



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Respuesta de las ATPasas tipo P_{1B} a las condiciones de estrés en *Mycobacterium tuberculosis*

Andrés Felipe León Torres

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

2018

Respuesta de las ATPasas tipo P_{1B} a las condiciones de estrés en *Mycobacterium tuberculosis*

Andrés Felipe León Torres

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Doctor en Ciencias - Bioquímica

Director (a):

Carlos Yesid Soto Ospina, Químico, Msc, PhD

Profesor titular

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2018

A mis padres.

*Por sus enseñanzas, esfuerzo y dedicación
me han ayudado a crecer como persona*

Agradecimientos

A toda mi familia, que son base fundamental y apoyo en mi vida. Por entender mi ausencia durante este proceso. A mis padres, Mariela Torres Novoa y Mario Humberto León Herrera, por ser guías incondicionales. 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 y comprensión.

A la Universidad Nacional de Colombia por la mejor formación académica y personal. Convirtiéndose en el motor de muchos logros y en mi segundo hogar, ya que he sido parte de ella desde el 2005.

A Colciencias, convocatoria de Doctorados Nacionales 6172 por la financiación durante mi proceso de formación. Adicionalmente, por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "Transporte iónico mediado por ATPasas tipo P en la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis* Fase 2: Blancos de atenuación y viabilidad".

A la DIB - Dirección de Investigación Sede Bogotá por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado "Transporte de metales pesados mediado por ATPasas tipo P en la membrana plasmática de Micobacterias: posible aplicación en el diseño de nuevos compuestos antituberculosos". También por sus múltiples apoyos para la asistencia a eventos científicos.

Al Departamento de Química y a sus profesores por la formación como científico. Y por el acompañamiento como estudiante de sus programas. En especial a los Profesores del Área de Bioquímica por compartir conmigo sus conocimientos.

Al profesor Carlos Yesid Soto Ospina por sus enseñanzas y confianza durante el desarrollo de la investigación. Por el acompañamiento que ha tenido desde el primer día que ingrese al grupo de investigación, siendo parte importante de mi formación como investigador.

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. También agradezco a las Profesoras Luz Mary Salazar y Martha Nancy Calderón por su apoyo académico y personal. A mis compañeros y amigos del grupo, en especial a Lorena, Carlos, Sandra, Epifanía, Milena, Laudy y Cristian.

Al profesor José Argüello por su contribución a la presente investigación durante la pasantía hecha en su laboratorio, no solo por facilitar el espacio, las herramientas y el entrenamiento, sino por compartir su conocimiento que fue soporte para el desarrollo de este proyecto. También al *Worcester Polytechnic Institute* junto al profesor por el apoyo económico recibido durante la estancia.

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

Al laboratorio de Microbiología Ambiental y Al grupo de Investigación Interacción Hospedero-Patógeno de la Universidad Nacional de Colombia por la permanente colaboración brindada.

A mis amigos que a pesar de mi ingratitud ayudaron a sobrellevar felizmente esta etapa. Agradeciendo especialmente a Lorena, Carlos, Paola, Erinso, Randy, Juan Carlos, Sandra, Edilene, Epifanía, Milena, Andrey, Daniel, Christopher, y Christian.

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

Resumen

El éxito de *Mycobacterium tuberculosis* como patógeno se fundamenta en su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero, sobreviviendo dentro de los macrófagos. En estas células la micobacteria reside en fagosomas que exhiben una variedad de actividades antimicrobianas como pH ácido, especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), péptidos antimicrobianos, hidrolasas ácidas, bajo contenido de micronutrientes, y concentraciones no fisiológicas de iones de metales pesados. En este escenario hostil, los transportadores activos de cationes, como las ATPasas tipo P_{1B}, juegan un papel relevante en la homeostasis iónica de la bacteria, al estar relacionados con la desintoxicación de estos metales, y con la respuesta al estrés redox. En el caso de *M. tuberculosis*, algunas ATPasas tipo P_{1B} se han descrito como factores de virulencia, debido a su papel en la adaptación de la micobacteria al ambiente intracelular.

En este orden de ideas, resulta interesante conocer la relación entre la actividad de las ATPasas tipo P_{1B} y las condiciones de estrés que *M. tuberculosis* soporta durante la infección, con el fin de evaluar el potencial de estos transportadores de membrana en la viabilidad de *M. tuberculosis*. Para cumplir con este objetivo, el presente trabajo tuvo tres enfoques de estudio diferentes orientados a tener una visión del posible papel de las ATPasas tipo P_{1B} en respuesta a algunas condiciones de estrés que simulan parcialmente el ambiente del fagosoma en el que reside *M. tuberculosis*. El primero, es el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} bajo algunas condiciones de estrés al que *M. tuberculosis* se expone durante la infección. El segundo es la búsqueda de los posibles reguladores transcripcionales de estas ATPasas tipo P_{1B} y la evaluación de su transcripción bajo las mismas condiciones de estrés, para así aproximarse a los potenciales mecanismos de regulación. Finalmente, una aproximación funcional de las tres Cu⁺ ATPasas putativas de *M. tuberculosis*, las que representan cerca de la mitad de ATPasas transportadoras de metales pesados en la micobacteria y cuya función se desconoce. Para su análisis se realizó una caracterización funcional de la actividad enzimática de estas tres proteínas, incluyendo análisis bioinformáticos, manipulaciones

genéticas y de biología molecular, y finalmente un componente bioquímico para responder a los objetivos propuestos.

Se encontró que todas las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* tienen una activación a nivel transcripcional en respuesta a las diferentes condiciones de estrés, como exposición a altas concentraciones de cationes de metales pesados, agentes de estrés oxidativo y nitrosativo, e hipoxia. El análisis transcripcional con cationes de metales pesados mostró que la transcripción de los genes *ctpA*, *ctpG*, y *ctpV* se activa en presencia de Cu²⁺, *ctpC* por Zn²⁺, *ctpG* por Cd²⁺ y *ctpJ* por Co²⁺. Agentes de estrés oxidativo y nitrosativo activaron la transcripción de los genes *ctpA*, *ctpB*, y *ctpD*, mientras que la hipoxia estimuló la expresión de *ctpB* y *ctpC*. Los anteriores resultados muestran que las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* se activan con la presencia de cationes de metales pesados, asociándose con el transporte estos metales y en su desintoxicación celular. También se pudo concluir que estas ATPasas se asocian con la respuesta al estrés redox e hipoxia, ayudando a la célula a responder a estas condiciones adversas. Los resultados del análisis transcripcional de los posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, mostraron una respuesta concertada entre la activación de la transcripción del regulador y la ATPasa tipo P_{1B}, lo que significa que los genes de los reguladores transcripcionales propuestos (*rv0818*, *rv2250c*, *sigC*, *rv0324*, *sigH*, *rv0238*, *cmtR*, *nmtR*, y *csoR*) aumentan sus niveles de expresión en respuesta a las mismas condiciones de estrés previamente establecidos para las ATPasas tipo P_{1B} reguladas.

Resulta interesante que *M. tuberculosis* exprese tres Cu⁺ ATPasas putativas, de las que se desconoce su función biológica. Nuestra hipótesis es que no se trata de sistemas redundantes de extrusión de cobre, sino que se trata de sistemas independientemente controlados que funcionan bajo condiciones metabólicas particulares de la micobacteria. Los análisis funcionales permitieron establecer que cómo se esperaba, las tres enzimas tienen al Cu⁺ como sustrato. Los parámetros cinéticos de estas enzimas se determinaron usando ensayos enzimáticos de actividad Cu⁺ ATPasa y transporte de Cu⁺, permitiendo establecer que CtpA y CtpB se relacionan con enzimas encargadas de metalar proteínas extracitoplasmáticas, en tanto que CtpV se relaciona con la desintoxicación de Cu⁺, necesaria cuando los niveles de cobre intracelular sobrepasan el límite requerido y se vuelven deletéreos para la célula.

El conjunto de resultados de este trabajo sugiere que las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* juegan un papel importante en la respuesta a las condiciones de estrés que la micobacteria enfrenta durante la infección, incluyendo altas concentraciones de metales pesados, estrés redox y bajas tensiones de oxígeno.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas tipo P_{1B}, Cu⁺ ATPasas, transporte iónico, metales pesados y reguladores transcripcionales.

Abstract

The success of *Mycobacterium tuberculosis* as pathogen is based on its ability to evade the host immune response. The bacterium resides inside macrophage phagosomes under an antimicrobial environment, including acid pH, reactive oxygen (ROS) and nitrogen (RNS) species, antimicrobial peptides, acid hydrolases, low micronutrient availability, and non-physiological concentrations of heavy metal cations. In this hostile scenario, membrane transporters such P_{1B}-type ATPases, involved in cation detoxification and response to redox stress, are relevant to survive. Particularly, some mycobacterial P_{1B}-type ATPases have been described virulence factors, due to their role in the adaptation of the mycobacterium to the intraphagosomal environment.

