtpA es 37 °C (Figura 5-15c). Al ser la temperatura corporal, se entiende que la enzima presenta mayor actividad cuando el bacilo se encuentra dentro de las células hospedadoras. También se encontró cierta actividad de la enzima a temperaturas distantes como 18 y 60 °C, mostrando que la bomba es activa en un amplio rango de temperaturas. No se tomaron puntos por encima de 60 °C, ya que como es de esperarse, la desnaturalización de la proteína disminuiría notablemente la actividad. La misma tendencia en la reacción enzimática puede ser observada cuando la ATPasa tipo P de *Synechocystis* PCC 6803 a una temperatura de reacción enzimática de 50 °C, su porcentaje de actividad cae a cero [142].

### 5.9.4 Efecto de la *concentración* de sustrato y determinación de constantes cinéticas

Las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  utilizan ATP y el catión del metal pesado como sustrato; cuando la concentración de ATP se encuentra por encima de la saturación de la enzima, la reacción enzimática solo va a depender de la variación en la concentración del metal transportado [143]. En el presente estudio se determinaron las constantes cinéticas de CtpA haciendo uso de vesículas de membrana nativas enriquecidas con la bomba, este sistema de membranas nativas se usó anteriormente para el estudio cinético de CopB, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P de *E. hirae* [118].

La Figura 5-16 muestra la actividad enzimática en función de la concentración de  $\text{Cu}^+$ , obteniendo una curva con tendencia sigmoideal característica de las enzimas alostéricas. Este hecho se confirmó al hacer la linealización por el método de Lineweaver-Burk, obteniendo una curva con tendencia exponencial y no lineal [143]. Lo anterior sugiere que el  $\text{Cu}^+$  modula alostéricamente la reacción enzimática, porque la cinética es diferente a la de Michaelis-Menten [144]. Esta modulación puede presentarse por la unión del metal en otro sitio diferente, posiblemente el MDB presente en el N-terminal de CtpA, como ocurre con la ATP7A de humanos [134].

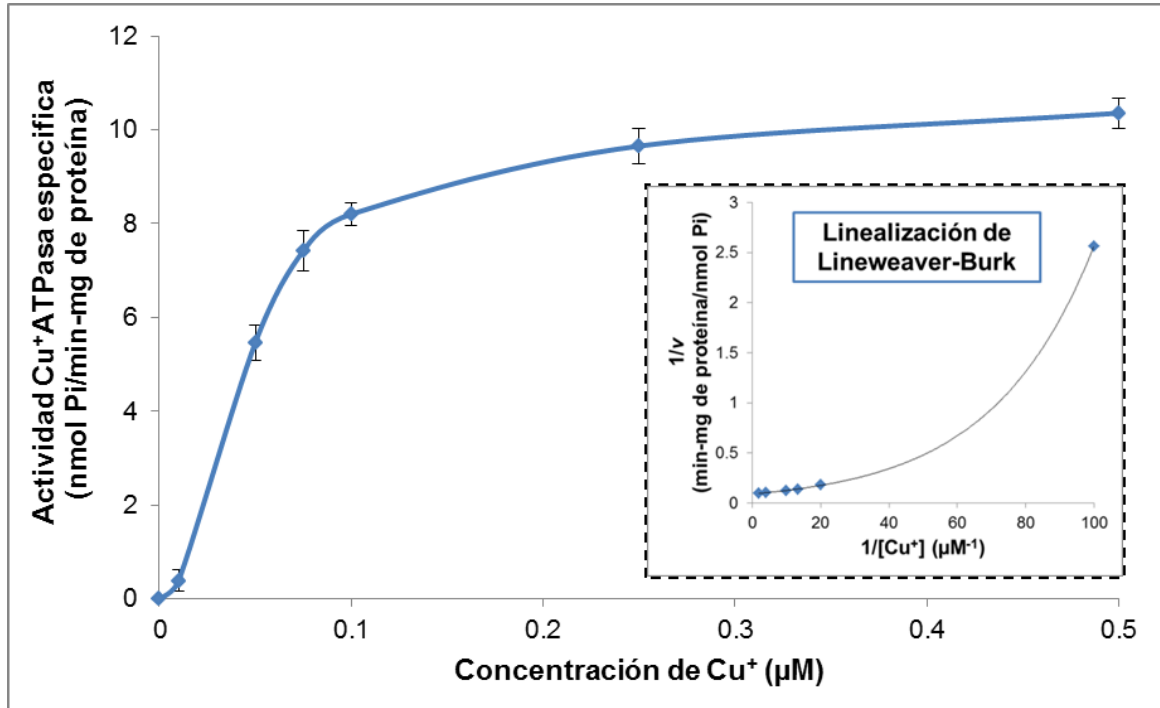
Para determinar las constantes cinéticas de CtpA hay que tener en cuenta que la velocidad de reacción de enzimas alostérica cumple con la siguiente ecuación:

$$v = \frac{V_{max} [S]^h}{K_{1/2} + [S]^h}$$

Donde,  $v$  es la velocidad de reacción enzimática,  $V_{max}$  velocidad máxima,  $[S]$  concentración de sustrato,  $h$  es el coeficiente de Hill y  $K_{1/2}$  constante cinética o constante de afinidad aparente (relacionada con la  $K_m$ , pero afectada por un segundo sustrato unido a un sitio diferente, como el ATP) [143].

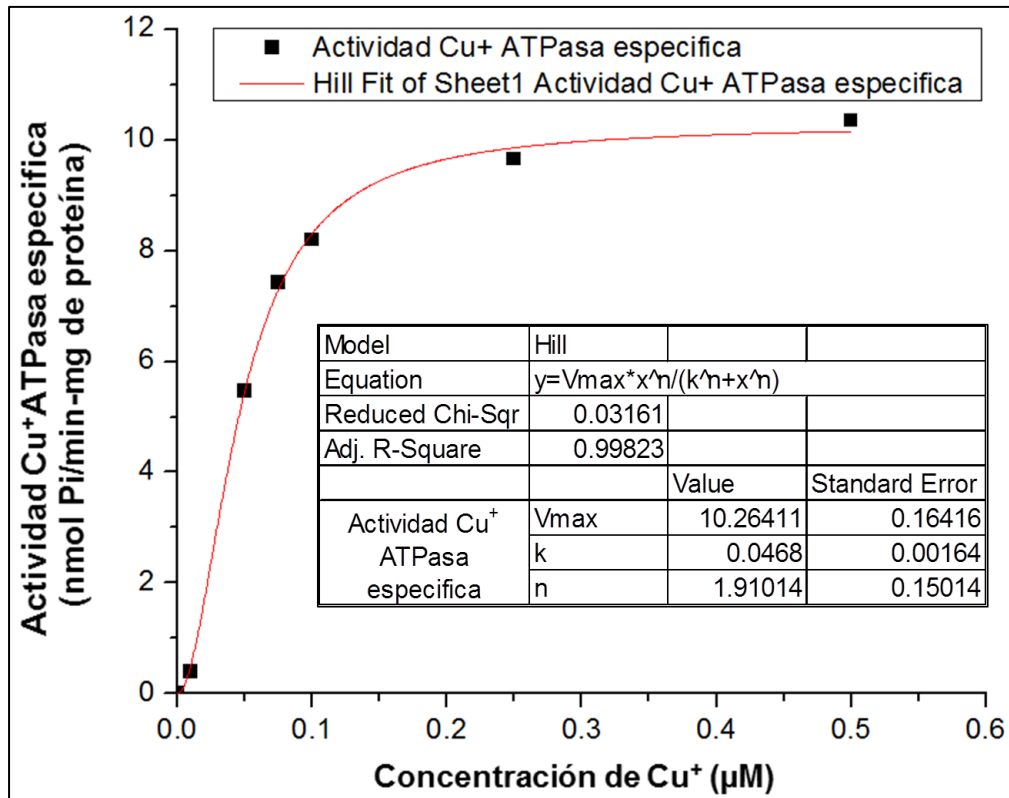
Las constantes cinéticas determinadas experimentalmente son valores aparentes [118], ya que no se dispone de proteína pura pura, sino de vesículas de membrana enriquecidas con CtpA, las que contienen proteínas de membrana propias de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, lo que indirectamente puede afectar los valores de actividad. El programa Origin (versión 8.5.1) permitió ajustar a un modelo de Hill los valores obtenidos del efecto de la concentración de  $\text{Cu}^+$  en la velocidad de reacción enzimática de CtpA (Figura 5-17). Los valores de las constantes cinéticas resultantes fueron  $V_{max}$  de 10,3 U/mg de proteína,  $K_{1/2}$  de  $4,68 \times 10^{-2}$   $\mu\text{M}$  y  $h$  de 1,91. El coeficiente de Hill obtenido para CtpA representa un efecto cooperativo positivo por parte del  $\text{Cu}^+$  en la enzima, indicando que el sustrato es capaz de actuar alostéricamente. Además, este valor se puede aproximar a 2 indicando que la enzima tiene mínimo dos sitios de unión al  $\text{Cu}^+$  y posiblemente el segundo sitio corresponda al MBD N-terminal que es capaz de favorecer alostéricamente la cinética enzimática.

**Figura 5-16:** Efecto de la concentración de  $\text{Cu}^+$  en la velocidad de reacción enzimática. La grafica muestra la cinética de reacción enzimática en función de la concentración de  $\text{Cu}^+$ , donde se muestra en un recuadro la linealización de Lineweaver-Burk. En cada condición se hicieron medidas por triplicado, las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos. Se uso la prueba T de student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ).



Los parámetros cinéticos de CtpA son comparables con la única ATPasa tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  de micobacterias descrita, CtpD de *M. smegmatis*, que transporta  $\text{Co}^{2+}$  con una  $V_{\text{max}}$  de 10,3 U/mg y una  $K_{1/2}$  de 4,1  $\mu\text{M}$  de  $\text{Co}^{2+}$  [131]. Por otro lado, al comparar con CopA, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa tipo P de *Archaeoglobus fulgus* ( $V_{\text{max}}=43$  U/mg y  $K_{1/2}=2,1$   $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^+$  [145]), se observa que la  $K_{1/2}$  de la bomba de *M. tuberculosis* tiene mayor afinidad por el  $\text{Cu}^+$ , y su  $V_{\text{max}}$  es menor pero se encuentra en el mismo orden de magnitud, además hay que considerar que al trabajar con la enzima sin purificar el valor de  $V_{\text{max}}$  siempre es menor. Al tener una baja  $K_{1/2}$  muestra que la enzima puede unirse al  $\text{Cu}^+$  cuando se encuentra a bajas concentraciones, manteniendo una velocidad de reacción enzimática apreciable comparada con su  $V_{\text{max}}$ . Funcionalmente se podría sugerir que CtpA transporta el  $\text{Cu}^+$  intracelular en concentraciones bajas, pero la capacidad de transporte por parte de la bomba no se puede determinar con los parámetros cinéticos determinados con la enzima impura.

**Figura 5-17:** Determinación de constantes cinéticas de CtpA. Usando el programa Origin 8.5.1 ajustando los resultados al modelo de Hill ( $R^2=0,998$ ).  $V_{max} = 10,3 \text{ U/mg}$ ;  $K_{1/2} = 4,68 \times 10^{-2} \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^+$ ; y  $h = 1,91$ .



La enzima ATP7A encargada del transporte del Cu intrafagosomal en el humano tiene las siguientes constantes cinéticas:  $V_{max} = 56 \text{ U/mg}$ ,  $K_{1/2} = 0,6 \mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^+$  y  $h = 5$  [134]. La constante  $K_{1/2}$  es muy parecida a la encontrada para CtpA, y en ambas enzimas se observa una cooperatividad positiva por parte del  $\text{Cu}^+$ , aunque es mayor en la bomba del humano por su alto número de MBD N-terminal [134]. Esta comparación muestra que la velocidad de transporte por parte de la bomba del humano es mayor, aunque el valor de CtpA tiene el mismo orden de magnitud y los ensayos no se hicieron con la enzima purificada. Además, para hacer una comparación apropiada entre enzimas se debe considerar la eficiencia de una enzima, la que se calcula con el parámetro cinético constante de recambio ( $K_{cat}$ ), y este no fue determinado porque se desconoce la concentración de CtpA en la membrana.

## 5.10 Precursores para la obtención del mutante de *M. tuberculosis* H37Ra $\Delta$ ctpA

Parte experimental de la construcción del mutante se realizó en el Laboratorio de Genética de Micobacterias de la Universidad de Zaragoza – España, durante una pasantía de investigación de tres meses realizada en el año 2011, bajo la coordinación del Doctor José Antonio Aínsa, especialista en el tema.

Las secuencias del gen *ctpA* en la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv y la avirulenta H37Ra son idénticas; por lo tanto para la construcción de un mutante defectivo en este gen se facilitan los problemas de bioseguridad al trabajar con la cepa avirulenta H37Ra. Además, es posible la construcción del mutante defectivo en el gen *ctpA* en *M. tuberculosis* H37Rv con los mismos útiles génicos usados para mutar la cepa avirulenta.

Como precursores para la obtención del mutante *M. tuberculosis* H37Ra  $\Delta$ ctpA por la técnica de Recombinería de micobacterias, se definieron el AES del gen *ctpA* y la cepa de Recombinería, que en este caso es *M. tuberculosis* H37Ra transformada con el plásmido pJV53 que permite una expresión controlada de los genes del micobacteriófago Che9c involucrados en el proceso de recombinación, lo que favorece el evento de recombinación homóloga [72]. El AES es una secuencia lineal de aproximadamente 2700 pb, del que se van a transformar 100 ng en la cepa de recombinería [82]. Se espera que después de 4-5 semanas de cultivo de las cepas transformadas aparezcan la colonias de la cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Ra  $\Delta$ ctpA (Figura 4-1c). Esta técnica de Recombinería de micobacterias presenta mayor eficiencia comparada con otras herramientas genéticas, y presenta mejores resultados al mutar genes en especies como *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* [146].

Los constructos de estos útiles génicos van a servir en el futuro para la caracterización de ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* por parte de nuestro grupo de investigación. Un mutante defectivo de *ctpA* sirve para contrastar los resultados obtenidos en este trabajo y además la cepa mutada (*M. tuberculosis* H37Rv  $\Delta$ ctpA) permitiría realizar ensayos de infección *in vivo* y así evaluar el papel de estas bombas en la virulencia y viabilidad celular.