To evaluate the potential of P_{1B}-type ATPases in the bacterial virulence, it is important to know the relationship between these membrane transporters and the stress conditions that *M. tuberculosis* faces during infection. To achieve this goal, this work had three different study approaches. The first one was the transcriptional analysis of P_{1B}-type ATPases under stress conditions that mimic the hostile environment inside phagosomes. The second was the identification of possible transcriptional regulators controlling P_{1B}-type ATPases, by evaluating their transcription behavior under the stress conditions, in an effort to approach to the regulatory mechanisms of P_{1B}-type ATPases. Finally, to gain a better understanding of the possible role of these transporters, the study focused on the 3 putative *M. tuberculosis* Cu⁺ ATPases. Those are about a half of the heavy metal transporting ATPases present in the mycobacteria, and all of them are without functional characterization. This characterization was made including, bioinformatic analysis, genetic and molecular biology manipulations, and a biochemical analysis.

Our analysis showed that all P_{1B}-type ATPases of *M. tuberculosis* are overexpressed in response to different stress conditions, including high concentrations of heavy metal

cations, oxidative and nitrosative stress, and hypoxia. The transcriptional analysis with heavy metal cations showed that the transcription of *ctpA*, *ctpG*, and *ctpV* is activated with Cu^{2+} , *ctpC* with Zn^{2+} , *ctpG* with Cd^{2+} , and *ctpJ* with Co^{2+} . Additionally, oxidative and nitrosative stress promotes transcription of *ctpA*, *ctpB*, and *ctpD*, and hypoxia promotes expression of *ctpB* and *ctpC*. This suggests that *M. tuberculosis* P_{1B}-type ATPases are pivotal in the response to high concentration of heavy metal cations, which is in agreement with their canonical transport/detoxification function. Also, these ATPases are related with the response to redox stress and hypoxia, helping the pathogen to face those adverse conditions. The transcriptional analysis of the possible transcriptional regulators controlling P_{1B}-type ATPases, showed a similar transcriptional response between the transcription regulator and the P_{1B}-type ATPases. The genes of the proposed transcriptional regulators (*rv0818*, *rv2250c*, *sigC*, *rv0324*, *sigH*, *rv0238*, *cmtR*, *nmtR*, and *csoR*) increased their expression in response to the same stress conditions that stimulated the expression of the P_{1B}-type ATPases.

Interestingly, *M. tuberculosis* possesses three putative Cu^+ ATPases. Our hypothesis is that these are not redundant copper extrusion systems, instead, are independently controlled systems responding to specific metabolic conditions. The functional analyzes of those three proteins confirmed that Cu^+ is the substrate of the three enzymes. The kinetic parameters determined by enzymatic assays, including Cu^+ ATPase activity and Cu^+ transport, suggest that CtpB and CtpA are related to enzymes involved in metalation of periplasmic proteins. In contrast, CtpV is homologue to enzymes involved in Cu^+ detoxification.

The set of results presented in this work suggests that *M. tuberculosis* P_{1B}-type ATPases play an important role in the mycobacterial response to stress conditions faced during infection.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, P_{1B}-type ATPases, Cu^+ -ATPases, ion transport, heavy metal cations and transcriptional regulators.

Contenido

	Pág.
Resumen.....	IX
Lista de figuras.....	XVIII
Lista de tablas.....	XXI
Lista de abreviaturas.....	XXII
Introducción.....	1
1. Marco Teórico.....	5
1.1 Mycobacterium tuberculosis, agente etiológico de la TB	5
1.2 Ciclo de Infección por M. tuberculosis	5
1.3 Importancia fisiológica de los iones de metales pesados.....	8
1.4 Barreras físicas de M. tuberculosis en el transporte de metales pesados.....	9
1.5 Transporte de metales pesados a través de la pared celular de M. tuberculosis	10
1.6 Transporte de metales pesados a través de la membrana plasmática de M.	
tuberculosis	11
1.6.1 Transporte de Cu ⁺	12
1.6.2 Transporte de Zn ²⁺	13
1.6.3 Transporte de Fe ^{2+/3+}	14
1.6.4 Transporte de Co ²⁺ y Ni ²⁺	16
1.6.5 Transporte de Mn ²⁺	16
1.7 ATPasas tipo P	16
1.7.1 ATPasas tipo P _{1B} encargadas del transportar metales pesados	21
1.8 Rol de las ATPasas tipo P de M. tuberculosis en el transporte de metales	
pesados.....	23
1.8.1 Mecanismo catalítico	25
1.9 Regulación Transcripcional	27
1.9.1 Regulación mediada por proteínas metaloreguladoras	28
2. Justificación	33
3. Hipótesis Experimental.....	34
4. Objetivos.....	35
4.1 Objetivo general	35
4.2 Objetivos específicos	35

5. Materiales y Métodos	37
5.1 Análisis transcripcional bajo condiciones de estrés de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	37
5.1.1 CMI frente a metales pesados de <i>M. tuberculosis</i>	38
5.1.2 Intoxicación de <i>M. tuberculosis</i> en presencia de metales pesados y agentes de estrés oxidativo/nitrosativo	39
5.1.3 Cultivo de <i>M. tuberculosis</i> bajo condiciones hipóxicas.....	40
5.1.4 Extracción de ARN y síntesis de cADN de <i>M. tuberculosis</i>	41
5.1.5 Análisis transcripcional de las ATPasas tipo P _{1B} por qPCR	42
5.2 Análisis transcripcional de posibles reguladores de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	43
5.2.1 Búsqueda de posibles reguladores de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	43
5.2.2 Análisis transcripcional bajo condiciones de estrés de los reguladores de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	44
5.3 Caracterización funcional de las ATPasas tipo P _{1B-1} de <i>M. tuberculosis</i>	45
5.3.1 Análisis bioinformático de las ATPasas tipo P _{1B-1} de <i>M. tuberculosis</i> : CtpA, CtpB y CtpV	45
5.3.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo	47
5.3.3 Construcción de recombinantes de sobreexpresión	48
5.3.4 Ensayos de toxicidad frente a metales pesados de <i>M. smegmatis</i> sobreexpresando CtpB	58
5.3.5 Sobreexpresión y purificación de CtpA, CtpB y CtpV en <i>E. coli</i>	59
5.3.6 Ensayo de actividad pNPPasa de los extractos purificados CtpA, CtpB y CtpV	61
5.3.7 Ensayo de actividad Cu ⁺ ATPasa de los extractos de de CtpA, CtpB y CtpV purificados	62
5.3.8 Extracción de membrana plasmática.....	63
5.3.9 Ensayo de actividad ATPasa en membrana plasmática enriquecidas con CtpA, CtpB y CtpV	65
5.3.10 Extracción de vesículas evertidas de membrana de <i>E. coli</i> sobreexpresando Cu ⁺ ATPasas de <i>M. tuberculosis</i>	68
5.3.11 Transporte de Cu ⁺ de CtpA, CtpB y CtpV en vesículas evertidas de membrana	69
5.3.12 Construcción de mutantes defectivos de <i>M. tuberculosis</i>	70
6. Resultados y Discusión	79
6.1 Respuesta de las ATPasas tipo P _{1B} a condiciones de estrés	79
6.1.1 Selección de condiciones de estrés que <i>M. tuberculosis</i> enfrenta durante la infección	80
6.1.2 Estandarización de parámetros para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P _{1B} mediante qPCR.....	83
6.1.3 Respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P _{1B}	85
6.2 Análisis transcripcional de posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B}	97
6.2.1 Búsqueda de reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	97
6.2.2 Parámetros para el análisis transcripcional de los posibles reguladores de las ATPasas tipo P _{1B}	105
6.2.3 Respuesta transcripcional de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B}	107

6.3	Análisis funcional de las ATPasas tipo P _{1B-1} de M. tuberculosis	117
6.3.1	Análisis bioinformático de las Cu ⁺ ATPasas de M. tuberculosis: CtpA, CtpB y CtpV	117
6.3.2	Caracterización funcional de CtpA.....	127
6.3.3	Caracterización funcional de CtpB.....	145
6.3.4	Caracterización funcional de CtpV.....	168
6.4	Discusión general de los resultados	177
7.	Conclusiones y Perspectivas	185
7.1	Conclusiones.....	185
7.2	Perspectivas.....	187
Anexo A.	189
Anexo B.	195
Anexo C.	197
Anexo D.	203
Bibliografía.	207

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Ciclo de infección de <i>M. tuberculosis</i>	6
Figura 1-2: Esquema de la envoltura celular de las micobacterias	10
Figura 1-3: Tráfico de Cu ⁺ en macrófagos infectados con <i>M. tuberculosis</i>	13
Figura 1-4: Respuesta de CtpV y CtpC de <i>M. tuberculosis</i> en la desintoxicación de Cu ⁺ y Zn ²⁺ , respectivamente	14
Figura 1-5: Función del Fe ²⁺ intrafagosomal y la respuesta de <i>M. tuberculosis</i>	14
Figura 1-6: Esquema de la organización estructural de las ATPasas tipo P	18
Figura 1-7: Clasificación de las ATPasas tipo P	19
Figura 1-8: Modelo del mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P propuesto por Post-Albers	25
Figura 1-9: Mecanismo del proceso de fosforilación y defosforilación de las ATPasas tipo P	26
Figura 1-10: Ciclo catalítico de las Cu ⁺ ATPasas tipo P que transportan dos cationes por cada ciclo	27
Figura 1-11: Familias de proteínas metaloregulatoras.....	29
Figura 5-1: Esquema de construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA, CtpB y CtpV en <i>E. coli</i>	53
Figura 5-2: Esquema de construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias.....	58
Figura 5-3: Estrategia para la construcción de mutantes defectivos en <i>M. tuberculosis</i> ..	71
Figura 5-4: Estrategia para la construcción de AES de <i>ctpA</i> y <i>ctpB</i>	71
Figura 5-5: Comprobación del genotipo mutante de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra Δ <i>ctpB</i>	75
Figura 6-1: Ensayo de toxicidad de <i>M. tuberculosis</i> frente a metales pesados.....	80
Figura 6-2: Comprobación por PCR de los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P _{1B}	83
Figura 6-3: Respuesta transcripcional de <i>ctpA</i> a condiciones de estrés	86
Figura 6-4: Respuesta transcripcional de <i>ctpB</i> a condiciones de estrés	88
Figura 6-5: Respuesta transcripcional de <i>ctpC</i> a condiciones de estrés.....	89
Figura 6-6: Respuesta transcripcional de <i>ctpD</i> a condiciones de estrés.....	91
Figura 6-7: Respuesta transcripcional de <i>ctpG</i> a condiciones de estrés.....	92
Figura 6-8: Respuesta transcripcional de <i>ctpJ</i> a condiciones de estrés	93
Figura 6-9: Respuesta transcripcional de <i>ctpV</i> a condiciones de estrés.....	94
Figura 6-10: Respuesta de las ATPasas tipo P _{1B} a condiciones de estrés	96

Figura 6-11: Arquitectura genómica del entorno genómico de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	99
Figura 6-12: Comprobación por PCR de los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B}	105
Figura 6-13: Respuesta transcripcional de <i>rv0818</i> a condiciones de estrés.....	108
Figura 6-14: Respuesta transcripcional de <i>rv2250c</i> a condiciones de estrés.....	109
Figura 6-15: Respuesta transcripcional de <i>sigC</i> a condiciones de estrés	110
Figura 6-16: Respuesta transcripcional de <i>rv0324</i> a condiciones de estrés.....	111
Figura 6-17: Respuesta transcripcional de <i>sigH</i> a condiciones de estrés	112
Figura 6-18: Respuesta transcripcional de <i>rv0238</i> a condiciones de estrés.....	113
Figura 6-19: Respuesta transcripcional de <i>cmtR</i> a condiciones de estrés	115
Figura 6-20: Respuesta transcripcional de <i>nmtR</i> a condiciones de estrés	115
Figura 6-21: Respuesta transcripcional de <i>csoR</i> a condiciones de estrés	116
Figura 6-22: Topología, motivos funcionales y dominios de las Cu ⁺ ATPasas tipo P de <i>M. tuberculosis</i>	118
Figura 6-23: Alineamiento múltiple de hélices TM6, TM7 y TM8 y región N-terminal de las Cu ⁺ ATPasas.....	121
Figura 6-24: Mapa de potencial electrostático de los MBD de las Cu ⁺ ATPasas tipo P de <i>M. tuberculosis</i> , <i>M. smegmatis</i> y <i>E. coli</i>	123
Figura 6-25: Modelos de la estructura terciaria de las Cu ⁺ ATPasas de <i>M. tuberculosis</i>	125
Figura 6-26: Alineamiento de estructura terciaria entre el MBD de CtpV y el MBD2 de EcCopA.....	127
Figura 6-27: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpA en <i>E. coli</i>	128
Figura 6-28: Sobreexpresión de CtpA en <i>E. coli</i>	131
Figura 6-29: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpA	132
Figura 6-30: Actividad p-nitrofenil fosfatasa (pNPPasa) a partir del extracto purificado de CtpA.	134
Figura 6-31: Estimulación por Cu ⁺ de la actividad ATPasa del extracto purificado de CtpA	135
Figura 6-32: Efecto de la cisteína en la actividad Cu ⁺ ATPasa de CtpA sobreexpresada en la membrana de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155.....	137
Figura 6-33: Transporte de Cu ⁺ mediado por EcCopA en vesículas evertidas de membrana.....	139
Figura 6-34: Transporte de Cu ⁺ mediado por CtpA en vesículas de membrana evertidas	141
Figura 6-35: Estrategia para la construcción del mutante de <i>M. tuberculosis</i> defectivo en <i>ctpA</i>	143
Figura 6-36: Obtención del AES de <i>ctpA</i>	143
Figura 6-37: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpB en <i>E. coli</i>	145
Figura 6-38: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias	147
Figura 6-39: Sobreexpresión de CtpB en <i>E. coli</i> . a. Esquema del plásmido pALT21 para la sobreexpresión de CtpB	149

Figura 6-40: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpB	150
Figura 6-41: Actividad pNPPasa del extracto purificado de CtpB	151
Figura 6-42: Estimulación por Cu ⁺ y Ag ⁺ de la actividad ATPasa del extracto purificado de CtpB.....	152
Figura 6-43: Transporte de Cu ⁺ mediado por CtpB en vesículas de membrana evertidas	154
Figura 6-44: Efecto de concentraciones variables de metales pesados en el crecimiento de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 sobreexpresando CtpB.....	155
Figura 6-45: La actividad ATPasa de CtpB es estimulada por Cu ⁺ . Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados.	157
Figura 6-46: Condiciones óptimas para la actividad Cu ⁺ ATPasa de CtpB sobreexpresada en la membrana de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155	158
Figura 6-47: La actividad Cu ⁺ ATPasa de CtpB se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten.....	160
Figura 6-48: Estrategia para la construcción del mutante de <i>M. tuberculosis</i> defectivo en <i>ctpB</i>	161
Figura 6-49: Obtención del AES de <i>ctpB</i>	161
Figura 6-50: Obtención del mutante de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra Δ <i>ctpB</i> y comprobación del genotipo	164
Figura 6-51: Efecto de concentraciones variables de Cu ²⁺ en el crecimiento del mutante defectivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra Δ <i>ctpB</i>	165
Figura 6-52: Ensayo de acumulación de Cu en células completas del mutante defectivo de <i>M. tuberculosis</i> H37Ra Δ <i>ctpB</i>	167
Figura 6-53: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpV en <i>E. coli</i>	169
Figura 6-54: Sobreexpresión de CtpV en <i>E. coli</i>	169
Figura 6-55: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpV	170
Figura 6-56: Actividad p-nitrofenil fosfatasa (pNPPasa) del extracto purificado de CtpV.....	171
Figura 6-57: Transporte de Cu ⁺ mediado por CtpV en vesículas de membrana evertidas	172
Figura 6-58: La actividad Cu ⁺ ATPasa de CtpV se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten.....	174
Figura 6-59: Resumen de los resultados obtenidos del estudio de las ATPasas tipo P _{1B} y sus posibles reguladores transcripcionales	178

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1: Iniciadores usados para análisis por qPCR de los genes de las ATPasas tipo P _{1B}	42
Tabla 5-2: Iniciadores usados para análisis por qPCR de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B}	44
Tabla 5-3: Cepas bacterianas utilizadas a lo largo de este estudio.....	47
Tabla 5-4: Condiciones de las PCR realizadas a lo largo de este estudio.	50
Tabla 6-1: Concentración subletal, CMI, y concentración de cationes de metales pesados en el fagosoma de <i>M. tuberculosis</i>	81
Tabla 6-2: Parámetros utilizados para el análisis por qPCR de los genes de las ATPasas tipo P _{1B}	84
Tabla 6-3: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B} a estudiar...	97
Tabla 6-4: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B} identificados por Chip-seq.....	101
Tabla 6-5: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B} identificados por TFOE	102
Tabla 6-6: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P _{1B}	105
Tabla 6-7: Curvas de eficiencia de las parejas de iniciadores utilizados en el análisis por qPCR de los genes de los reguladores de las ATPasas tipo P _{1B}	106
Tabla 6-8: Características a nivel de gen y proteína de las Cu ⁺ ATPasas de <i>M. tuberculosis</i>	118
Tabla 6-9: Parámetros del modelamiento de estructura terciaria por homología de los MBD de las Cu ⁺ ATPasas.....	122
Tabla 6-10: Parámetros del modelamiento de estructura terciaria por homología de las ATPasas tipo P _{1B} de <i>M. tuberculosis</i>	125
Tabla 6-11: Cinética enzimática de CtpA.....	136
Tabla 6-12: Cuantificación de las Cu ⁺ ATPasas en los extractos de vesículas evertidas de membrana	138
Tabla 6-13: Parámetros cinéticos de las Cu ⁺ ATPasas de <i>M. tuberculosis</i>	176