### 5.10.1 Construcción del AES de *ctpA*

El AES se construyó con el fin de reemplazar el gen *ctpA* por el gen *hyg* de *Streptomyces hygroscopicus* que produce resistencia a la Hyg [88]. Para la construcción del AES se utilizaron dos estrategias: la primera implicó una clonación en el sistema pDH5-Hyg<sup>R</sup> y posterior PCR solapante, y la segunda una doble clonación en el vector pYUB854 (como se explica en la Figura 4-1a y b). Se logró obtener satisfactoriamente el AES con la segunda estrategia, sin embargo utilizando la primera solo se alcanzaron avances en el constructo. En ambos casos se presentaron dificultades en la obtención del AES; con la primera estrategia el principal problema fue la secuencia desconocida del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>, y con la segunda estrategia el problema fue el uso de cepas de *E. coli* que codificaban nucleasas endógenas lo que dificultaba la extracción y almacenamiento de plásmidos. Para sobrepasar los anteriores inconvenientes se hizo necesaria la estandarización de varias metodologías e implementarlas en el desarrollo de los constructos. En el caso de la clonación usando el vector pDH5-Hyg<sup>R</sup> se hizo necesario hacer digestiones enzimáticas sobre los productos de PCR de confirmación para asegurar la identidad del amplímero. Por otro lado, la extracción de plásmido a partir de cepas de *E. coli* HB101 se solucionó haciendo un tratamiento con previo con proteinasa K, tal como se muestra en la Nota 1 del Protocolo 7.

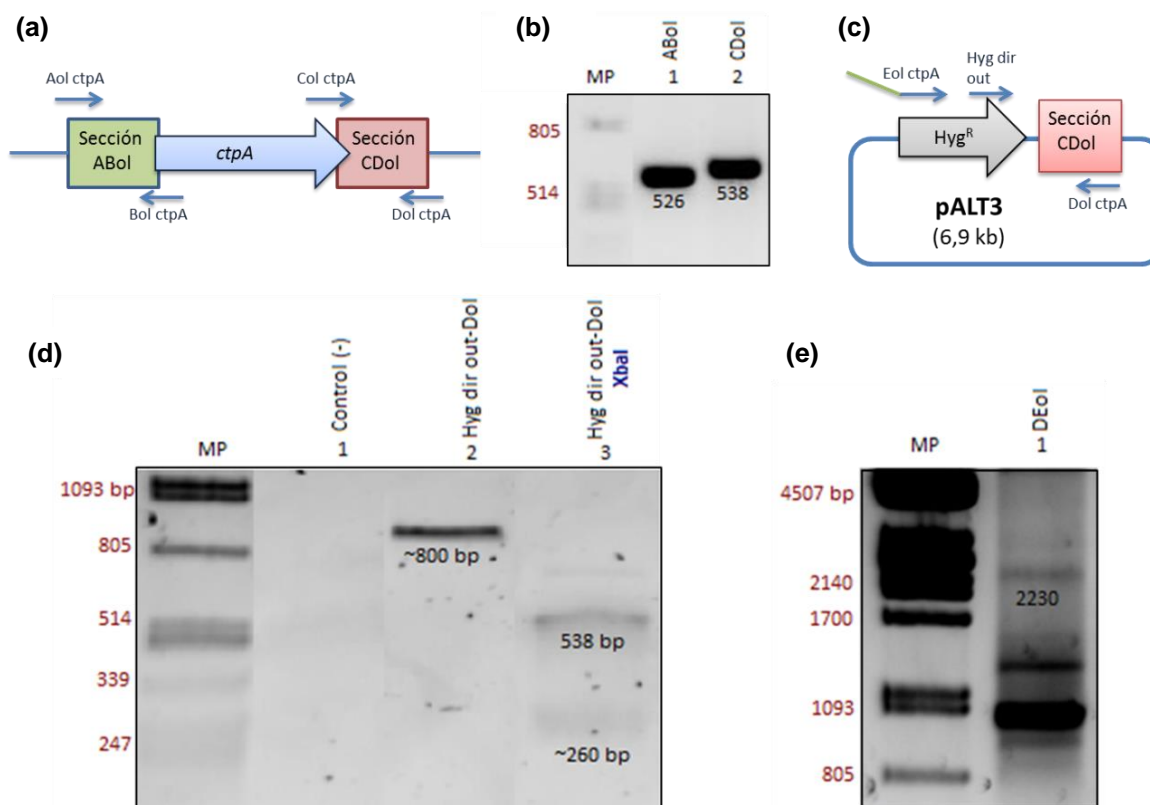
#### 5.10.1.1 Estrategia 1: PCR solapante usando el sistema pDH5-Hyg<sup>R</sup>

La estrategia para obtener el AES de *ctpA* se basa en una PCR solapante (Figura 4-1b), que requirió la clonación previa de un segmento de 538 bp de la región corriente abajo del gen *ctpA* en el vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>. El uso de esta metodología permite hacer una mutación de genes por sustitución, al carecer el vector de sitios RES flanqueando el cassette Hyg<sup>R</sup>, lo que permite obtener mutantes desmarcados. Además, permite hacer la construcción del AES utilizando cepas de *E. coli* que tengan actividad  $\gamma$ -resolvasa con genotipo endA<sup>-</sup>, como la DH5 $\alpha$  [106].

El proceso inició con la amplificación de las secciones corriente arriba y corriente abajo (ABol y CDol, respectivamente) de *ctpA* (Figura 5-18a y b). La sección CDol se clonó de forma dirigida entre los sitios de restricción XbaI y HindIII del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>. Las colonias recombinantes se detectaron por PCR usando los cebadores Hyg dir out y Dol *ctpA*, que producen un amplímero de aproximadamente 800 bp (Figura 5-18d). Para

confirmar la identidad de este amplímero se sometido a una digestión con XbaI (Figura 5-18d), resultando en la formación de dos bandas, 538 y 260 bp, las que aseguran la construcción del plásmido recombinante (pALT3). Esta última digestión se hizo porque se desconoce la secuencia del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>.

**Figura 5-18:** Útiles génicos usados para la obtención del AES mediante PCR solapante. **(a)** Esquema de las secciones ABol y CDol del gen *ctpA*. **(b)** Electroforesis del producto de PCR que amplifica las secciones ABol (Carril 1) y CDol (Carril 2) del gen *ctpA*. **(c)** Esquema de la PCR de confirmación Hyg dir out-Dol y obtención del amplímero DEol. **(d)** Producto de la PCR de comprobación (Carril 2) y digestión del producto con XbaI (Carril 3). **(e)** Obtención del amplímero DEol usando como molde pALT3 (Carril 1), necesario para generar el AES por PCR solapante.



El plásmido pALT3 se usó como molde en otra PCR que con los cebadores Eol ctpA y Dol ctpA, amplificando todo el cassette de Hyg<sup>R</sup>, la sección CDol, y una región de 18 bp homologa con la sección ABol. El tamaño del amplímero es de aproximadamente 2230 bp (Figura 5-18e), esta PCR no produce un amplímero único debido al tamaño del cebador Eol ctpA (39 bp), aumentando las posibilidades de complementación no



específica y favoreciendo la formación de productos de menor longitud. Para esta PCR se variaron condiciones como la temperatura de anillamiento, cantidad de molde, uso del plásmido pALT3 linealizado y la adición de un solo cebador para enriquecer la muestra con un producto y una posterior adición del segundo cebador, también se hicieron ciclos con temperatura diferencial pero no se logró obtener el producto deseado como mayoritario.

Debido a la baja cantidad del amplímero DEol para hacer la PCR solapante final, se planteó clonar este segmento en el vector pGEM-T easy, y así obtener la cantidad necesaria del segmento DEol bien sea por PCR o por digestión del nuevo plásmido recombinante, para luego hacer la PCR solapante y obtener el AES deseado.

El principal inconveniente de la construcción del AES por esta estrategia fue la secuencia desconocida del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>, dificultando así su manipulación y el planteamiento de posibles soluciones para obtener el segmento DEol en mayor proporción y continuar con el procedimiento del constructo del AES. Aun así al haber llegado a producir el segmento DEol es un gran avance en la estrategia y los próximos pasos para la obtención del AES no es necesario conocer la secuencia del vector pDH5-Hyg<sup>R</sup>.

#### **5.10.1.2 Estrategia 2: Doble clonación en el vector pYUB854**

La doble clonación en el sistema pYUB854 permite la obtención del AES con sitios resolvablea flanqueando el cassette de Hyg<sup>R</sup>, y facilitando así la obtención de mutantes desmarcados. Este método produce una mutación por delección del gen *ctpA* y no por sustitución, como lo hace el AES obtenido por la técnica de PCR solapante.

La desventaja principal del uso del sistema pYUB854 es la manipulación de cepas de *E. coli* que no presenten el genotipo RecA+, es decir, que no deben tener actividad  $\gamma\delta$ -resolvablea. Se emplearon las cepas HB101 y Mc1061 que a pesar de tener el genotipo RecA- codifican un gran número de endonucleasas, dificultando la extracción de los plásmidos a partir de ellas. Finalmente, se utilizó la cepa HB101 para clonar este vector, ya que el uso de proteinasa K permitía extraer plásmidos y almacenarlos por periodos de tiempo mayores sin interferencia de las endonucleasas endógenas de la bacteria con los procesos de digestión con enzimas de restricción.

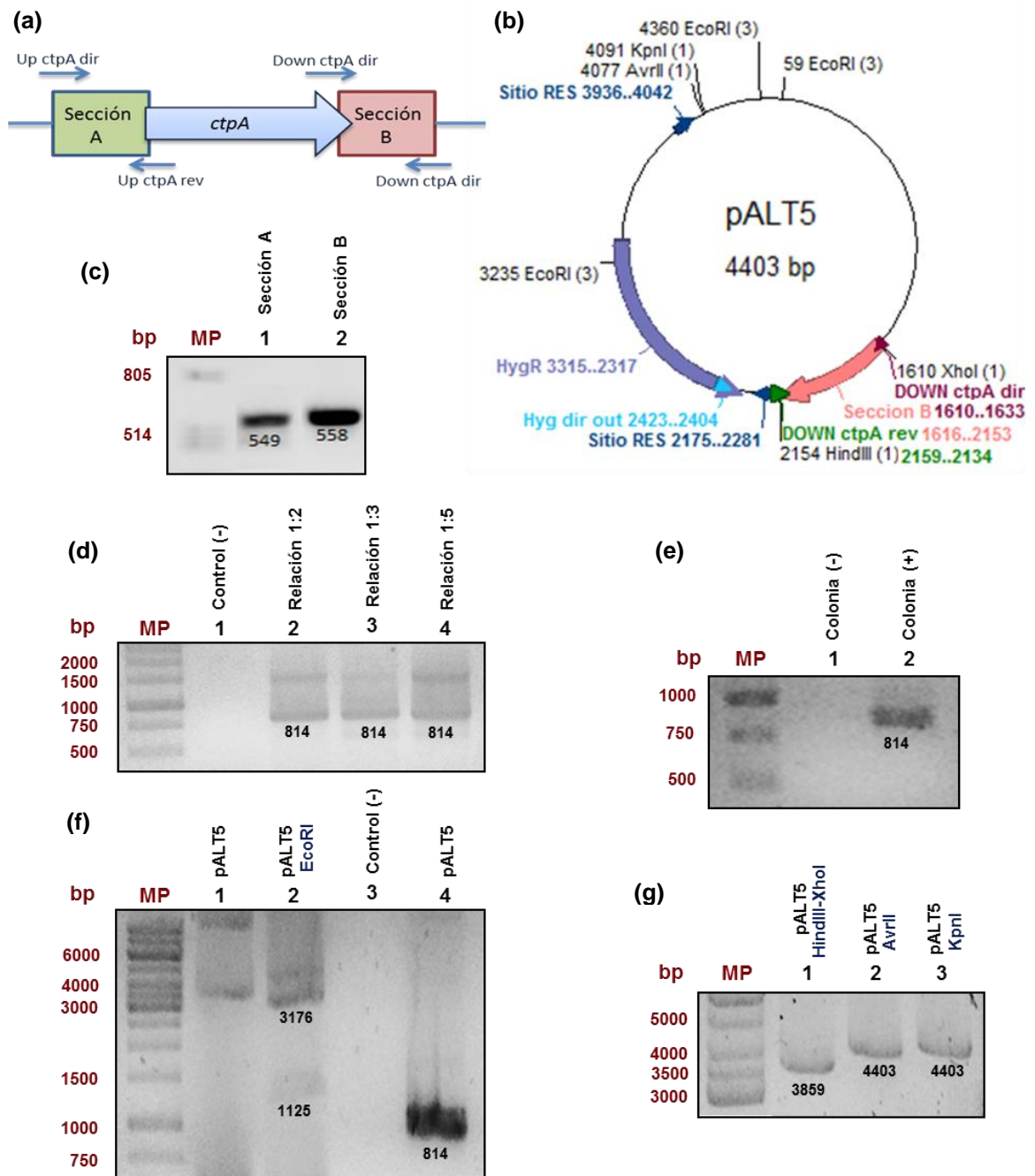
Inicialmente se amplificaron por PCR los segmentos corriente arriba (sección A, 549 bp) y corriente abajo (sección B, 558 bp) del gen *ctpA*, tal como se muestra en la Figura 5-19a y c. Las secciones amplificadas se encuentran flanqueadas por sitios de restricción diferentes, ya que es necesario hacer clonaciones dirigidas para que ambas secciones queden en la misma dirección con la que venían en el genoma, de no ser así la cepa mutante no se forma. La sección A esta flanqueada por los sitios *AvrII* y *KpnI*, y la sección B por *XhoI* y *HindIII*.

La sección B fue clonado entre los sitios *HindIII* y *XhoI* de pYUB854. Los productos de ligación obtenidos con tres diferentes relaciones molares vector: inserto (1:2, 1:3 y 1:5) fueron confirmados por PCR usando los cebadores *Hyg* dir out y *Down ctpA* dir que anillan en el vector y en el inserto; en todos los casos se obtuvieron resultados positivos (Figura 5-19d), indicando que el plásmido recombinante fue producido satisfactoriamente. La transformación del producto de ligación con la relación molar 1:5 tuvo una eficiencia de 2917 UFC/ $\mu$ g de DNA, y de todas las colonias se identificó una como positiva (Figura 5-19e). El plásmido recombinante construido fue nombrado como pALT5, su mapa se muestra en la Figura 5-19b. La confirmación del plásmido pALT5 fue hecha mediante PCR y digestión con *EcoRI* (Figura 5-19f), esta última ayuda a diferenciar fácilmente entre el recombinante y el vector vacío (pYUB854), porque la enzima corta tres veces a pALT5 y cuatro veces a pYUB854, donde la banda de mayor tamaño en el recombinante es de 3176 bp mientras que en el vector vacío es de 1557 bp.

El recombinante pALT5 fue analizado por mapeo de restricción con las enzimas *AvrII*, *KpnI* y la doble digestión con *HindIII*-*XhoI* (Figura 5-19g), las primeras dos enzimas sirven para demostrar el tamaño del plásmido (4403 bp) y además se confirma que pALT5 se puede usar para la segunda clonación, de la sección corriente arriba del gen *ctpA*, entre los sitios *AvrII* y *KpnI*. En la doble digestión para liberar el inserto, pozo 1 de la Figura 5-19g, se observa que la banda de mayor tamaño (3859 bp) es menor comparada con la banda obtenida con la digestión con *AvrII* y *KpnI*, demostrando que hay una pérdida de 544 bp correspondiente al inserto clonado.

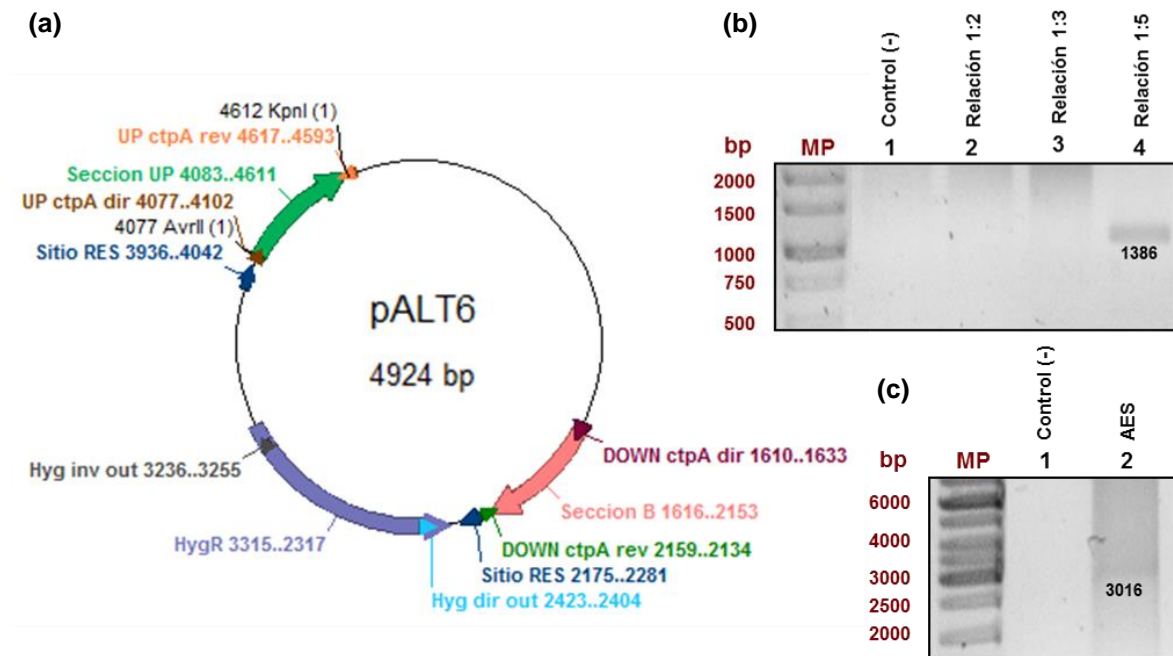
El plásmido pALT5 se utilizó para la segunda clonación entre los sitios *AvrII* y *KpnI* de la sección A. Al analizar por PCR los productos de ligación solo se obtuvo un resultado positivo al hacer una relación molar de vector e inserto de 1:5, produciendo una banda de

**Figura 5-19:** Construcción de pALT5, recombinante pYUB854:sección B. **(a)** Esquema de las secciones A y B del gen *ctpA*. **(b)** Mapa de pALT5 con cebadores y sitios de restricción empleados para su análisis. **(c)** Electroforesis del producto de PCR que amplifica las secciones A (Carril 1) y B (Carril 2). **(d)** PCR de confirmación de los productos de ligación, evaluado las tres diferentes relaciones molares de vector e inserto: 1:2 (Carril 2); 1:3 (Carril 3); y 1:5 (Carril 4). **(e)** PCR de confirmación de colonia recombinante (Carril 2). **(f)** Confirmación de pALT5 por digestión con *EcoRI* (Carril 2) y PCR (Carril 4). **(g)** Mapeo de restricción de pALT5 con las enzimas *HindIII-XhoI* (Carril 1), *AvrII* (Carril 2) y *KpnI* (Carril 3). El mapeo de restricción *in silico* de pALT5 se muestra en la Figura A-3 (Anexos A).



1386 bp (Figura 5-20b). El mapa del plásmido recombinante construido se muestra en la Figura 5-20a, y fue nombrado como pALT6. Este producto de ligación no fue transformado, pero si fue utilizado como molde para amplificar el AES completo de 3016bp (Figura 5-20c) utilizando los cebadores Down ctpA dir y Up ctpA rev. Este producto de PCR servirá como molde para nuevas reacciones y producir el AES en la cantidad necesaria para ser transformado en las cepas de recombinería de *M. tuberculosis*.

**Figura 5-20:** Construcción de pALT6, recombinante pALT5:sección A. **(a)** Mapa de pALT5 con cebadores y sitios de restricción empleados para su análisis. **(b)** PCR de confirmación de producto de ligación (Carril 4). **(c)** Amplificación del AES completo por PCR, partiendo del producto de ligación (Carril 2).



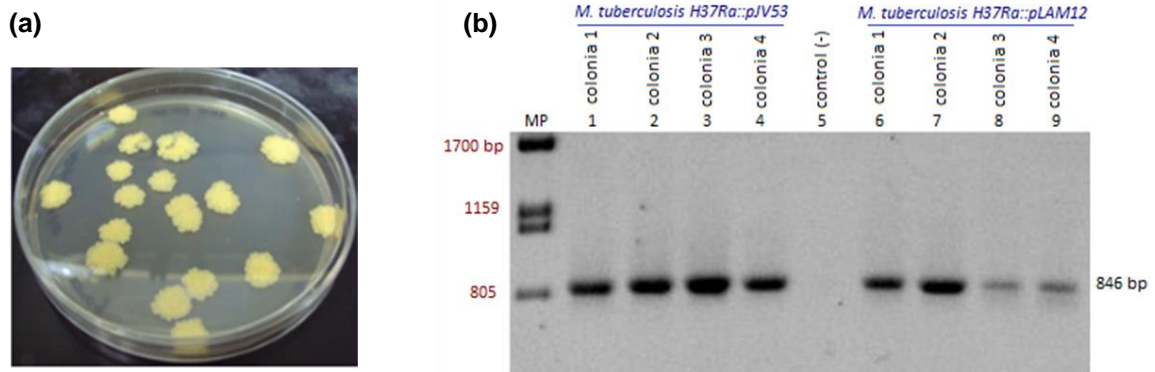
### 5.10.2 Obtención de la cepa de recombinería de *M. tuberculosis* H37Ra

La transformación de la cepa silvestre de *M. tuberculosis* H37Ra con 250 ng del plásmido pJV53 permitió la obtención de la cepa de recombinería, la cual expresa las proteínas de recombinación bajo la inducción con acetamida. Los bacilos transformados con este plásmido aumentan la frecuencia de recombinación homóloga, resolviendo el problema de manipulación genética que tienen este género de bacterias por las altas tasas de

recombinación ilegítima. El control negativo de recombinación se hizo transformando *M. tuberculosis* H37Ra con plásmido pLAM12, el que se usó como esqueleto para construir pJV53 y no tiene los genes de recombinación gp60 y gp61.

Los recombinantes *M. tuberculosis* H37Ra:pJV53 y pLAM12 se seleccionaron mediante su cultivo en medios solidos suplementados con Km (Figura 5-21a) y fueron confirmados mediante PCR en colonia con los cebadores que amplifican una región del cassette de Km Tn903 (Figura 5-21b). La PCR mostró el resultado esperado al identificarse bandas de 846 pb para los recombinantes de ambos plásmidos; además el control negativo de una colonia de la cepa silvestre de *M. tuberculosis* H37Ra no presentó esta amplificación.

**Figura 5-21:** Construcción de cepa de recombinería de *M. tuberculosis* H37Ra. **(a)** Colonias obtenidas de la transformación de pJV53 en *M. tuberculosis* H37Ra. **(b)** Confirmación de las cepas de recombinería por PCR de colonia, amplificando un segmento de 846bp del cassette de resistencia a Km Tn903. Carriles: MP, marcador de peso molecular; Carril: 1-4, colonias de *M. tuberculosis* H37Ra:pJV53; Carril: 5, control negativo (cepa silvestre de *M. tuberculosis* H37Ra cepa silvestre); Carril: 6-9, colonias con pLAM12.



Para la obtención del mutante defectivo en el gen *ctpA* de *M. tuberculosis* H37Ra solo falta transformar la cepa de recombinería con 100 ng del AES de *ctpA*, ya construido por la estrategia de la doble clonación en el sistema pYUB854. Debido a que la comprobación del genotipo se hace por Southern Blot, se proseguirá con la construcción cuando se cuente con las herramientas necesarias para ello. Finalmente, cabe aclarar que los mismos plásmidos usados en el presente estudio se han usado para obtener otras cepas de recombinería, usadas para la mutación de genes en cepas de

*M. tuberculosis* H37Rv y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, en el laboratorio de Genética de Micobacterias (Unizar).

## 6. Conclusiones y perspectivas

### 6.1 Conclusiones

El análisis bioinformático de las ATPasas tipo  $P_{1B}$  de *M. tuberculosis* H37Rv mostro una aproximación sobre que cationes de metales de transición pueden ser transportados a través de la membrana plasmática. Se encontró que las bombas CtpA, CtpB y CtpV podrían transportar  $Cu^+$ ; CtpC y CtpG  $Zn^{2+}$ ; y CtpD y CtpJ  $Co^{2+}$ .

El gen *ctpA* de *M. tuberculosis* fue amplificado, clonado y expresado en el vector de expresión micobacteriano pMV261 el que presenta el promotor *hsp60* que puede ser inducido por calentamiento. Dos cepas diferentes de micobacterias se utilizaron para la transformación del recombinante pALT4: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y *M. tuberculosis* H37Ra.

Los ensayos de toxicidad frente a metales pesados mostro un aumento en la tolerancia al  $Cu^{2+}$  extracelular por parte de la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando CtpA de *M. tuberculosis*. Además, la presencia de iones  $Cu^+$  y  $Ni^{2+}$  estimulo la actividad ATPasa de las vesículas de membrana enriquecidas con CtpA. Sugiriendo que la bomba podría comportarse principalmente como una  $Cu^+$  ATPasa tipo P.

Los parámetros cinéticos de CtpA fueron determinados midiendo la actividad  $Cu^+$  ATPasa producida por la bomba bajo diferentes condiciones. Se encontró que la enzima presenta una actividad óptima cuando en la reacción se utilizan 4  $\mu$ g de proteína de vesículas de membrana, un pH de 7,5 y una temperatura de 37 °C. Las constantes cinéticas asociadas a CtpA son:  $V_{max}$  de 10,3 U/mg,  $K_{1/2}$  de  $4,68 \times 10^{-2}$   $\mu$ M de  $Cu^+$  y  $h$  de 1,91. Los valores obtenidos son comparables con los encontrados en otras  $Cu^+$  ATPasas tipo P.

La construcción de los útiles génicos como el recombinante de sobreexpresión de *E. coli*, el AES de *ctpA* y la cepa de recombinaría de *M. tuberculosis* H37Ra, permitirán contrastar y dar mayor validez los resultados obtenidos en el presente trabajo.

## 6.2 Perspectivas

A corto plazo construir la cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Ra haciendo uso de los precursores génicos construidos en el presente trabajo. Hacer ensayos de toxicidad y ATPasa dependiente de metales pesados para contrastar y complementar los resultados obtenidos.

A mediano plazo se pretende plantear un posible papel de CtpA en la infección tuberculosa. Además los útiles génicos permiten la construcción de la cepa mutante defectiva en el gen *ctpA* en la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv, y así hacer ensayos de infección *in vivo*, con el fin de conocer el potencial uso terapéutico de esta enzima.

A largo plazo se espera que esta investigación contribuya al conocimiento de los mecanismos responsables del éxito del bacilo tuberculoso y en colaboración con otras líneas de investigación poder llegar al diseño racional de nuevos antituberculosos necesarios para erradicar el problema mundial causado por la enfermedad.



# A. Anexo A: Información de marcadores de peso molecular, vectores y recombinantes

**Figura A-1:** Marcadores de peso molecular empleado a lo largo del presente trabajo. De izquierda a derecha: GeneRuler 100 bp DNA ladder y 1 kb DNA ladder y el marcador generado por la digestión de DNA del fago  $\lambda$  con PstI. Finalmente Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder; de Thermo Scientific.