Lista de abreviaturas

Abreviatura	Término
ADC	Albumina de suero bovino, dextrosa y catalasa
ADN	Ácido Desoxirribonucleico
ADP *	Adenosina 5'-difosfato
AES *	Sustrato de intercambio alélico
AG	Arabinogalactano
AM	Ácidos micólicos
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido Ribonucleico
ATP *	Adenosina 5'-trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette Guérin
BSA *	Albúmina sérica bovina
CDF *	Facilitador de difusión de catión
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dNTP *	Desoxirribonucleótido (base A, C, T o G)
G	Gravedades
H	Coeficiente de Hill
H37Ra	Cepa de referencia no virulenta <i>M. tuberculosis</i> H37Ra
H37Rv	Cepa de referencia virulenta <i>M. tuberculosis</i> H37Rv
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
$K_{1/2}$	Constante 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 multifarmacorresistente
MP	Marcador de peso molecular
Nt	NucleótidosPBS
NramP *	Proteína de macrófago asociada a la resistencia natural
OADC	Ácido oleico, albumina de suero bovino, dextrosa y catalasa
OD	Densidad óptica
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR *	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB *	Protein Data Bank
PDIM	Ftiocerol dimicoserato

PG	Peptidoglicano
PGL	Glicolípido fenólico
Pi	Fosforo inorgánico o fosfato
PI	Punto isoeléctrico
PIM	Manosido de Fosfatidil inositol
RND *	Resistencia-Nodulación-División celular
RNS *	Especies reactivas de nitrógeno
ROS *	Especies reactivas de oxígeno
SDS *	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE *	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SL	Sulfolípido
TB	Tuberculosis
TBE	Tris-Borato-EDTA
TDM	Dimicolato de trehalosa
T _m *	Temperatura de fusión
TM	Transmembrana
TM-MBS *	Sitio de unión al metal transmembranal
U	Unidad de actividad enzimática
V _{max}	Velocidad máxima
VIH	Virus de inmuno-deficiencia humana
XDR-TB *	Tuberculosis extremadamente farmacorresistente
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 micobacteria considerada uno de los mayores problemas de salud pública en el mundo [1]. Según el último reporte de la organización mundial de la salud (OMS), en el año 2016 se registraron cerca de 10,4 millones de nuevos casos y 1,3 millones de muertes por TB [1]. El control de la TB se ha dificultado en las últimas décadas por el surgimiento de cepas resistentes a los fármacos antituberculosos actualmente disponibles (TB multi-fármaco-resistente MDR-TB y extremadamente multi-fármaco-resistente XDR-TB) y por la coinfección TB-VIH (virus de inmunodeficiencia humana) [1]. Actualmente, se hace prioritario el desarrollo de nuevas estrategias para el control de la TB, por lo que es indispensable el entendimiento de los mecanismos moleculares que la micobacteria utiliza para ser un patógeno exitoso.

Dentro de las estrategias actuales para el control de la TB están la vacunación y quimioterapia, y el bacilo de Calmette/Guérin (BCG), que es la única vacuna existente y aprobada contra la TB. BCG es una cepa atenuada, obtenida por pases sucesivos de *M. bovis* en medio de cultivo durante 13 años [2]. Esta vacuna tiene grandes limitaciones debido a su baja eficacia en prevenir la TB pulmonar en adultos [3, 4]; sin embargo, continúa siendo extensamente empleada debido a que permite la prevención de algunas formas de TB en la infancia [1, 4].

En cuanto a la quimioterapia, la limitación del esquema con antibióticos de primera o segunda línea radica en lo prolongado del tratamiento, el que se dificulta por la existencia de poblaciones de bacilos con diferentes estados metabólicos durante el proceso infeccioso. Los antituberculosos tradicionales reaccionan de forma diferente frente a los diferentes estados metabólicos, toda vez que solo están dirigidos frente al metabolismo activo de *M. tuberculosis* [5]. La prolongada duración del tratamiento induce su abandono, lo que favorece la aparición de mutaciones puntuales en los genes dianas de los antibióticos y constituye la causa principal del surgimiento de cepas resistentes a estos fármacos [5, 6].

La transmisión de la TB se da por vía aérea desde un individuo infectado a uno sano. La infección inicia cuando la bacteria inhalada alcanza los alveolos pulmonares y es fagocitada por macrófagos y células dendríticas [7]. *M. tuberculosis* ha evolucionado para sobrevivir dentro de los macrófagos inhibiendo la formación del fagolisosoma, caracterizado por desplegar múltiples actividades antimicrobianas, que incluyen pH ácido, especies reactivas de oxígeno (ROS) y nitrógeno (RNS), péptidos antimicrobianos, hidrolasas ácidas, bajo contenido de micronutrientes, y concentraciones no fisiológicas de iones de metales pesados [8, 9]. *M. tuberculosis* persiste en los fagosomas enfrentando un ambiente de altas concentraciones de iones de metales pesados. Las concentraciones de Cu²⁺, Fe²⁺ y Zn²⁺ dentro de fagosomas de macrófagos infectados con micobacterias aumentan entre 1 y 24 h post-infección [10], alcanzando niveles antibacterianos de Cu⁺ y Zn²⁺ [9]. En particular, las altas concentraciones de Cu⁺ generan la respuesta de ROS vía estrés oxidativo, desnaturalización de proteínas (por interacción del metal con los grupos tiol), inactivación de enzimas por la sustitución de otros metales, y desestabilización de la membrana [11].

El término de metal pesado tiene un uso indiscriminado y no unificado [12, 13]. A lo largo de este trabajo, este término se usará para referirse a los metales de transición que pueden ser tóxicos para la célula dependiendo de su concentración. Algunos cationes actúan como micronutrientes a bajas concentraciones, sin embargo, son tóxicos para la célula en altas concentraciones. Se consideran micronutrientes ya que forman parte estructural y catalítica de algunas enzimas como los citocromos de la cadena respiratoria y las enzimas involucradas en la respuesta al estrés oxidativo [11]. Por lo tanto, estos metales de transición además de ser fundamentales para la vida del patógeno, resultan esenciales para la respuesta micobacteriana a la explosión oxidativa dentro del macrófago [11]. *M. tuberculosis* posee dos superóxido-dismutasas, SodA y SodC que utilizan Mn²⁺/Fe²⁺ y Cu²⁺ como cofactor, respectivamente [14, 15], mientras que otras enzimas de respuesta a estrés oxidativo utilizan Fe²⁺ como cofactor: la catalasa-peroxidasa (KatG), la alquilo hidroperóxido reductasa (AhpC), y las tiorredoxinas (TrxA y TrxB) [16]. Por lo tanto, la homeostasis iónica de estos metales es fundamental para la viabilidad del bacilo tuberculoso.

Se ha establecido, que las ATPasas tipo P juegan un papel relevante en la homeostasis iónica celular, ya que transportan cationes en contra del gradiente de concentración [17]. De forma interesante, *M. tuberculosis* posee un número elevado de ATPasas tipo P, nombradas como CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI, CtpJ y CtpV. De las 11 ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*, siete han sido identificadas como posibles transportadores de cationes de metales pesados, lo que les supone una importancia en la supervivencia de bacilo tuberculoso dentro del macrófago [18]. Actualmente, estas ATPasas se han relacionado con el transporte de metales pesados como Cu^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , favoreciendo los procesos de desintoxicación bacteriana. Gran parte de las ATPasas, como *ctpG*, *ctpV*, *ctpC*, y *ctpA* tipo P de *M. tuberculosis* se sobreexpresan durante la infección de macrófagos humanos [19]. Se conoce que la ausencia de ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ como CtpC, CtpD y CtpV atenúan la virulencia de *M. tuberculosis* en modelos animales [20]. Específicamente, CtpC y CtpV se han catalogado como factores de virulencia [21], debido a que responden al aumento de la concentración intrafagosomal de Cu^+ y Zn^{2+} durante el proceso infectivo. Por otra parte, *ctpA* hace parte del grupo de genes de *M. tuberculosis* que se sobreexpresa *in vivo* durante el proceso de infección de células humanas [22]. Adicionalmente, algunos estudios genómicos han sugerido que *M. tuberculosis* posee tres Cu^+ ATPasas putativas, CtpA, CtpB y CtpV [18]. Sin embargo, se desconocen las diferencias entre ellas, y por tanto su funcionalidad.