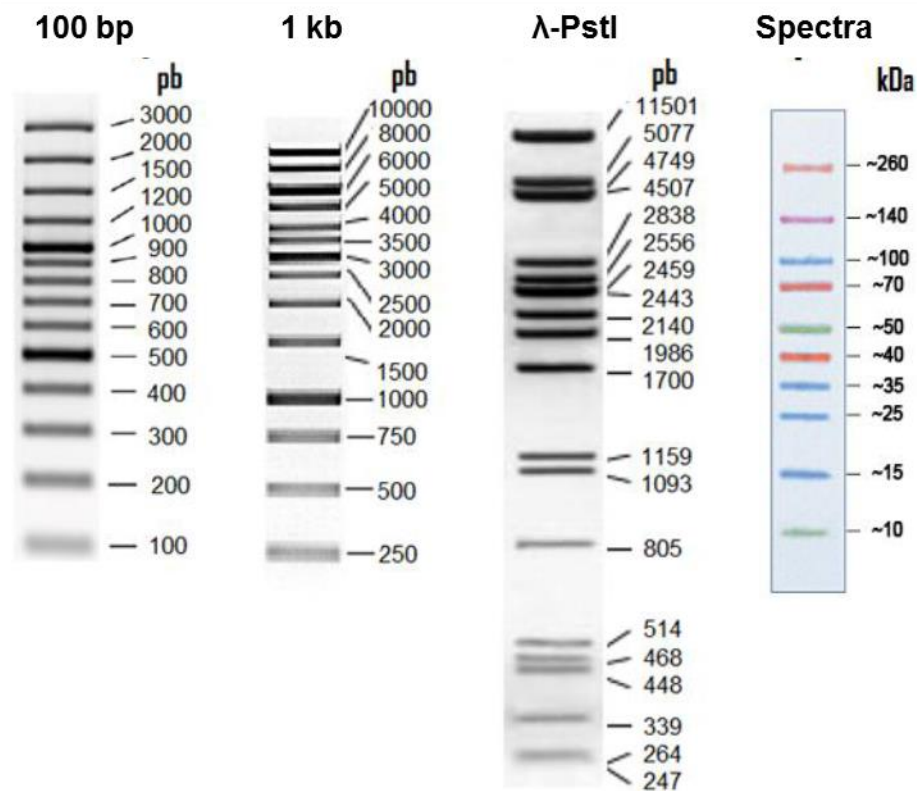
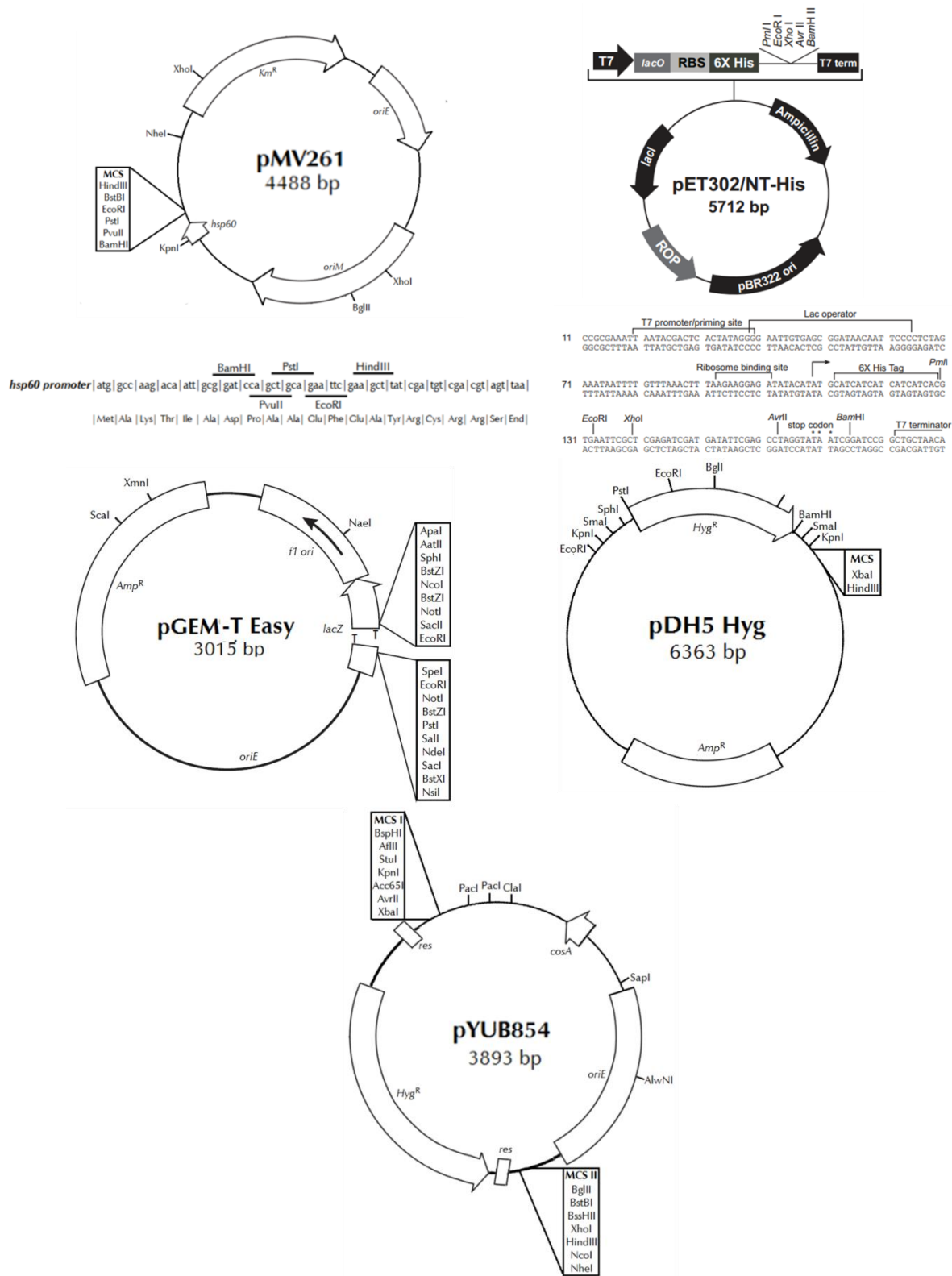
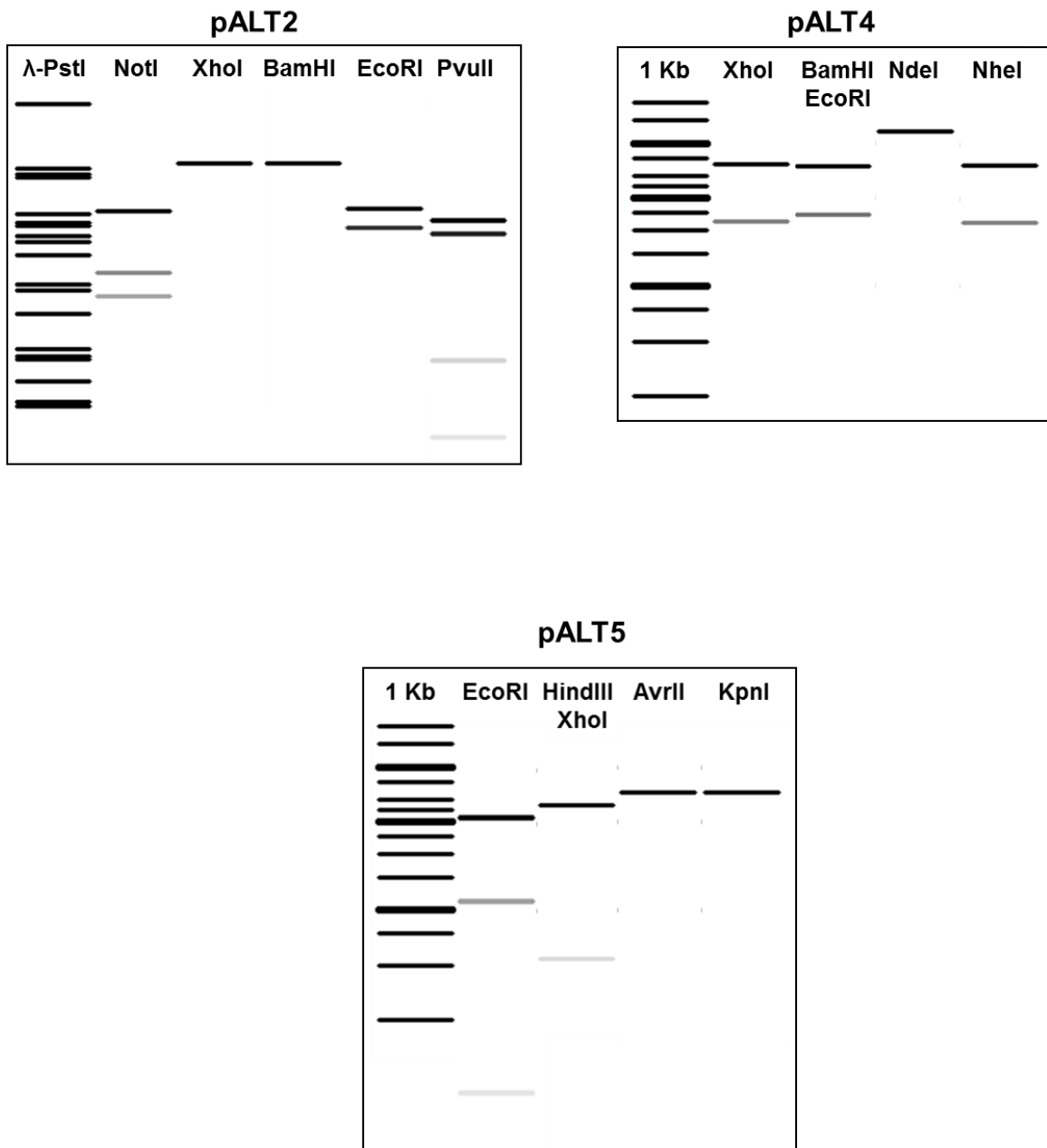


Figura A-2: Vectores empleados a lo largo de la investigación.



**Figura A-3:** Mapeos de restricción de los plásmidos recombinantes construidos en el presente trabajo.



**Figura A-4:** Alineamiento del resultado de secuenciación de pALT4 y la secuencia esperada. El primer resultado es la secuencia obtenida al usar el cebador PMV comp down:

```

secuencia      AATTCTGATCGGCGGGTCTGGCAATCATGGTGTGGCGAAGCGCCTCTGGTCTCGGCC 85
esperado      AATTCTGATCGGCGGGTCTGGCAATCATGGTGTGGCGAAGCGCCTCTGGTCTCGGCC 120
*****

secuencia      GAGACGGATGCGGTGCGCGCTGAGCCGATATCGTGTGGCCGACAACGCATCACGCGG 145
esperado      GAGACGGATGCGGTGCGCGCTGAGCCGATATCGTGTGGCCGACAACGCATCACGCGG 180
*****

secuencia      ACGACGGCGGGTCATTTGTGGCCACCGACGGTCCGCAGCCTAGCGGGTATCGCCAA 205
esperado      ACGACGGCGGGTCATTTGTGGCCACCGACGGTCCGCAGCCTAGCGGGTATCGCCAA 240
*****

secuencia      ATTTGCGCAACCGCAAGCTGTTTGAGACCACGAAGAAGATGAGAAGCCATGGCCGCAC 265
esperado      ATTTGCGCAACCGCAAGCTGTTTGAGACCACGAAGAAGATGAGAAGCCATGGCCGCAC 300
*****

secuencia      CGGCCACCAGGGGGTTGAGCAGTCCGGCAGCGGCACGGGAATCGCGGCGATGTTGTATC 325
esperado      CGGCCACCAGGGGGTTGAGCAGTCCGGCAGCGGCACGGGAATCGCGGCGATGTTGTATC 360
*****

secuencia      CGAATGCCAGACCATGTTGAGTTTGACGGTGCATCGTGGCCCTTGCCAGGTCAAGCG 385
esperado      CGAATGCCAGACCATGTTGAGTTTGACGGTGCATCGTGGCCCTTGCCAGGTCAAGCG 420
*****

secuencia      CAAGGGGTACAACGTCGAGGTGGTCGCGGACCAAGATGATGTCGGCGGCACCGATCGCGA 445
esperado      CAAGGGGTACAACGTCGAGGTGGTCGCGGACCAAGATGATGTCGGCGGCACCGATCGCGA 480
*****

secuencia      CGTCCGTGCCGCGCCGATGGCCATGCCTAGATCGGCACGGGCCAGTGCGGGTCCGTCGT 505
esperado      CGTCCGTGCCGCGCCGATGGCCATGCCTAGATCGGCACGGGCCAGTGCGGGTCCGTCGT 540
*****

secuencia      TGATGCCGTACCGACCATGGCGACGACATGTCCGCGGTCGCGTAGCTGCTCGATGACAT 565
esperado      TGATGCCGTACCGACCATGGCGACGACATGTCCGCGGTCGCGTAGCTGCTCGATGACAT 600
*****

secuencia      CGACCTTGCCCTCCGGCAGGATGTCGGCGATCACCTCGTCGATGCCGACGCGAGTAGCCA 625
esperado      CGACCTTGCCCTCCGGCAGGATGTCGGCGATCACCTCGTCGATGCCGACGCGAGTAGCCA 660
*****

secuencia      CGGCCGCCGCCGATTCGGGATTGTCACCGGTCAACAGCATGGTGCAGACACGATCGG 685
esperado      CGGCCGCCGCCGATTCGGGATTGTCACCGGTCAACAGCATGGTGCAGACACGATCGG 720
*****

secuencia      CCAGGGCGGCCACGGCGTCTCGCGCGAGTCTTGACGGCGTCGGCGACCGCGATGACCC 745
esperado      CCAGGGCGGCCACGGCGTCTCGCGCGAGTCTTGACGGCGTCGGCGACCGCGATGACCC 780
*****

```

|           |   |      |
|-----------|---|------|
| secuencia | CGCATGGTTCGCCGTCGACCTCGACGAATACGGCCGTCTCACCCAGCGATTTCGGCGTGCC | 805  |
| esperado  | CGCATGGTTCGCCGTCGACCTCGACGAATACGGCCGTCTCACCCAGCGATTTCGGCGTGCC | 840  |
|           | *****   |      |
| secuencia | GCCGGGCCGCGCGCATGTTGGGGTGGCAGCAGGACCCGATCCATGACGGTTTGCCCA     | 865  |
| esperado  | GCCGGGCCGCGCGCATGTTGGGGTGGCAGCAGGACCCGATCCATGACGGTTTGCCCA     | 900  |
|           | *****   |      |
| secuencia | CCCGTACCGCCCGCCGGACACGGTGCCGCTGACGCCGCGGCCGGGTATGGCGCGAAAGT   | 925  |
| esperado  | CCCGTACCGCCCGCCGGACACGGTGCCGCTGACGCCGCGGCCGGGTATGGCGCGAAAGT   | 960  |
|           | *****   |      |
| secuencia | CGGTGACCGGTCTCGCCGAGTCGTTGCCGCGCGATCGCGAGCGCCACCGAGTGCTCGG    | 985  |
| esperado  | CGGTGACCGGTCTCGCCGAGTCGTTGCCGCGCGATCGCGAGCGCCACCGAGTGCTCGG    | 1020 |
|           | *****   |      |
| secuencia | ACGCGGCTTCCACGGTCGCGGCCAAG-CGAGCACCTGGTCGGCCTCCAGCCCGGTGCC    | 1044 |
| esperado  | ACGCGGCTTCCACGGTCGCGGCCAAGCGAGCACCTGGTCGGCCTCCAGCCCGGTGCC-CC  | 1079 |
|           | ***** **  |      |