Los anteriores hallazgos sugieren una relevancia de las ATPasas $\text{P}_{1\text{B}}$ en la respuesta a condiciones estrés, controlando el contenido intracelular de metales pesados, y entregando cofactores a enzimas extracitoplasmáticas [23, 24]. El presente trabajo busca establecer la relación entre la actividad de las ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ y la respuesta a ciertas condiciones de estrés que *M. tuberculosis* enfrenta durante el proceso infectivo. De esta manera, se busca determinar la condición particular que conlleva a una respuesta transcripcional por parte de estas enzimas y sus posibles reguladores transcripcionales. Por otra parte, tenemos la hipótesis que CtpA, CtpB y CtpV pueden transportar un mismo catión, en este caso Cu^+ , pero podrían presentar funciones biológicas diferentes, tal y como se ha observado en otros modelos celulares [18, 25]. Con el fin de evaluar dicha hipótesis, nos planteamos ensayos fenotípicos de cepas mutantes y de sobreexpresión de estas ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$, así como ensayos de actividad ATPasa dependiente de Cu^+ , y ensayos de transporte de Cu^+ , orientados no solo a confirmar el sustrato transportado por CtpA, CtpB y CtpV, sino de establecer la posible función biológica de dichos transportadores.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo podrían ser de utilidad para entender el posible papel de las ATPasas tipo P_{1B} en la adaptación del bacilo tuberculoso durante la infección, e indagar su valor como posibles dianas terapéuticas. Al ser proteínas de membrana, estas enzimas tienen una ventaja para el desarrollo de fármacos, ya que es posible evitar los problemas relacionados su la permeabilidad de la membrana plasmática [26]. Adicionalmente, teniendo en cuenta que la delección de estos transportadores conlleva a una pérdida parcial de la virulencia, también se podría explorar la utilidad de las ATPasas tipo P en el diseño de mutantes atenuados de *M. tuberculosis* con potencial vacunal.

1. Marco Teórico

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*, agente etiológico de la TB

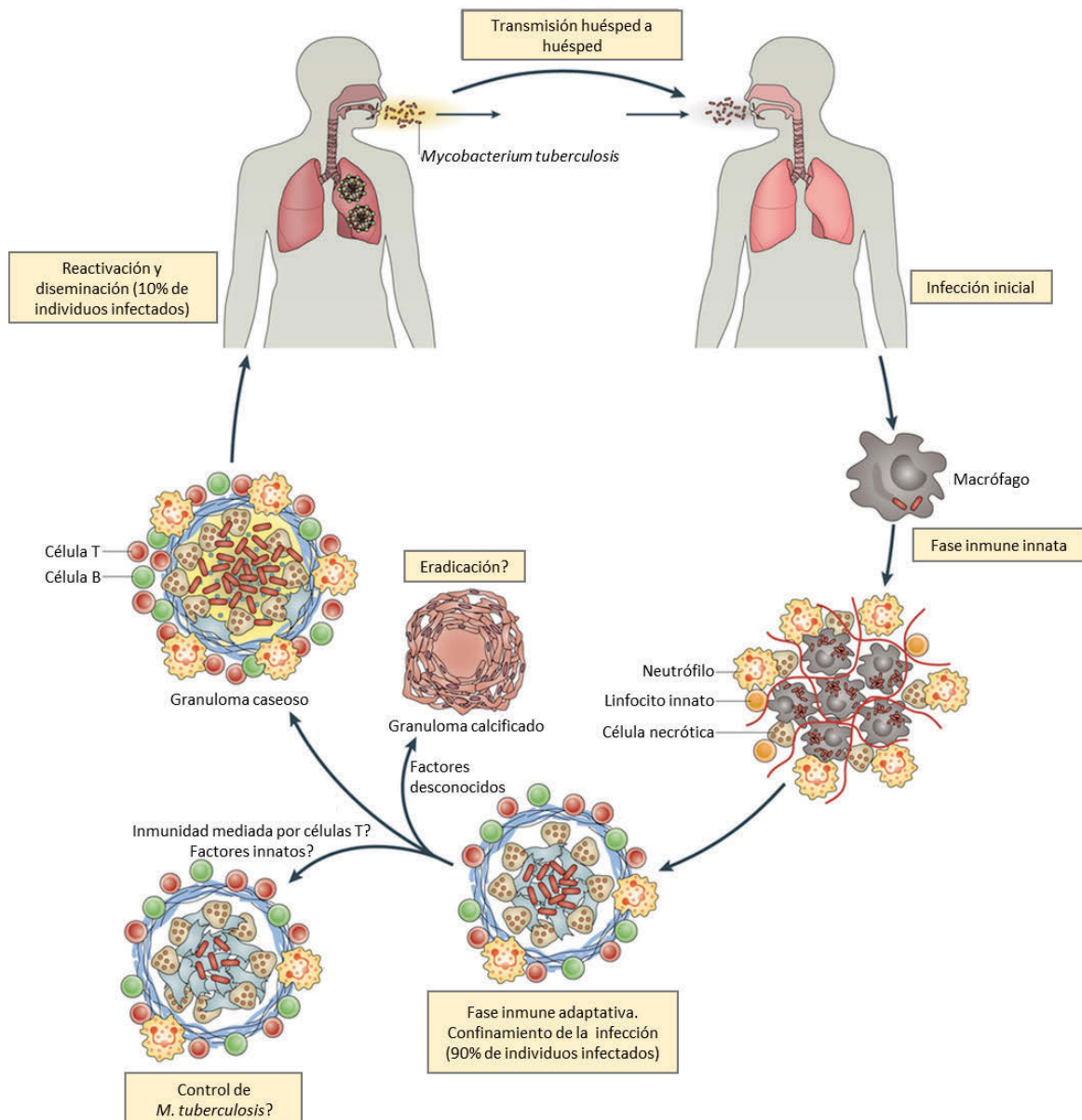
El principal causante de la TB en humanos es el bacilo ácido-alcohol resistente, *Mycobacterium tuberculosis*. Esta bacteria se caracteriza por ser un bacilo ácido-alcohol resistente, presentar tiempos de generación largos (~24 h) y una pared celular hidrofóbica y compleja, crucial para su supervivencia [27]. *M. tuberculosis* tiene la capacidad de entrar en periodos de latencia, lo que dificulta la acción de compuestos antimicrobianos. Además de los estados de latencia, la resistencia del bacilo tuberculoso a los antimicrobianos también viene dada por su compleja pared celular, la presencia de enzimas modificadores (beta-lactamasas) y por sus sistemas de eflujo [28]. La replicación de *M. tuberculosis* dentro del hospedero puede variar dependiendo de su ubicación. Por ejemplo, en cavidades pulmonares los bacilos se dividen de forma activa, dentro de macrófagos inician la adaptación a la latencia y en granulomas se replican solo ocasionalmente [28].

1.2 Ciclo de Infección por *M. tuberculosis*

La TB se transmite por vía aérea cuando *M. tuberculosis* viaja a través de aerosoles desde un individuo infectado a otro sano (Figura 1-1). Aunque la forma más frecuente de TB es la infección pulmonar, los bacilos pueden localizarse en otros órganos. Una vez ingresan a los pulmones del individuo sano, los bacilos se ubican en los alveolos pulmonares donde son fagocitados por macrófagos y células dendríticas del sistema inmune del hospedero [7]. 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 [29]. Sin embargo, durante el proceso infectivo, la micobacteria enfrenta diferentes condiciones de estrés, tal como los bajos niveles de nutrientes y oxígeno, y altos niveles de especies reactivas de oxígeno

(ROS) y nitrógeno (RNS) [30] [8, 9]. A pesar de todo el bacilo logra responder de manera efectiva a estas condiciones evadiendo el ataque del sistema inmune y progresando en la infección.

Figura 1-1: Ciclo de infección de *M. tuberculosis*. El ciclo de infección inicia por la inhalación del bacilo tuberculoso, el que se aloja en los alveolos pulmonares estableciendo la infección primaria. Si el sistema inmune logra erradicar la micobacteria, el individuo queda libre de la infección; de lo contrario, se genera un equilibrio inmunológico entre la micobacteria confinada en una lesión que se conoce como granuloma y un estado de latencia. Si el sistema inmune recae, el bacilo se reactiva, generando la enfermedad, que en su desarrollo conlleva a un daño tisular. Tomado y adaptado de [31].