El segundo resultado es la secuencia obtenida al usar el cebador PMV comp up:

|           |  |     |
|-----------|--|-----|
| secuencia | GGTTGCCGTCACCCGGTGACCCCGG-TTTCATCCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAAT | 84  |
| esperado  | GGTTGCCGTCACCCGGTGACCCCGGTTTCATCCCCGATCCGGAGGAATCACTTCGCAAT  | 120 |
|           | *****  |     |
| secuencia | GGCCAAGACAATTGCGGATCCGATGACGACGGCCGTGACCGGTGAACACCACGCGAGTGT | 144 |
| esperado  | GGCCAAGACAATTGCGGATCCGATGACGACGGCCGTGACCGGTGAACACCACGCGAGTGT | 180 |
|           | *****  |     |
| secuencia | GCAGCGGATACAACCTCAGAATCAGCGGGATGTCGTGCTCTGCGTGCGCCACCGTGTGGA | 204 |
| esperado  | GCAGCGGATACAACCTCAGAATCAGCGGGATGTCGTGCTCTGCGTGCGCCACCGTGTGGA | 240 |
|           | *****  |     |
| secuencia | ATCGACCCTCAACAAGCTGC-GGGGGTTCGGGCAGCTGTGAACTTCGGCACCCGGGTGCC | 263 |
| esperado  | ATCGACCCTCAACAAGCTGCCGGGGTTCGGGCAGCTGTGAACTTCGGCACCCGGGTGCC  | 300 |
|           | *****  |     |
| secuencia | AACCATCGACACCAGCGAGGCGGTGACGCTGCCGCGCTGTGCCAGGCGGTCCGCCGCGC  | 323 |
| esperado  | AACCATCGACACCAGCGAGGCGGTGACGCTGCCGCGCTGTGCCAGGCGGTCCGCCGCGC  | 360 |
|           | *****  |     |
| secuencia | GGGCTATCAGGCCGATCTGTGCACGGATGACGGTCGGAGCGCGAGTGATCCGGACGCCGA | 383 |
| esperado  | GGGCTATCAGGCCGATCTGTGCACGGATGACGGTCGGAGCGCGAGTGATCCGGACGCCGA | 420 |
|           | *****  |     |
| secuencia | CCACGCTCGACAGCTGCTGATCCGGCTAGCGATCGCCGCGTGTGTTTGTGCCCGTGGC   | 443 |
| esperado  | CCACGCTCGACAGCTGCTGATCCGGCTAGCGATCGCCGCGTGTGTTTGTGCCCGTGGC   | 480 |
|           | *****  |     |

|                       |   |
|-----------------------|---|
| secuencia<br>esperado | CGATCTGTCGGTGATGTTTGGGGTCGTGCCTGCCACGCGCTTACC GGCTGGCAGTGGGT 503<br>CGATCTGTCGGTGATGTTTGGGGTCGTGCCTGCCACGCGCTTACC GGCTGGCAGTGGGT 540<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | GCTAAGCGCGCTGGCACTGCCGGTCGTGACCTGGGCGGCGTGCCGTTTACC GGCTTGC 563<br>GCTAAGCGCGCTGGCACTGCCGGTCGTGACCTGGGCGGCGTGCCGTTTACC GGCTTGC 600<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | GATGCGCAACGCCCGCCACCACGCCGCTCCATGGAGACGCTAATCTCGGTGCGTATCAC 623<br>GATGCGCAACGCCCGCCACCACGCCGCTCCATGGAGACGCTAATCTCGGTGCGTATCAC 660<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | GGCCGCCACGATCTGGTCGCTGTACACCGTCTTCGGCAATCACTCGCCCATCGAGCGCAG 683<br>GGCCGCCACGATCTGGTCGCTGTACACCGTCTTCGGCAATCACTCGCCCATCGAGCGCAG 720<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | CGGCATATGGCAGGCGCTGCTGGGAAGCGATGCTATTTATTTGAGGTCGCGGGCGGTGT 743<br>CGGCATATGGCAGGCGCTGCTGGGAAGCGATGCTATTTATTTGAGGTCGCGGGCGGTGT 780<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | CACGGTGTTCTGTGCTGGTGGGGCGGTATTTGAGGCGCGCCAAAGTCGAGGCGGGCAG 803<br>CACGGTGTTCTGTGCTGGTGGGGCGGTATTTGAGGCGCGCCAAAGTCGAGGCGGGCAG 840<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | TGCGCTGAGAGCCTTGGCGGCGCTGAGCGCCAAGGAAGTAGCCGTCCTGCTACCGGATGG 863<br>TGCGCTGAGAGCCTTGGCGGCGCTGAGCGCCAAGGAAGTAGCCGTCCTGCTACCGGATGG 900<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | GTCGGAGATGGTCATCCCGCCGACGAACTCAAAGAACAGCAGCGCTTCGTGGTGCGTCC 923<br>GTCGGAGATGGTCATCCCGCCGACGAACTCAAAGAACAGCAGCGCTTCGTGGTGCGTCC 960<br>*****   |
| secuencia<br>esperado | AGGGCAGATAGTTGCCCGCCGACGGCTCGCCGTCGACGGGTCCGCTGCGGTGACATGAG 983<br>AGGGCAGATAGTTGCCCGCCGACGGCTCGCCGTCGACGGGTCCGCTGCGGTGACATGAG 1020<br>*****  |
| secuencia<br>esperado | CGCGATGACCGGCGAGGCCAAACCGACCCGGGTGCGTCCGGGGGGGAGGTCATCGGSCG 1043<br>CGCGATGACCGGCGAGGCCAAACCGACCCGGGTGCGTCCGGGGGGGAGGTCATCGGCGG 1080<br>***** *   |
| secuencia<br>esperado | CACYACAGTGCTTGACGGC -GGCTGATCGTGACGGCGCCGCGT -GGCGCTCGACACC - 1099<br>CACCACAGTGCTTGACGGC -GGCTGATCGTGACGGCGCCGCGT -GGCGCTCGACACC - 1139<br>*** ***** ***** ***** ***** ***** ***** ***** |
| secuencia<br>esperado | AGT -CGCCGATTG -TCGCTCGATGGAGCA - - - - -GCSCAA -GGCYGMCAAAAAGG 1147<br>AGTTCGCCGGAATGGTCCGCTCGTTGAGCAAGCGCAGGCGCAAAAAGGCCGACGCACAGC 1199<br>*** ***** ** ** * ***** ** *** ** * * * *    |

## B. Anexo: Protocolos

**Protocolo 1.** Tinción diferencial de Ziehl-Neelsen: Se usa para identificar bacterias ácido-alcohol resistente como las micobacterias.

- a. Preparar un frotis de cada una de las cepas micobacterianas a ensayar, sobre un portaobjetos.
- b. Fijar por calentamiento.
- c. Cubrir la preparación con unas gotas de fuscina fenicada filtrada.
- d. Calentar hasta emisión de vapores tres veces durante 5 min, sin permitir ebullición.
- e. Dejar enfriar y lavar con abundante agua.
- f. Cubrir durante 3 min con HCl al 3% en etanol.
- g. Lavar con agua.
- h. Cubrir con unas gotas de azul de metileno durante 1 min.
- i. Lavar con agua y dejar secar al aire.
- j. Observar al microscopio.

**Protocolo 2.** Electroforesis de DNA.

- a. Disolver por calentamiento la cantidad adecuada de agarosa en el buffer TBE o TAE 1X (entre 0,7 y 2,5 %).
- b. Enfriar la agarosa hasta 55-60 °C. Añadir bromuro de etidio (concentración final 0,5 µg/mL).
- c. Verter la agarosa fundida sobre el molde y colocar inmediatamente el peine.
- d. Retirar cuidadosamente el peine y los tapones o cinta adhesiva.
- e. Colocar el gel en la cámara de electroforesis llena del buffer 1X.
- f. Mezclar las muestras de DNA con 0,2 volúmenes de buffer de carga 6X y sembrar en los pozos del gel.
- g. Conectar los electrodos y aplicar un voltaje constante de 100 V durante 35 a 60 min, dependiendo del Tamaño del fragmento esperado.
- h. Visualizar el gel bajo luz UV (254 - 366 nm). Cuando se requiera extraer el DNA de un gel de agarosa se usa un kit de extracción de banda, siguiendo las instrucciones del proveedor.

**Nota:** Se usaron los marcadores de peso molecular GeneRuler 1 kb DNA ladder y 100 bp ladder de Thermo scientific y el marcador generado por la digestión de DNA del fago  $\lambda$  con PstI.

**Protocolo 3.** Extracción de DNA genómico de micobacterias. Usando el método del CTAB-NaCl

- a. Partir de 10 mL de cultivo de micobacteria crecido hasta fase logarítmica, centrifugarlo a 2000 g por 20 min. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 1 mL de solución GTE (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA y 50 mM glucosa).
- b. Transferir a un tubo *ependorf* y centrifugar durante 10 min. Desechar el sobrenadante y resuspender el pellet celular en 450 µL de solución GTE.
- c. Adicionar 50 µL de lisozima 10 mg/mL y mezclar suavemente. Incubar a 37 °C toda la noche.
- d. Agregar 100 µL de SDS al 10% y mezclar suavemente.
- e. Adicionar 50 µL de proteínasa K 10mg/mL y mezclar suavemente. Incubar a 55 °C por 20-40 min.
- f. Agregar 200 µL de NaCl 5M y mezclar. Luego adicionar 160 µL de CTAB (precalentado a 65 °C), mezclar suavemente e incubar a 65 °C por 10 min.
- g. Adicionar un volumen de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar suavemente y centrifugar durante 5 min.
- h. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Repetir la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1).
- i. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo. Adicionar 560 µL de isopropanol (0,7 volúmenes), mezclar suavemente por inversión hasta que el DNA haya precipitado. Incubar a temperatura ambiente durante 5 min y centrifugar durante 10 min.
- j. Aspirar y descartar el sobrenadante. Adicionar 1 mL de etanol al 70% para lavar el pellet de DNA. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar durante 5 min.
- k. Aspirar el sobrenadante y dejar secar el pellet al aire durante 15 min. Resuspender en 50 µL de buffer TE e incubar a 37°C para disolver el pellet. Guardar a -20°C.
- l. Cuantificar el DNA, y comprobar su integridad por electroforesis de DNA.

**Protocolo 4.** PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

- a. Agregar al tubo *ependorf* (cuyo tamaño depende del termociclador a usarse) cada uno de los componentes en las cantidades que permitan alcanzar las concentraciones adecuadas en un volumen final de 25-30 µL el cual se ajusta con agua MQ. Las concentraciones finales de cada reactivo son: El buffer de la polimerasa 1X, la enzima polimerasa 1U, cloruro de magnesio 1,5 mM, dNTP's 100 µM, los cebadores 1 µM y el molde de DNA de 1 pg a 1 ng.
- b. Mezclar exhaustivamente por pipeteo.
- c. Introducir en el termociclador y someter a un programa adecuado, que incluye generalmente: una denaturación inicial del molde (10 min a 94 °C), 35 ciclos de reacción que constan de un paso de denaturación (30 s a 94 °C), un paso de anillamiento (3 s al T<sub>m</sub> de los cebadores), un paso de extensión (1 min por cada 1000 bp a 72 °C) y una extensión final (10 min a 72 °C).
- d. Analizar el producto por electroforesis.



**Nota 1:** Para productos de tamaño mayor a 2000 bp se usa las enzimas Dream Taq Polimerasa, True start polimerasa de Thermo scientific o AmpliTaq gold de invitrogen (Adicionando para esta última enzima, en el medio de reacción DMSO al 10 % concentración final). Para productos de menor tamaño DNA taq polimerasa de Thermo scientific.

**Nota 2:** Se debe incluir un control negativo, que es simplemente una reacción adicional con agua en lugar de DNA o agua en lugar de enzima.

**Nota 3:** Para realizar la PCR de colonia, se prepara la reacción de PCR normal solo que en lugar de adicionar DNA en solución como molde, se puede: 1) Tomar con un palillo estéril la colonia que se desea evaluar e introducirla en el *eppendorf* de la reacción; o 2) Partir de un cultivo líquido derivado de una colonia única, centrifugar 1 mL de cultivo, resuspender en 100  $\mu$ L H<sub>2</sub>O y calentar a 85 °C por 20 minutos (para micobacterias calentar durante 50 min), centrifugar nuevamente y tomar 2  $\mu$ L de sobrenadante como molde.

#### **Protocolo 5.** Preparación de células competentes.

➤ Electrocompetentes:

Es importante tener en cuenta que las células de *E. coli* y *M. smegmatis* deben ser mantenidas todo el tiempo en hielo, usar glicerol al 10% mantenido en hielo y centrifugar a 4°C. Para *M. tuberculosis*, las células, el glicerol al 10% con Tween 0,05% (Usado en todo el procedimiento) y la centrifuga deben permanecer a temperatura ambiente. Esto mejora la eficiencia de transformación.

- a. Preparar un cultivo hasta fase logarítmica en el medio adecuado teniendo en cuenta que 50 mL de cultivo inicial generan aproximadamente 20 alícuotas de células competentes.
- b. El cultivo es transferido a tubos de centrifuga. Para *E. coli* y *M. smegmatis* los tubos deben ser incubados previamente en hielo por mínimo 30 min.
- c. Las células son colectadas por centrifugación a 4000 rpm por 10 min; el sobrenadante es descartado cuidadosamente.
- d. Lavar las células con 1/2 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%, pipeteando suavemente o con golpes moderados.
- e. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/4 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.
- f. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/8 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.
- g. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/10 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.

- h. Centrifugar con en **c**; lavar las células con 1/25 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.
- i. Alicuotar las células (40  $\mu\text{L}$  de *E. coli*, 100  $\mu\text{L}$  de micobacterias). Usar inmediatamente ó guardar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  (La células electrocompetentes de *M. tuberculosis* es mejor usarla en el menor tiempo posible).

➤ Termocompetentes:

- a. Preparar 25 mL de un cultivo hasta fase logarítmica de *E. coli*.
- b. Centrifugar en frío a 4100 rpm durante 10 min y eliminar sobrenadante.
- c. Resuspender el pellet en 10 mL de solución de  $\text{MgCl}_2$  80 mM- $\text{CaCl}_2$  20 mM frío.
- d. Centrifugar en fría a 4100 rpm durante 10 min y eliminar sobrenadante.
- e. Resuspender el pellet en 1,4 mL de  $\text{CaCl}_2$  0,1 M frío.
- f. Alicuotar en 200  $\mu\text{L}$ . Transformar inmediatamente.

**Nota:** Si se quiere almacenar las células a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  se debe hacer el siguiente proceso antes de alicuotar:

- a. Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de DMSO estéril y agitar.
- b. Dejar en hielo durante 15 min.
- c. Adicionar otros 50  $\mu\text{L}$  de DMSO estéril.
- d. Alicuotar en 200  $\mu\text{L}$  y guardar a  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Para utilizar se deben descongelar las células con la palma de la mano y ponerlas en hielo durante 10 min. Finalmente transformar.

**Protocolo 6.** Transformación de células.

➤ Electroporación:

Al igual que en la preparación de las células, el procedimiento para *E. coli* y *M. smegmatis* debe hacerse en hielo, por lo que las cubetas de electroporación deben ser pre-enfriadas y las mezcla mantenidas en hielo. En el caso de *M. tuberculosis* todo el procedimiento se hace a temperatura ambiente.

- a. Mezclar suavemente la alícuota de células con 2-10  $\mu\text{L}$  del DNA a introducir (10-100 ng de DNA). El DNA debe ser previamente desalado para evitar corto circuito.
- b. Transferir la mezcla al fondo de la cubeta de 1 mm de diámetro e insertar en el electroporador.
- c. Pasar un pulso controlado de corriente:  
*E. coli*: 25  $\mu\text{F}$ , 2,5 kV y 200 $\Omega$ , entre 4 y 5 ms  
Micobacterias: 25  $\mu\text{F}$ , 2,5 kV y 1000 $\Omega$  entre 15-25 ms
- d. Tan pronto como sea posible, agregar a la cubeta 1 mL de medio de cultivo líquido a temperatura ambiente (SOC o LB para *E. coli* y 7H9-ADC Tween para micobacterias).

- e. Transferir a un Falcon de 15 mL e incubar a 37 °C por 1,5 h para *E. coli*, 2 h para *M. smegmatis* y toda la noche para *M. tuberculosis*.
- f. El producto de transformación es plaqueado en el respectivo medio sólido suplementado con el antibiótico de selección (plaquear 100-200 µL). Incubar a 37 °C hasta obtener colonias.

➤ Termocompetencia:

- a. Mezclar 200 µL de células termocompetentes y el producto de ligación.
- b. Calentar a 42 °C durante 90 s y rápidamente poner en hielo por 2 min.
- c. Agregar 800 µL de LB y transferir a un tubo esteril de 15 mL.
- d. Incubar a 37 °C durante 1,5 h.
- e. Plaquear el producto (100-200 µL) en medio solido con el antibiótico de interés. Incubar a 37 °C hasta obtener colonias.

**Protocolo 7.** Extracción de plásmido

- a. Cultivar durante una noche, a 37 °C con agitación, las células en 5 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.
- b. Centrifugar 3 mL del cultivo (4 ciclos en *eppendorf* de 1,5 mL) a 13000 rpm X 5 min.
- c. Desechar el sobrenadante con la ayuda de pipeta.
- d. Resuspender el pellet en 200 µL de solución I fría.
- e. Añadir 400 µL de solución II, mezclar suavemente por inversión y mantener durante 5 min en hielo o hasta que se obtenga una solución viscosa debida a la lisis celular.
- f. Añadir 300 µL de solución III, mezclar por inversión e incubar durante 5 min en hielo hasta que se observe un precipitado blanco.
- g. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min. Transferir la fase acuosa a un *eppendorf* limpio.
- h. Añadir 600 µL de IPA e incubar en hielo durante 10 min y centrifugar a 13000 rpm por 10 min.
- i. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 400 µL de TE 1X. Adicionar 400 µL de LiCl 5M e incubar a -20C durante 15 min, si se puede más tiempo mejor. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y transferir el sobrenadante a un *eppendorf* limpio.
- j. Adicionar 900 de etanol absoluto, mezclar e incubar durante 10 min en hielo. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y desechar el sobrenadante.
- k. Hacer dos lavados del pellet con 1 mL de etanol al 70% (Centrifugar a 13000 rpm por 2 min y desechar el sobrenadante).
- l. Secar el pellet y resuspender en 25-50 µL de agua desionizada estéril precalentada a 45°C. Guardar a -20°C.

**Nota 1:** En la extracción de plásmido partiendo de la cepa de *E. coli* HB101 en el paso i. antes de adicionar el LiCl se agregan 4 µL de SDS 10 % y Proteinasa K (1 µL/mL concentración final), se incuba la mezcla durante 1 h a 37°C, y luego si se continua con la purificación usando el LiCl.

**Nota 2:** Componentes de las soluciones de extracción de plásmido:

Solución I: Glucosa 50 mM, Tris-Cl 25 mM (pH 8,0), y EDTA 10 mM (pH 8,0).

Solución II: NaOH 0,2 N y SDS 1 %.

Solución III: Acetato de potasio 3 M, y ácido acético glacial 11,5 %.

### **Protocolo 8.** Digestión y mapeo de DNA con enzimas de restricción.

➤ Digestión:

- a. Mezclar por pipeteo el DNA a cortar en una concentración de 0,2-1  $\mu\text{g}$  (por reacción), el buffer de la enzima a una concentración final de 1X, la enzima de restricción entre 1-10 U y la cantidad de agua necesaria para alcanzar el volumen final de 10  $\mu\text{L}$ .
- b. Incubar entre 2 h a 37 °C, en la mayoría de los casos, aunque existen enzimas con temperaturas óptimas de trabajo diferentes.
- c. Al finalizar el procedimiento es necesario inactivar las enzimas lo cual se logra calentando a 65 °C durante 20 min (ver las condiciones del fabricante).
- d. Analizar el producto de digestión por electroforesis de DNA.

**Nota 1:** En el caso de una doble digestión se usa el programa Doubledigest de ThermoScientific para conocer las condiciones de reacción.

➤ Mapeo:

El mapeo de restricción permite determinar la secuencia de un DNA conociendo los sitios que reconocen las diferentes enzimas y los tamaños producidos. Para conocer las enzimas a seleccionar se usó el programa de construcción de plásmidos, llamado ApE (*A Plasmid Editor*). En el caso de las clonaciones lo ideal es usar enzimas que permitan diferencia fácilmente entre el vector y el plásmido recombinante, es decir, que corten tanto en el inserto como en el vector. El protocolo es el mismo de una digestión con una sola enzima, pero el análisis consiste en usar varias enzimas por separado en un mismo DNA.

### **Protocolo 9.** Defosforilación de DNA.

- a. Mezclar por pipeteo el DNA del plásmido digerido, buffer de la fosfatasa a una concentración final de 1X, 1 U de T4 DNA ligasa y agua necesaria para completar el volumen de reacción.
- b. Incubar durante 15 min a 37 °C.
- c. Desactivar la enzima a 75 °C durante 5 min.

**Protocolo 10.** Ligación de DNA.

- a. Mezclar por pipeteo los fragmentos de DNA usando diferentes relaciones molares de vector e inserto (usando 15-30 fmoles de vector), calentar la mezcla a 45°C durante 5 min y luego enfriar inmediatamente.
- b. Adicionar el buffer de la ligasa a una concentración final de 1X, 1 U de T4 DNA ligasa y agua necesaria para completar el volumen de reacción de 10 µL.
- c. Incubar durante 2 h a 22 °C.
- d. Proceder inmediatamente a la transformación.

**Nota:** Los controles usado son: una mezcla de reacción sin inserto (Control de ligación), una mezcla de reacción sin inserto y sin ligasa (Control de digestión), y una mezcla de reacción sin vector (Control de inserto, para ver si los reactivos no se encuentran contaminados). Se usa agua para sustituir los reactivos mencionados.

**Protocolo 11.** Inducción de la sobreexpresión de proteínas clonadas en el vector lanzadera pMV261

- a. Cultivar las micobacterias recombinantes hasta fase exponencial.
- b. Incubar a 45 °C durante 30 min.
- c. Recolectar las células por centrifugación a 8000 rpm por 10 min.
- d. Lavar el pellet 2 veces con en buffer PBS frío.
- e. Resuspender las células en buffer PBS frío (1/50 del volumen inicial de cultivo).
- f. Mezclar con un volumen de buffer de carga 2xSDS.
- g. Calentar a ebullición durante 10 min.
- h. Centrifugar a 10 000 rpm por 10 min y recuperar el sobrenadante.
- i. Analizar por SDS-PAGE.

**Protocolo 12.** Electroforesis de proteínas en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

- a. Ensamblar los vidrios de la cámara de electroforesis con los espaciadores.
- b. Preparar 6 mL de gel de poliacrilamida al 10% (para separar proteínas de entre 20 y 80 kDa): mezclando 2 mL de la solución stock 30 % de acrilamida/0,8 % de bis-acrilamida; 1,5 mL de buffer Tris/HCl 1,5 M (pH 8,8); 2,4 mL de agua destilada; 60 µL de SDS al 10 %; 36 µL de persulfato de amonio al 10%; y al final 12 µL de TEMED.
- c. Servir rápidamente el gel entre los vidrios y adicionar isopropanol para eliminar las burbujas. Cuando se polimerice el gel, remover el isopropanol y dejar secar.
- d. Preparar el gel de concentración mezclando: 350 µL de la solución stock 30% de acrilamida/0,8 % de bis-acrilamida, 500 µL de buffer Tris/HCl 1,5 M (pH 6,8), 1 mL de agua destilada, 60 µL de SDS al 10 %, 36 µL de persulfato de amonio al 10 % y al final 12 µL de TEMED. Servir
- e. inmediatamente sobre el gel de separación.
- f. Insertar el peine evitando la formación de burbujas.
- g. Luego de que polimerice, introducir el gel en la cámara de electroforesis.

- h. Llenar la cámara con el buffer de electroforesis Tris-glicina (Tris 0,25 mM, glicina 250 mM y SDS 0,1 %) y remover el peine.
- i. Mezclar 1 volumen de buffer de carga 5x y 4 volúmenes de muestra de proteína. Calentar a 95 °C durante 5 min y centrifugar.
- j. Sembrar las muestras y correr el gel a 100 V por 1 h, hasta que el frente de corrido alcance el borde de los vidrios.
- k. Incubar el gel en solución de tinción de azul de Coomassie (Brilliant Blue R) entre 30 min y 2 h con agitación.
- l. Lavar el gel con agitación constante en la solución de destinción hasta alcanzar la intensidad apropiada (1-2 h).
- m. Secar el gel sobre papel celofán frío.

**Protocolo 13.** Ensayos de toxicidad frente a metales pesados.

- a. A partir de un cultivo crecido las diferentes cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con un OD<sub>595 nm</sub> de 0,1 UA.
- b. Decidir la concentración más alta de cada ion de metal pesado que se quiere ensayar.
- c. A partir de las soluciones stock preparar una disolución del ion metálico en LB, cuya concentración sea cuatro veces la concentración más alta que se quiera ensayar.
- d. En cada columna de la placa de ELISA de 96 pozos, se ensaya una cepa variando la concentración de metal por dilución seriada a la mitad. Cada condición se hizo por triplicado.
- e. En cada columna, añadir 100 µL de LB a tantos pocillos como concentraciones distintas de antibiótico se quieran ensayar (máximo siete concentraciones, o sea, siete pocillos). En el pocillo de la fila superior, añadir 100 µL de la disolución de antibiótico 4X. Cambiar de punta, mezclar bien y pasar 100 µL al pocillo de la fila siguiente y repetir esto hasta el séptimo pocillo, del que se eliminan 100 µL. (Nota: esto es para hacer diluciones a la mitad. Para otro rango de concentraciones, cambiar según corresponda).
- f. El octavo pocillo (el de la fila más baja), será el control de crecimiento. Se ponen 100 µL de 7H9\* (Nota 2) pero no se añade antibiótico.
- g. Inocular todos los pocillos con 100 µL del cultivo.
- h. Tapar las placas e incubarlas a 37 °C por tres días.
- i. Leer la absorbancia a 595 nm usando un lector de ELISA.

**Protocolo 14.** Extracción de membrana plasmática.

- a. Cultivar las bacterias en condiciones normales hasta fase exponencial, si es necesario hacer la inducción de proteínas y en adelante mantener todo el tiempo las células en hielo.
- b. Centrifugar el cultivo a 7000 x g durante 10 min a 4 °C.
- c. Descartar el sobrenadante (medio de cultivo) y lavar muy bien el pellet (células) con solución de sacarosa 250 mM.

- d. Centrifugar nuevamente y resuspender el pellet en buffer MOPS 10 mM (pH 7,4), EDTA 1mM, PMSF 0,3 mM.
- e. Lisar las células en un Mini-BeadBeater durante 5 min a 4 °C o 10 pulsos de 1 min enfriando a -20 °C entre cada pulso.
- f. Centrifugar a 25000 x g durante 30 min a 4 °C.
- g. Recuperar el sobrenadante (membrana plasmática) y descartar el pellet.
- h. Centrifugar el sobrenadante a 100 000 x g durante 90 min a 4 °C. Es necesario tener presente que la centrifuga tarda en alcanzar la velocidad y detenerse, por tanto debe ser programada por lo menos durante 190 min.
- i. Descartar el sobrenadante, lavar y resuspender el pellet (membrana plasmática) en sacarosa 250 mM (~1 mL).
- j. Hacer alícuotas de 100 µL, cuantificar el contenido de proteína y almacenar a -70 °C hasta su uso.

**Protocolo 15.** Cuantificación de proteínas por el método de Bradford.

- a. Preparar una solución patrón de BSA de 5 mg/mL.
- b. Preparar la curva de calibración entre 1,5 y 15 µg/mL de BSA diluyendo en buffer MOPS 10 mM pH 7,4 (volumen final de 50 µL).
- c. Adicionar 200 µL de reactivo de Bradford (azul de Coomassie G-250 al 0,1 %, etanol al 4,8 % y ácido fosfórico al 8,5 %).
- d. Agitar y luego de 10 min medir absorbancia a 595 nm.
- e. Preparar las diluciones de la proteína de interés (en el mismo buffer en que se preparó el BSA) y testear alícuotas por triplicado.
- f. Calcular la concentración de la proteína usando la curva de calibración.

**Protocolo 16.** Ensayos de actividad ATPasa específica estimulada por la presencia de metales pesados, usando el método de Fiske-Subbarow modificado con bismuto.

Diseñar en una placa de ELISA de 96 pozos el experimento teniendo en cuenta que el volumen final de reacción es 50 µL y cada condición evaluada se debe hacer por triplicado. Se evalúan los cationes de  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^+$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ , y las tres membranas extraídas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (cepa silvestre, transformada con pMV261 y transformada con pALT4).

- a. Mezclar en un medio de reacción los siguiente reactivos en las concentraciones finales indicadas: MOPS 100 mM (pH 7,5), DTT 2,5 µM,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Brij-58 0,02 %, 4 µg de proteína (vesículas de membrana), catión de metal pesado 10 µM y agua desionizada.
- b. Incubar la mezcla a 37 °C durante 5 min.
- c. Adicionar ATP 3,5 mM para iniciar la reacción enzimática.
- d. Incubar la mezcla de reacción enzimática a 37 °C durante 30 min (tiempo exacto).