La infección por *M. tuberculosis* suele ser asintomática en personas sanas, ya que el sistema inmune logra confinar a la micobacteria dentro de la lesión tuberculosa o granuloma. Allí la micobacteria puede permanecer mucho tiempo en estado de latencia sin presentar manifestaciones clínicas de la enfermedad, lo que se conoce como infección latente. En contraste, la infección activa es la versión sintomática y contagiosa de la TB. Los individuos infectados que desarrollan la infección activa presentan un desbalance inmunológico, debido a que el sistema inmune innato y adaptativo del hospedero no responde adecuadamente para controlar la infección, la micobacteria escapa del granuloma y se disemina por vía linfática o sanguínea. Por lo tanto, entre un 15 y 20% de los casos la TB involucra otros órganos del cuerpo humano diferentes a los pulmones [6]. La diseminación de la enfermedad depende de diversos factores como, la malnutrición, la diabetes, la terapia con medicamentos inmunosupresores, la coinfección con el VIH, etc.

La respuesta inmune a la infección con *M. tuberculosis* se puede dividir en cuatro fases: inmunidad innata, inmunidad adaptativa, fase quiescente o latente, y fase replicativa. De ellas, las tres primeras son asintomáticas, y en algunos individuos la bacteria puede ser eliminada durante la fase de inmunidad innata sin generar células T de memoria. En la fase de inmunidad adaptativa, células T entran en contacto con las células presentadoras de antígeno generando células T de memoria; las células B también se activan y producen anticuerpos específicos a *M. tuberculosis*. En este momento es posible la eliminación de la infección. Sin embargo, la mayoría de individuos progresan a una fase quiescente o latente, que puede perdurar por el resto de su vida. En latencia, la bacteria es contenida dentro de granulomas, una estructura creada para contener los macrófagos infectados, rodeada de células T y B. Este balance inmunológico el patógeno no se erradica, pero si previene su replicación y diseminación. La bacteria puede escapar del control de los granulomas y llegar a una fase replicativa; en este desbalance, se desensamblan los granulomas se produce una fase aguda de la infección [32].

Los microambientes a los que se enfrenta *M. tuberculosis* durante el ciclo de infección son variables; entre otros, la micobacteria debe enfrentarse a concentraciones tóxicas de metales pesados. Específicamente en el fagosoma conteniendo el bacilo tuberculoso, la concentración de Cu^{2+} , Fe^{2+} y Zn^{2+} aumenta en las primeras horas de infección [10], lo que sugiere que estos metales son relevantes en la respuesta por parte de los macrófagos. La micobacteria responde al aumento de la concentración estos metales para disminuir su

concentración a niveles tolerables en el citosol bacteriano. En el caso específico del Cu²⁺, que se considera como uno de los iones metálicos más utilizados por el macrófago para controlar algunos patógenos intracelulares [11], su concentración fagosomal aumenta hasta 500 µM, una concentración tóxica para *M. tuberculosis*, del que se conoce una concentración mínima inhibitoria (CMI) de Cu²⁺ <25 µM [30]. Otros metales de transición como Ni²⁺ y Mn²⁺ no presentan cambios significativos de concentración dentro del fagosoma luego de la infección con el bacilo tuberculoso [10].

1.3 Importancia fisiológica de los iones de metales pesados

Dentro de las funciones de los iones de metales pesados en las células están: ser cofactores de enzimas que catalizan reacciones de óxido-reducción e hidrolíticas, componentes estructurales de biomoléculas, intervenir en rearrreglos estructurales de moléculas orgánicas, y transferencia de electrones [33, 34]. Por tanto, iones como Cu⁺²⁺, Co²⁺, Fe^{2+/3+}, Ni²⁺ y Zn²⁺ juegan un papel relevante en la fisiología de los microorganismos. Por ejemplo, Zn²⁺ hace parte estructural de proteínas al estabilizar dominios proteína-proteína, considerándose como un análogo inorgánico de un puente disulfuro en el ambiente reductor del citosol [33]. Zn²⁺ también tiene funciones catalíticas en las enzimas.

M. tuberculosis posee dos superóxido dismutasas, SodA y SodC, que tienen como cofactores Fe^{2+/3+}/Mn²⁺ y Cu⁺²⁺, respectivamente [14, 23, 35]. Estas enzimas contribuyen a la desintoxicación de ROS al convertir el ion superóxido (O₂⁻) en oxígeno molecular y peróxido de hidrógeno [16, 36]. Otras enzimas que están involucradas con la respuesta al estrés oxidativo son la catalasa-peroxidasa, KatG, la alquilo hidroperóxido reductasa, AhpC, y las proteínas tiorredoxina TrxA y TrxB, que utilizan Fe²⁺ como cofactor [8, 16], de manera similar a la citocromo c oxidasa que utiliza Cu⁺ en su centro catalítico [37]. La importancia de estas enzimas radica en que son requeridas para la virulencia y supervivencia de las micobacterias en modelos *in vivo* [8, 35, 36].

La función específica de los iones de metales pesados evidencia la necesidad del equilibrio de su concentración en el interior celular (homeóstasis iónica). Por lo tanto, una alteración en la concentración iónica induce una reprogramación del metabolismo celular para minimizar los efectos de esta variación [33]. Las células requieren del eflujo de iones de

metales cuando sus concentraciones intracelulares llegan a ser tóxicas. Para ello, todos los procesos involucrados en la homeostasis están gobernados por la formación de complejos de coordinación metal-proteína [33].

1.4 Barreras físicas de *M. tuberculosis* en el transporte de metales pesados

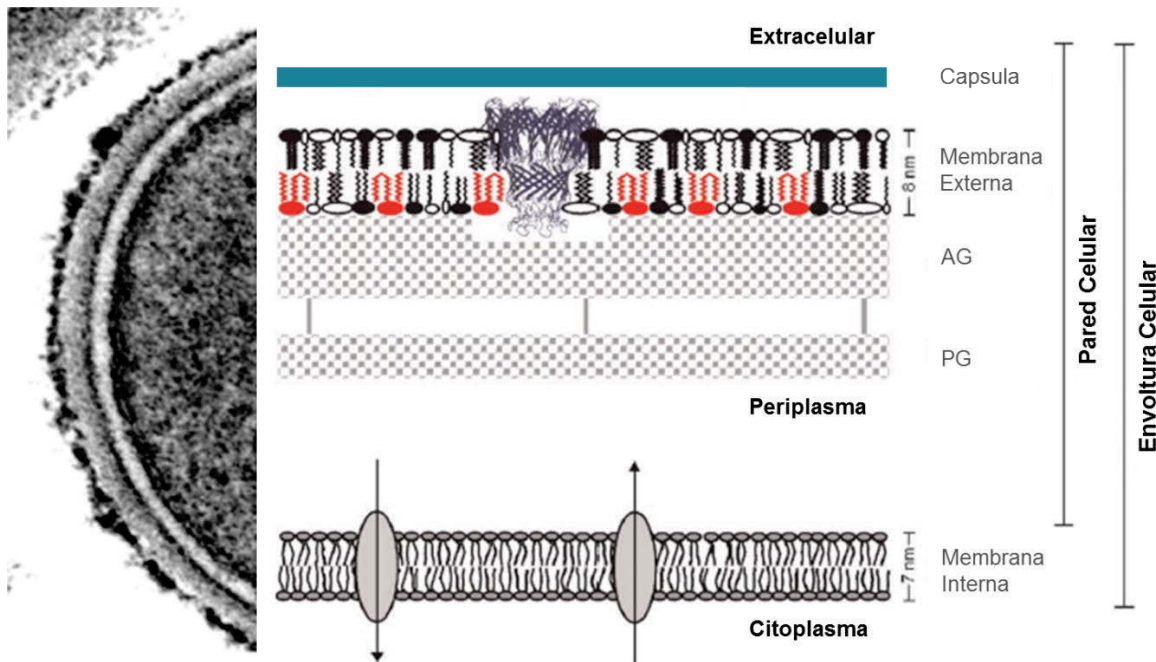
El transporte de iones en la micobacteria implica atravesar su envoltura celular (Figura 1-2), una estructura compleja formada por tres componentes [38]: la cápsula, cuya síntesis parece estar controlada por mecanismos reguladores dependientes del huésped en micobacterias patógenas; la pared celular, constituida por unión covalente entre peptidoglicano, arabinogalactano y los ácidos micólicos; y la membrana plasmática, cuya composición es similar a la de otras bacterias. Las micobacterias no poseen estrictamente una membrana externa como las bacterias Gram-negativas, pero se considera para ellas una membrana externa no canónica compuesta por ácidos micólicos y lípidos extraíbles [39, 40], lo que las clasificaría como microorganismos Gram indeterminados. Las barreras de la envoltura micobacteriana se caracterizan por brindar una baja permeabilidad de solutos, limitando su captación de moléculas polares [39]. Para que los iones logren traspasar estas barreras se hace necesario el uso de sistemas proteicos (porinas y transportadores de membrana plasmática), o quelantes que enmascaren su carga.

A continuación, se describen los componentes de la envoltura celular de las micobacterias [40] y [39]):

- i. La membrana plasmática similar a la de otras bacterias, con una bicapa lipídica semipermeable principalmente compuesta de cardiolipina (52%), fosfatidilinositol-manósidos (36-38%), fosfatidiletanolamina (10%) y en menor medida, fosfatidilglicerol, difosfatidilglicerol y fosfatidilinositol.
- ii. Pared celular compuesta por peptidoglicano, arabinogalactano, y ácidos micólicos de cadena larga (60 a 90 carbonos) α -alquilados, β -hidroxilados y esterificados con el arabinogalactano.
- iii. La capa externa de ácidos grasos libres, fácilmente removibles (ftiocerol dimicocerosatos, glicolípidos fenólicos y glicolípidos derivados de la trehalosa).
- iv. La cápsula compuesta por polisacáridos y proteínas, y en algunos casos, glicolípidos. Los principales componentes de la cápsula de las micobacterias de crecimiento lento son

los polisacáridos como el glucano, en tanto que las de crecimiento rápido poseen principalmente proteínas.

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 microscopia de transmisión electrónica. La otra parte de la figura corresponde a un esquema de la envoltura micobacteriana en el que se observa la membrana plasmática, periplasma, componentes de la base de la pared celular (peptidoglicano “PG”, Arabinogalactano “AG” y ácidos micólicos) y lípidos extraíbles, que con los ácidos micólicos forman la membrana externa. Finalmente se encuentra la capa externa, llamada “capsula” para especies patogénicas. (Figura adaptada de las referencias [40] y [39]).



1.5 Transporte de metales pesados a través de la pared celular de *M. tuberculosis*

La pared compleja de las micobacterias influye considerablemente la tasa de captura y expulsión de iones de metales pesados [33]. Normalmente, el transporte de iones a través de la pared es mediada por proteínas formadoras de poros hidrofílicos, conocidas como porinas [37, 39-41]. Las porinas son proteínas triméricas que forman barriles- β , y se encuentran embebidas en la membrana externa permitiendo la difusión pasiva de iones metálicos y otras moléculas polares [33]. MctB (*Mycobacterial Copper transport protein B*, siglas en Inglés) es una porina asociada con la función de transporte a Cu^{2+} (oxidado debido al ambiente oxidante) desde el espacio periplasmático hacia el exterior celular y

con la resistencia a Cu^+ en *M. tuberculosis* [34, 37]. Hasta la fecha no se conoce en *M. tuberculosis* transportadores asociados al transporte selectivo de otros iones de metales de pesados como Co^{2+} , $\text{Fe}^{2+/3+}$, Ni^{2+} y Zn^{2+} . Los iones de metales pesados que logran traspasar la pared celular atraviesan el periplasma mediante un mecanismo que aún no se conoce en las micobacterias. En otros sistemas como humanos, *Enterococcus*, *Bacillus subtilis*, etc. esta función de transporte la cumplen metalochaperonas, hasta ahora no descritas en *M. tuberculosis* [42].

1.6 Transporte de metales pesados a través de la membrana plasmática de *M. tuberculosis*

M. tuberculosis tiene un número mayor de sistemas de transporte de iones de metales pesados en la membrana plasmática, comparado con los presentes en su pared celular. En su mayoría, se trata de enzimas que utilizan la hidrólisis de ATP o la energía proveniente del co-transporte de H^+ u otros iones como fuerza motriz, como por ejemplo las pertenecientes a las familias de las ATPasas tipo P, ABC (*ATP-binding cassette*, siglas en Ingles), transportadores NramP (*Natural Resistance-associated Macrophage Protein*, siglas en Ingles), RND (*Resistance-Nodulation-Cell Division*, siglas en Ingles), y CDF (*Cation Diffusion Facilitator*, siglas en Ingles). En el caso de las ATPasas tipo P y ABC, el ATP se hidroliza en la cara citoplasmática de la membrana. Algunos de estos transportadores como NramP, RND Y CDF utilizan la energía derivada del transporte de iones a favor del gradiente de concentración para transportar otro en contra del gradiente. Generalmente, la dirección del transporte de los iones de metales pesados depende de la familia de transportador utilizado. Los transportadores ABC y NramP se encargan de la captura de iones hacia el interior celular, mientras que las proteínas CDF, RND y ATPasas tipo P se encargan del eflujo [33].

La proteína de membrana fagosomal NramP-1 se encarga de mediar el transporte de iones de metales pesados en macrófagos humanos durante la interacción hospedero-patógeno [8]. En el genoma de *M. tuberculosis* existe un homólogo de NramP-1 conocido como MramP (*Mycobacterial Resistance-associated Macrophage Protein*, siglas en inglés), que se encarga del transporte de Mn^{2+} , Zn^{2+} y Ni^{2+} a diferentes tiempos de infección [43]. Este sistema antiporte catión divalente-protón utiliza como fuerza motriz el cotransporte de un protón [43]. La inactivación del gen que codifica para MramP no afecta la virulencia en

modelos de ratón, sugiriendo que existen sistemas de transporte alternativos que suplen la función de MramP [43].

La respuesta a iones de metales pesados en *M. tuberculosis* no se limitan solo a MramP. A continuación, se describen los sistemas de transporte de cationes de metales pesados descritos para el bacilo tuberculoso, de acuerdo con el catión transportado.

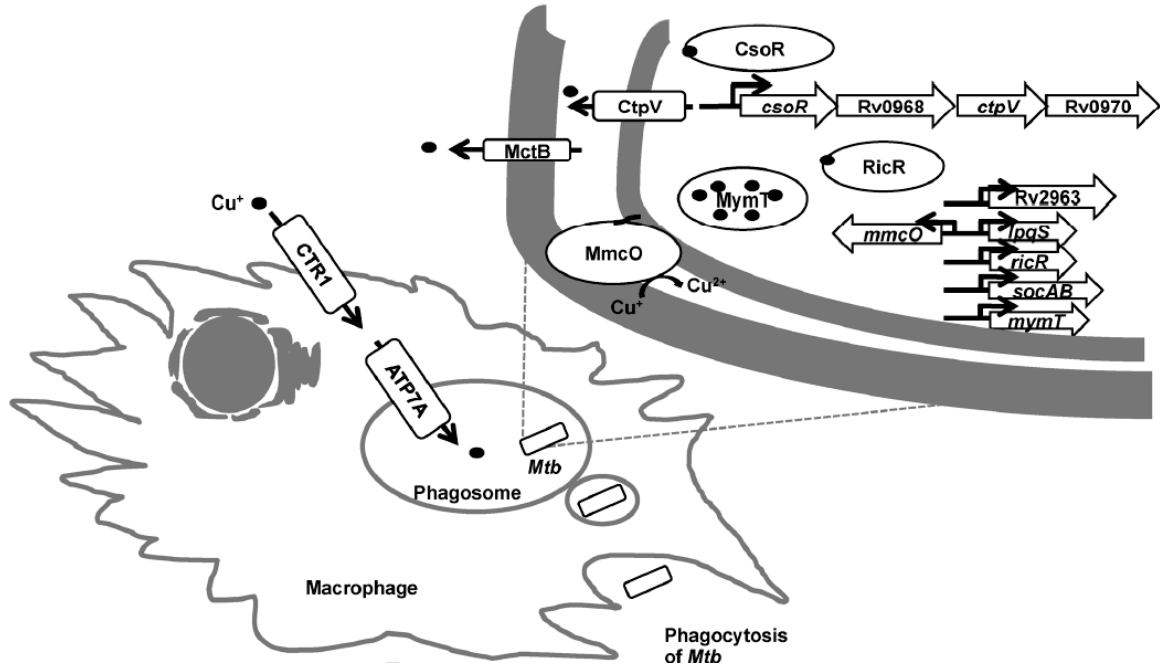
1.6.1 Transporte de Cu⁺

El citosol bacteriano presenta bajas concentraciones de Cu⁺ comparado con las concentraciones normales de Fe²⁺, Mn²⁺ y Zn²⁺ [33]. Por lo tanto, la concentración de Cu⁺ en el citosol debería ser regulado por proteínas metaloreguladoras de alta afinidad [42]. En macrófagos infectados se presenta un aumento en la concentración de Cu⁺ que induce una respuesta de la micobacteria a esta condición de estrés. La principal respuesta de la micobacteria a elevadas concentraciones de Cu está mediada por CtpV, una ATPasa tipo P que se encarga del eflujo de Cu⁺ del citosol al periplasma. A continuación, el transporte de Cu⁺ a través de la pared es mediado por el transportador MctB ubicado en la membrana externa, permitiendo así la salida de Cu⁺ de la bacteria hasta el lumen fagosomal (Figura 1-3) [37].