- e. Adicionar 100  $\mu$ L de la solución reveladora que contiene ácido ascórbico 3 %, molibdato de amonio 0,5 %, SDS 3 % en HCl 0,5 M. Mezclar e incubar en frío durante 10 min.
- f. Adicionar 150  $\mu$ L de la solución de bismuto que contiene citrato de bismuto 3,5 % y citrato de sodio 3,5 % en HCl 1M. Mezclar e incubar a 37 °C durante 15 min.
- g. Leer la absorbancia en un lector de ELISA a 690 nm.

**Nota 1:** Se deben hacer los siguientes blancos: blanco con solo agua desionizada, blanco con solo ATP, y blanco de mezcla de reacción enzimática sin catión de metal pesado.

**Nota 2:** Se debe hacer una curva de calibración de Pi con concentraciones entre 3 – 35  $\mu$ M de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Adicionando la dos soluciones reveladoras. Esta curva se debe hacer cada vez que se haga un nuevo ensayo.

**Protocolo 17.** Ensayo de actividad  $\text{Cu}^+$  ATPasa específica, usando el método de Fiske-Subbarow modificado con bismuto

Diseñar en una placa de ELISA de 96 pozos el experimento teniendo en cuenta que el volumen final de reacción es 50  $\mu$ L y cada condición evaluada se debe hacer por triplicado. Se evalúa el efecto de la concentración de proteína de membrana, pH, temperatura y concentración de  $\text{Cu}^+$ , sobre las membranas extraídas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 (cepa transformada con pMV261 y transformada con pALT4).

- a. En la mayoría de los casos se usó la siguiente mezcla de reacción: MOPS 100 mM (pH 7,9), DTT 2,5  $\mu$ M,  $\text{MgCl}_2$  3 mM, Brij-58 0,02 %, 4  $\mu$ g de proteína (vesículas de membrana), catión de metal pesado 10  $\mu$ M y agua desionizada. Para el efecto de la concentración de proteína de membrana se evaluó un rango entre 2 y 10  $\mu$ g; para el efecto del pH se varió en un rango de 5,9 a 8,7 (para pH menores de 7,9 se usó buffer MOPS 100 mM y para pH mayores de 8,2 buffer TRIS 100 mM); y para el efecto de la concentración de  $\text{Cu}^+$  se evaluó un rango de 0,01 y 10  $\mu$ M.
- b. Incubar la mezcla a 37 °C durante 5 min.
- c. Adicionar ATP 3,5 mM para iniciar la reacción enzimática.
- d. Incubar la mezcla de reacción enzimática a 37 °C durante 30 min (tiempo exacto). Para el efecto de la temperatura se sometió la reacción a 4, 18, 37 y 60 °C y los ensayos se hicieron en tubos *ependorf* de 500  $\mu$ L.
- e. Adicionar 100  $\mu$ L de la solución reveladora que contiene ácido ascórbico 3 %, molibdato de amonio 0,5 %, SDS 3 % en HCl 0,5 M. Mezclar e incubar en frío durante 10 min.
- f. Adicionar 150  $\mu$ L de la solución de bismuto que contiene citrato de bismuto 3,5 % y citrato de sodio 3,5 % en HCl 1M. Mezclar e incubar a 37 °C durante 15 min.
- g. Leer la absorbancia en un lector de ELISA a 690 nm.



**Nota 1:** Se deben hacer los siguientes blancos: blanco con solo agua desionizada, blanco con solo ATP, y blanco de mezcla de reacción enzimática sin catión de metal pesado.

**Nota 2:** Se debe hacer una curva de calibración de Pi con concentraciones entre 3 – 35  $\mu\text{M}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Adicionando la dos soluciones reveladoras. Esta curva se debe hacer cada vez que se haga un nuevo ensayo.



## Bibliografía

1. Organization, W.H., *Global tuberculosis report 2012*. Switzerland: Publications of the World Health Organization, 2012.
2. Sarathy, J., V. Dartois, and E. Lee, *The Role of Transport Mechanisms in Mycobacterium Tuberculosis Drug Resistance and Tolerance*. Pharmaceuticals, 2012. **5**(11): p. 1210-1235.
3. Arguello, J.M., M. Gonzalez-Guerrero, and D. Raimunda, *Bacterial transition metal P(1B)-ATPases: transport mechanism and roles in virulence*. Biochemistry, 2011. **50**(46): p. 9940-9.
4. Soldati, T. and O. Neyrolles, *Mycobacteria and the intraphagosomal environment: take it with a pinch of salt(s)!* Traffic, 2012. **13**(8): p. 1042-52.
5. Wagner, D., et al., *Elemental analysis of Mycobacterium avium-, Mycobacterium tuberculosis-, and Mycobacterium smegmatis-containing phagosomes indicates pathogen-induced microenvironments within the host cell's endosomal system*. J Immunol, 2005. **174**(3): p. 1491-500.
6. Ward, S.K., et al., *CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2010. **77**(5): p. 1096-110.
7. Ward, S.K., E.A. Hoyer, and A.M. Talaat, *The global responses of Mycobacterium tuberculosis to physiological levels of copper*. J Bacteriol, 2008. **190**(8): p. 2939-46.
8. Agranoff, D. and S. Krishna, *Metal ion transport and regulation in Mycobacterium tuberculosis*. Frontiers in Bioscience, 2004. **9**: p. 2996-3006.
9. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 463-96.
10. Lewinson, O., A.T. Lee, and D.C. Rees, *A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(12): p. 4677-82.
11. Kumar, M., et al., *Identification of Mycobacterium tuberculosis genes preferentially expressed during human infection*. Microb Pathog, 2011. **50**(1): p. 31-8.
12. Organization, W.H., *Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): 2010 global report on surveillance and response*. Publications of the World Health Organization: Suiza, 2010: p. 1-20.
13. Vashishtha, V.M., *WHO Global Tuberculosis Control Report 2009: Tuberculosis elimination is a distant dream*. Indian Pediatr, 2009. **46**(5): p. 401-2.
14. Coll, P., *Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009. **27**: p. 474.
15. Martín, C., *Desarmando «El bacilo de la tuberculosis»*, G.d.A. Universidad de Zaragoza, Editor 2006: España. p. 5-25.
16. Chacón O., et al., *Inactivación de genes de Mycobacterium tuberculosis y su potencial utilidad en la prevención y el control de la tuberculosis*. Biomédica, 2004. **24**(165).

17. *Boletín epidemiológico semanal No. 18 del INS 2013*; Available from: <http://www.ins.gov.co/boletin-epidemiologico/Boletn%20Epidemiolgico/2013%20Boletin%20epidemiologico%20Semana%2018.pdf>.
18. World-Health-Organization, *Global tuberculosis control: a short update to the 2009 report*.2009, Switzerland: WHO Press. 39.
19. Knechel, N.A., *Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis*. Crit Care Nurse, 2009. **29**(2): p. 34-43; quiz 44.
20. Organization, W.H., *Global tuberculosis control: WHO report 2011*.2011, Switzerland: Publications of the World Health Organization. 246.
21. Sturgill-Koszycki, S., et al., *Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase*. Science, 1994. **263**(5147): p. 678-81.
22. Grange, J.M., *The biology of the genus Mycobacterium*. Soc Appl Bacteriol Symp Ser, 1996. **25**: p. 1S-9S.
23. Euzéby, J.P. *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* 1997 December 08, 2011 [cited 2011 December 25]; Available from: <http://www.bacterio.cict.fr/index.html>.
24. Hett, E.C. and E.J. Rubin, *Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective*. Microbiol Mol Biol Rev, 2008. **72**(1): p. 126-56, table of contents.
25. Levy-Frebault, V.V. and F. Portaels, *Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species*. Int J Syst Bacteriol, 1992. **42**(2): p. 315-23.
26. Wayne, L.G. and G.P. Kubica, *Family Mycobacteriaceae*. In *Bergey's manual of systematic bacteriology*., M.N.S. eds Sneath P. H. A., Sharpe M. E., Holt J. G. (Williams and Wilkins, Baltimore, Md), Editor 1986. p. 1435-1457
27. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola, *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. Rev Sci Tech, 2001. **20**(1): p. 21-54.
28. Zhang, Y. and A. Telenti, *Genetic of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis*. In *Molecular Genetics of Mycobacteria*., ed. G.F.J. Hatfull, W.R.2000: ASM Press Washington, D.C.
29. Blanchard, J.S., *Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis*. Annu Rev Biochem, 1996. **65**: p. 215-39.
30. Daffé, M. and J.-M. Reytrat, *The Mycobacterial Cell Envelope*2008, Washington, DC: ASM Press. XIII, 395 p.
31. McEvoy, C.R., et al., *The role of IS6110 in the evolution of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2007. **87**(5): p. 393-404.
32. Issa, R., et al., *Detection and discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex*. Diagn Microbiol Infect Dis, 2012. **72**(1): p. 62-7.
33. Pethe, K., et al., *Isolation of Mycobacterium tuberculosis mutants defective in the arrest of phagosome maturation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(37): p. 13642-7.
34. Sundaramurthy, V. and J. Pieters, *Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages*. Microbes and Infection, 2007. **9**: p. 1671-1679.
35. But, P.G., et al., *Intracellular Transformation of Phagosomes*. Biology Bulletin, 2004. **31**(6): p. 564-567.
36. Kelley, V.A. and J.S. Schorey, *Mycobacterium's arrest of phagosome maturation in macrophages requires Rab5 activity and accessibility to iron*. Mol Biol Cell, 2003. **14**(8): p. 3366-77.

37. Piddington, D.L., et al., *Cu,Zn superoxide dismutase of Mycobacterium tuberculosis contributes to survival in activated macrophages that are generating an oxidative burst*. *Infect Immun*, 2001. **69**(8): p. 4980-7.
38. Cook, G.M., et al., *Physiology of mycobacteria*. *Adv Microb Physiol*, 2009. **55**: p. 81-182, 318-9.
39. Brennan, P.J. and H. Nikaido, *The envelope of mycobacteria*. *Annu Rev Biochem*, 1995. **64**: p. 29-63.
40. Jarlier, V. and H. Nikaido, *Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonae*. *J Bacteriol*, 1990. **172**(3): p. 1418-23.
41. Daffe, M. and G. Etienne, *The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity*. *Tuber Lung Dis*, 1999. **79**(3): p. 153-69.
42. Besra, G.S., et al., *Biosynthesis of mycobacterial lipoarabinomannan*. *J Biol Chem*, 1997. **272**(29): p. 18460-6.
43. Ortalo-Magne, A., et al., *Molecular composition of the outermost capsular material of the tubercle bacillus*. *Microbiology*, 1995. **141 ( Pt 7)**: p. 1609-20.
44. Mawuenyega, K.G., et al., *Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling*. *Mol Biol Cell*, 2005. **16**(1): p. 396-404.
45. Niederweis, M., *Nutrient acquisition by mycobacteria*. *Microbiology*, 2008. **154**(Pt 3): p. 679-92.
46. Daffe, M. and P. Draper, *The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity*. *Adv Microb Physiol*, 1998. **39**: p. 131-203.
47. Torrelles, J.B. and L.S. Schlesinger, *Diversity in Mycobacterium tuberculosis mannosylated cell wall determinants impacts adaptation to the host*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2010. **90**(2): p. 84-93.
48. Jackson, M., G. Stadthagen, and B. Gicquel, *Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of Mycobacterium tuberculosis: biosynthesis, transport, regulation and biological activities*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2007. **87**(2): p. 78-86.
49. Besra, G.S. and D. Chatterjee, *Lipids and carbohydrates of M. tuberculosis*, in *Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and Control.*, B.R. Bloom, Editor 1994: Washington. p. 285-306.
50. Brennan, P.J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2003. **83**(1-3): p. 91-7.
51. *Plant Physiology*. Available from: [http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010\\_1A\\_Book\\_angol\\_01\\_nove\\_nyelettan/ch02s02.html](http://www.tankonyvtar.hu/hu/tartalom/tamop425/0010_1A_Book_angol_01_nove_nyelettan/ch02s02.html).
52. Paulsen, I.T., et al., *Microbial genome analyses: comparative transport capabilities in eighteen prokaryotes*. *J Mol Biol*, 2000. **301**(1): p. 75-100.
53. Pedersen, P.L., *Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease*. *J Bioenerg Biomembr*, 2007. **39**(5-6): p. 349-55.
54. Palmgren, M.G. and P. Nissen, *P-type ATPases*. *Annu Rev Biophys*, 2011. **40**(1): p. 243-66.
55. Agranoff, D.D. and S. Krishna, *Metal ion homeostasis and intracellular parasitism*. *Mol Microbiol*, 1998. **28**(3): p. 403-12.
56. *UVM CMB Week 3*. Available from: <http://www.studyblue.com/notes/note/n/uvm-cmb-week-3/deck/3542214>.
57. Pedersen, P.L., *Transport ATPases: structure, motors, mechanism and medicine: a brief overview*. *J Bioenerg Biomembr*, 2005. **37**(6): p. 349-57.

58. Stock, D., et al., *The rotary mechanism of ATP synthase*. *Curr Opin Struct Biol*, 2000. **10**(6): p. 672-9.
59. Ko, Y.H., et al., *Mitochondrial ATP synthasome. Cristae-enriched membranes and a multiwell detergent screening assay yield dispersed single complexes containing the ATP synthase and carriers for Pi and ADP/ATP*. *J Biol Chem*, 2003. **278**(14): p. 12305-9.
60. Xu, J., et al., *Structure and function of V-ATPases in osteoclasts: potential therapeutic targets for the treatment of osteolysis*. *Histol Histopathol*, 2007. **22**(4): p. 443-54.
61. Hollenstein, K., R.J. Dawson, and K.P. Locher, *Structure and mechanism of ABC transporter proteins*. *Curr Opin Struct Biol*, 2007. **17**(4): p. 412-8.
62. Jayakanthan, S., *Structural and Functional Characterization of the Cytosolic Domains of the Copper Transporting P1B-ATPase CopB from Archaeoglobus fulgidus*, 2011, The University of Arizona.
63. Axelsen, K.B. and M.G. Palmgren, *Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily*. *J Mol Evol*, 1998. **46**(1): p. 84-101.
64. Kuhlbrandt, W., *Biology, structure and mechanism of P-type ATPases*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2004. **5**(4): p. 282-95.
65. Thever, M.D. and M.H. Saier, Jr., *Bioinformatic characterization of p-type ATPases encoded within the fully sequenced genomes of 26 eukaryotes*. *J Membr Biol*, 2009. **229**(3): p. 115-30.
66. Haupt, M., et al., *The holo-form of the nucleotide binding domain of the KdpFABC complex from Escherichia coli reveals a new binding mode*. *J Biol Chem*, 2006. **281**(14): p. 9641-9.
67. Tsuda, T. and C. Toyoshima, *Nucleotide recognition by CopA, a Cu<sup>+</sup>-transporting P-type ATPase*. *EMBO J*, 2009. **28**(12): p. 1782-91.
68. Sorensen, T.L., et al., *Localization of a K<sup>+</sup> -binding site involved in dephosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> -ATPase*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(45): p. 46355-8.
69. Futai, M., Y. Wada, and J.H. Kaplan, *Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, Pathophysiology*. 1 ed 2004, Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
70. Chintalapati, S., et al., *Membrane structure of CtrA3, a copper-transporting P-type-ATPase from Aquifex aeolicus*. *J Mol Biol*, 2008. **378**(3): p. 581-95.
71. Nongkhilaw, M., et al., *Occurrence of horizontal gene transfer of P(1B)-type ATPase genes among bacteria isolated from the uranium rich deposit of Domiasiat in North East India*. *PLoS one*, 2012. **7**(10): p. e48199.
72. Martinez, R.J., et al., *Horizontal gene transfer of PIB-type ATPases among bacteria isolated from radionuclide- and metal-contaminated subsurface soils*. *Appl Environ Microbiol*, 2006. **72**(5): p. 3111-8.
73. Adle, D.J. and J. Lee, *Expressional control of a cadmium-transporting P1B-type ATPase by a metal sensing degradation signal*. *J Biol Chem*, 2008. **283**(46): p. 31460-8.
74. Botella, H., et al., *Mycobacterial p(1)-type ATPases mediate resistance to zinc poisoning in human macrophages*. *Cell Host Microbe*, 2011. **10**(3): p. 248-59.
75. Padilla-Benavides, T., et al., *A Novel P1B-type Mn<sup>2+</sup>-transporting ATPase Is Required for Secreted Protein Metallation in Mycobacteria*. *J Biol Chem*, 2013. **288**(16): p. 11334-47.

76. Gonzalez-Guerrero, M., et al., *Structure of the two transmembrane Cu<sup>+</sup> transport sites of the Cu<sup>+</sup>-ATPases*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29753-9.
77. Ridder, I.S. and B.W. Dijkstra, *Identification of the Mg<sup>2+</sup>-binding site in the P-type ATPase and phosphatase members of the HAD (haloacid dehalogenase) superfamily by structural similarity to the response regulator protein CheY*. Biochem J, 1999. **339 ( Pt 2)**: p. 223-6.
78. Gonzalez-Guerrero, M., D. Hong, and J.M. Arguello, *Chaperone-mediated Cu<sup>+</sup> delivery to Cu<sup>+</sup> transport ATPases: requirement of nucleotide binding*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20804-11.
79. Ma, Z., F.E. Jacobsen, and D.P. Giedroc, *Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing*. Chem Rev, 2009. **109**(10): p. 4644-81.
80. Wolschendorf, F., et al., *Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1621-6.
81. Samanovic, M.I., et al., *Copper in microbial pathogenesis: meddling with the metal*. Cell Host Microbe, 2012. **11**(2): p. 106-15.
82. van Kessel, J.K., *Recombineering in Mycobacteria using Mycobacteriophage Proteins in Faculty of Arts and Sciences 2008*, University of Pittsburgh.
83. van Kessel, J.C. and G.F. Hatfull, *Recombineering in Mycobacterium tuberculosis*. Nat Methods, 2007. **4**(2): p. 147-52.
84. van Kessel, J.C., L.J. Marinelli, and G.F. Hatfull, *Recombineering mycobacteria and their phages*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(11): p. 851-7.
85. Bardarov, S., et al., *Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in Mycobacterium tuberculosis, M. bovis BCG and M. smegmatis*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 10): p. 3007-17.
86. Marinelli, L.J., et al., *BRED: a simple and powerful tool for constructing mutant and recombinant bacteriophage genomes*. PLoS One, 2008. **3**(12): p. e3957.
87. Davis, G.D. and K.J. Kayser, *Chromosomal mutagenesis*. Methods in molecular biology; vol. 435 2008, Totowa, NJ: Humana Press.
88. van Kessel, J.C. and G.F. Hatfull, *Mycobacterial recombineering*. Methods Mol Biol, 2008. **435**: p. 203-15.
89. Dempski, R.E., T. Friedrich, and E. Bamberg, *Voltage clamp fluorometry: combining fluorescence and electrophysiological methods to examine the structure-function of the Na<sup>(+)/K<sup>(+)</sup>-ATPase</sup>*. Biochim Biophys Acta, 2009. **1787**(6): p. 714-20.
90. Jorgensen, P.L., K.O. Hakansson, and S.J. Karlish, *Structure and mechanism of Na,K-ATPase: functional sites and their interactions*. Annu Rev Physiol, 2003. **65**: p. 817-49.
91. Novoa-Aponte, L., *Análisis bioinformático y desarrollo de útiles génicos para la caracterización molecular In vitro, de un posible transportador de cationes alcalinos o alcalinotérreos de la membrana plasmática de Mycobacterium tuberculosis*, in Departamento de Química 2012, Universidad Nacional de Colombia: Universidad Nacional de Colombia. p. 113.
92. *Tuberculist*. Available from: <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>.
93. *Compute pI/Mw*. Available from: [http://expasy.org/tools/pi\\_tool.html](http://expasy.org/tools/pi_tool.html).
94. Hastings Software, I., *Gene Runner*, in Serial Number 392090651994: New York.
95. Hooft, R.W., C. Sander, and G. Vriend, *Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot*. Comput Appl Biosci, 1997. **13**(4): p. 425-30.
96. Claros, M.G. and G. von Heijne, *TopPred II: an improved software for membrane protein structure predictions*. Comput Appl Biosci, 1994. **10**(6): p. 685-6.

97. Cserzo, M., et al., *Prediction of transmembrane alpha-helices in prokaryotic membrane proteins: the dense alignment surface method*. Protein Eng, 1997. **10**(6): p. 673-6.
98. Krogh, A., et al., *Predicting transmembrane protein topology with a hidden Markov model: application to complete genomes*. J Mol Biol, 2001. **305**(3): p. 567-80.
99. Tusnady, G.E. and I. Simon, *The HMMTOP transmembrane topology prediction server*. Bioinformatics, 2001. **17**(9): p. 849-50.
100. Kall, L., A. Krogh, and E.L. Sonnhammer, *A combined transmembrane topology and signal peptide prediction method*. J Mol Biol, 2004. **338**(5): p. 1027-36.
101. Tusnady, G.E., Z. Dosztanyi, and I. Simon, *TMDDET: web server for detecting transmembrane regions of proteins by using their 3D coordinates*. Bioinformatics, 2005. **21**(7): p. 1276-7.
102. Lomize, M.A., et al., *OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes*. Nucleic Acids Res, 2011.
103. Davis, M.W., *ApE - A Plasmid Editor*, 2003-2008.
104. Chen, B.Y.J., H. W. and Chen, S. , *Computer Programs for PCR Primer Design and Analysis*, in *PCR Cloning Protocols*, B.Y.a.J. Chen, H. W., Editor 2002, Humana Press: New Jersey. p. 19-29.
105. *ATCC Catalog*. Available from: <http://www.atcc.org/>.
106. *Life technologies*. Available from: <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Cloning/competent-cells-for-transformation/Chemically-Competent/dh5alpha-genotypes.html>.
107. Snapper, S.B., et al., *Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 1990. **4**(11): p. 1911-9.
108. Zheng, H., et al., *Genetic basis of virulence attenuation revealed by comparative genomic analysis of Mycobacterium tuberculosis strain H37Ra versus H37Rv*. PLoS One, 2008. **3**(6): p. e2375.
109. Cole, S.T., et al., *Deciphering the biology of Mycobacterium tuberculosis from the complete genome sequence*. Nature, 1998. **393**(6685): p. 537-44.
110. *Doubledigest Thermo scientific tool*. Available from: <http://www.thermoscientificbio.com/webtools/doubledigest/>.
111. Stover, C.K., et al., *New use of BCG for recombinant vaccines*. Nature, 1991. **351**(6326): p. 456-60.
112. Fiske, S.H.a.S., Y. , *The Colorimetric Determination of Phosphorus*. Journal of Biological Chemistry, 1925. **66**(2): p. 375-400.
113. Cariani, L., et al., *Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases*. Anal Biochem, 2004. **324**(1): p. 79-83.
114. Lutsenko, S., et al., *Cellular multitasking: the dual role of human Cu-ATPases in cofactor delivery and intracellular copper balance*. Arch Biochem Biophys, 2008. **476**(1): p. 22-32.
115. Arguello, J.M., *Identification of ion-selectivity determinants in heavy-metal transport P1B-type ATPases*. J Membr Biol, 2003. **195**(2): p. 93-108.
116. Arguello, J.M., E. Eren, and M. Gonzalez-Guerrero, *The structure and function of heavy metal transport P1B-ATPases*. Biometals, 2007. **20**(3-4): p. 233-48.



117. Mana-Capelli, S., A.K. Mandal, and J.M. Arguello, *Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu<sup>2+</sup>-ATPase: functional role of its histidine-rich-N-terminal metal binding domain*. J Biol Chem, 2003. **278**(42): p. 40534-41.
118. Solioz, M. and A. Odermatt, *Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of Enterococcus hirae*. J Biol Chem, 1995. **270**(16): p. 9217-21.
119. Silva, J.J.R.F.s.d., *The biological chemistry of the elements: the inorganic chemistry of life*. 2nd ed. ed, ed. R.J.P. Williams 2001, Oxford: Oxford University Press.
120. Campbell, D.R., et al., *Mycobacterial cells have dual nickel-cobalt sensors: sequence relationships and metal sites of metal-responsive repressors are not congruent*. J Biol Chem, 2007. **282**(44): p. 32298-310.
121. Muttucumaru, D.G., et al., *Gene expression profile of Mycobacterium tuberculosis in a non-replicating state*. Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 239-46.
122. Wu, C.C., W.J. Rice, and D.L. Stokes, *Structure of a copper pump suggests a regulatory role for its metal-binding domain*. Structure, 2008. **16**(6): p. 976-85.
123. Allen, G.S., et al., *The architecture of CopA from Archaeoglobus fulgidus studied by cryo-electron microscopy and computational docking*. Structure, 2011. **19**(9): p. 1219-32.
124. Benkert, P., M. Biasini, and T. Schwede, *Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models*. Bioinformatics, 2011. **27**(3): p. 343-50.
125. Hatori, Y., et al., *Domain organization and movements in heavy metal ion pumps: papain digestion of CopA, a Cu<sup>+</sup>-transporting ATPase*. J Biol Chem, 2007. **282**(35): p. 25213-21.
126. Tsivkovskii, R., B.C. MacArthur, and S. Lutsenko, *The Lys1010-Lys1325 fragment of the Wilson's disease protein binds nucleotides and interacts with the N-terminal domain of this protein in a copper-dependent manner*. J Biol Chem, 2001. **276**(3): p. 2234-42.
127. Gourdon, P., et al., *Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase*. Nature, 2011. **475**(7354): p. 59-64.
128. Sambrook, J. and D.W. Russell., *Molecular cloning: a laboratory manual*, ed. C.S.H.L. Press 2001, Ed. 3. New York: Cold Spring Harbor.
129. Zhang, L., et al., *Rv0901 from Mycobacterium tuberculosis, a possible novel virulent gene proved through the recombinant Mycobacterium smegmatis*. Jpn J Infect Dis, 2009. **62**(1): p. 26-31.
130. Botella, H., et al., *Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight*. Trends Microbiol, 2012. **20**(3): p. 106-12.
131. Raimunda, D., et al., *Role in metal homeostasis of CtpD, a Co(2)(+) transporting P(1B4)-ATPase of Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 2012. **84**(6): p. 1139-49.
132. Santos, P., et al., *Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria*. Peptides, 2012. **36**(1): p. 121-8.
133. Mandal, A.K., W.D. Cheung, and J.M. Arguello, *Characterization of a thermophilic P-type Ag<sup>+</sup>/Cu<sup>+</sup>-ATPase from the extremophile Archaeoglobus fulgidus*. J Biol Chem, 2002. **277**(9): p. 7201-8.

134. Hung, Y.H., et al., *Purification and membrane reconstitution of catalytically active Menkes copper-transporting P-type ATPase (MNK; ATP7A)*. *Biochem J*, 2007. **401**(2): p. 569-79.
135. Ellis, K.J. and J.F. Morrison, *Buffers of constant ionic strength for studying pH-dependent processes*. *Methods Enzymol*, 1982. **87**: p. 405-26.
136. Booth, I.R., *Regulation of cytoplasmic pH in bacteria*. *Microbiol Rev*, 1985. **49**(4): p. 359-78.
137. Piddington, D.L., A. Kashkouli, and N.A. Buchmeier, *Growth of *Mycobacterium tuberculosis* in a defined medium is very restricted by acid pH and Mg(2+) levels*. *Infect Immun*, 2000. **68**(8): p. 4518-22.
138. Schnappinger, D., et al., *Transcriptional Adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* within Macrophages: Insights into the Phagosomal Environment*. *J Exp Med*, 2003. **198**(5): p. 693-704.
139. Oh, Y.K. and R.M. Straubinger, *Intracellular fate of *Mycobacterium avium*: use of dual-label spectrofluorometry to investigate the influence of bacterial viability and opsonization on phagosomal pH and phagosome-lysosome interaction*. *Infect Immun*, 1996. **64**(1): p. 319-25.
140. Buchmeier, N., et al., *A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica**. *Mol Microbiol*, 2000. **35**(6): p. 1375-82.
141. Chapman, J.S. and J.S. Bernard, *The tolerances of unclassified mycobacteria. I. Limits of pH tolerance*. *Am Rev Respir Dis*, 1962. **86**: p. 582-3.
142. Geisler, M., et al., *Expression and characterization of a *Synechocystis* PCC 6803 P-type ATPase in *E. coli* plasma membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 1998. **1368**(2): p. 267-75.
143. Copeland, R.A., *Enzymes : a practical introduction to structure, mechanism, and data analysis*. 2nd ed. ed2000, New York etc.: Wiley-VCH.
144. Clarke, R.J., *Mechanism of allosteric effects of ATP on the kinetics of P-type ATPases*. *Eur Biophys J*, 2009. **39**(1): p. 3-17.
145. Yang, Y., et al., *Activation of *Archaeoglobus fulgidus* Cu(+)-ATPase CopA by cysteine*. *Biochim Biophys Acta*, 2007. **1768**(3): p. 495-501.
146. Medjahed, H. and J.M. Reyrat, *Construction of *Mycobacterium abscessus* defined glycopeptidolipid mutants: comparison of genetic tools*. *Appl Environ Microbiol*, 2009. **75**(5): p. 1331-8.