En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentran dos genes (*ctpA* y *ctpB*) homólogos a *ctpV*, que de acuerdo con predicciones *in silico* podrían transportar y estar involucrados en la desintoxicación de Cu⁺ [18]. Aunque la expresión de *ctpA* y *ctpB* no sea inducida por niveles altos de Cu⁺ [11], Estos podrían cumplir otras funciones fisiológicas diferentes a la desintoxicación, como es la respuesta al estrés oxidativo.

En otros sistemas biológicos existen chaperonas que se encargan de entregar el Cu⁺ citosólico a las ATPasas tipo P_{1B}, favoreciendo de esta forma el transporte del catión. Hasta el momento, este tipo de metalochaperonas no se han descrito para *M. tuberculosis*, pero por localización en el genoma y posible homología, los genes *rv3269*, *rv1993c* y *rv0968* podrían cumplir esta función [44]. Adicionalmente se especula que posiblemente la función de entrega de Cu⁺ a las ATPasas tipo P_{1B} la cumplan pequeñas moléculas que contengan grupos tioles, como los micotioles, el mayor tiol encontrado en micobacterias [37].

Figura 1-3: Tráfico de Cu^+ en macrófagos infectados con *M. tuberculosis*. Luego de la activación de macrófagos, la concentración de Cu en el fagosoma se incrementa debido a los niveles elevados de los transportadores CTR1 y ATP7A. Para combatir este exceso de Cu^+ , *M. tuberculosis* utiliza diferentes mecanismos los que se describen en el texto. Figura tomada de [37].

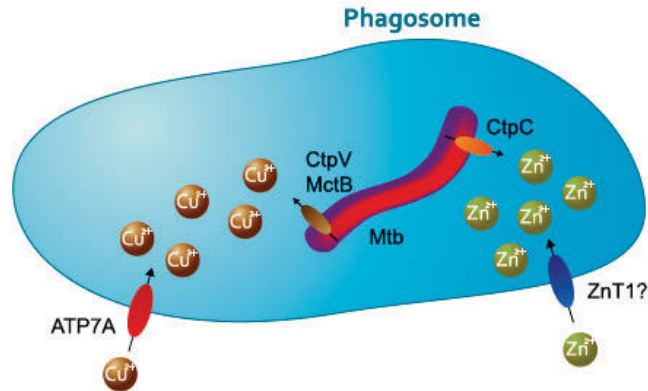


Se ha reportado otro mecanismo diferente al eflujo de Cu^+ en *M. tuberculosis*; se trata de la metalotioneína, MymT (*Mycobacterial Metallothionein*, siglas en Ingles), que son pequeñas proteínas ricas en cisteínas y que tienen la habilidad de unir varios iones de metales pesados produciendo complejos de menor toxicidad [37]. La expresión de *mymT* en el citosol es altamente inducida por Cu^+ , pero también es estimulada por otros iones como Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} , estrés oxidativo y nitrosativo [37, 45].

1.6.2 Transporte de Zn^{2+}

El Zn^{2+} es transportado a través de la membrana plasmática de *M. tuberculosis* por medio de los transportadores ABC, CDF y MramP [33]. En el interior del fagosoma, ocasionalmente la micobacteria enfrenta niveles tóxicos de Zn^{2+} , por lo que el bacilo utiliza mecanismos eficientes para su eflujo mediado por ATPasas tipo P, o transportadores protón antiporte CDF, estos últimos muy comunes en procariotas [33]. Se conoce que la ATPasa tipo P, CtpC, previene la intoxicación con Zn^{2+} cuando *M. tuberculosis* se encuentra un ambiente intrafagosomal (Figura 1-4) [9].

Figura 1-4: Respuesta de CtpV y CtpC de *M. tuberculosis* en la desintoxicación de Cu⁺ y Zn²⁺, respectivamente. La acumulación de Cu⁺ y Zn²⁺ en el fagosoma de macrófagos activados se da por los transportadores ATP7A y ZnT1, respectivamente; en el caso de ZnT1 se especula que transporte Zn²⁺ pero actualmente no se ha comprobado esta función. En *M. tuberculosis* las ATPasas tipo P_{1B} CtpV y CtpC, y la porina de Cu MctB, ayudan a la desintoxicación del bacilo con estos dos metales. Figura tomada de [8].

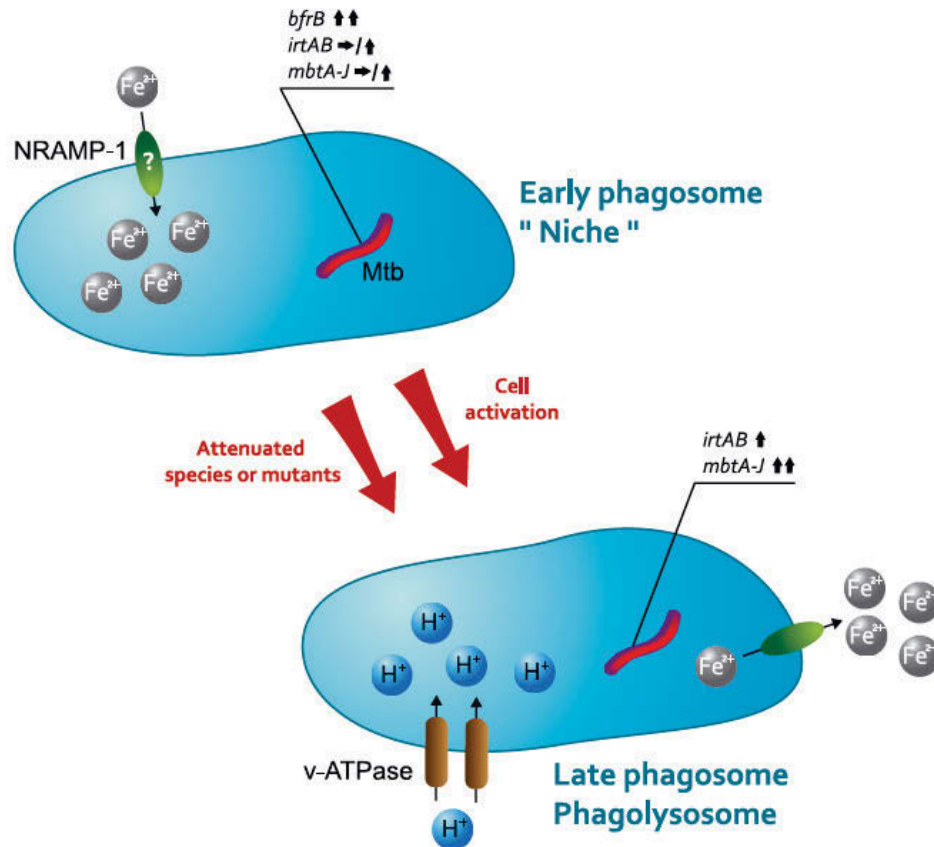


1.6.3 Transporte de Fe^{2+/3+}

Dentro de las células hospederas, las bacterias pueden capturar el Fe^{2+/3+} como ion libre, asociado a proteínas heme o complejo Fe³⁺-sideróforos. Durante la infección, el fagosoma conteniendo *M. tuberculosis* muestra variaciones en la concentración de Fe^{2+/3+}. Inicialmente hay una deficiencia del metal, para lo que *M. tuberculosis* responde aumentando la expresión de los genes *mbtA-J* relacionados con la síntesis de micobactina, un agente quelante de hierro o sideróforo, y el transportador IrtAB, una ATPasa tipo ABC que transporta el complejo Fe-carboximicobactina, que internaliza este complejo dentro de la micobacteria [46]. Después de 24 horas de infección se presenta un aumento en el contenido de Fe^{2+/3+} fagosomal, lo que a su vez induce un aumento en la expresión del gen que codifica BfrB (Bacterioferritina B), una proteína quelante que se encarga del almacenamiento y desintoxicación de Fe²⁺ (Figura 1-5) [8]. Luego de activados los macrófagos, el contenido de Fe^{2+/3+} vuelve a ser limitado, por lo que *M. tuberculosis* expresa los genes *mbtA-J* para regular nuevamente la deficiencia fagosomal del metal [47].

Figura 1-5: Función del Fe²⁺ intrafagosomal y la respuesta de *M. tuberculosis*. En un fagosoma inmaduro o temprano hay un ambiente rico en Fe²⁺, allí el gen relacionado con la desintoxicación *bfrB* es inducido por parte de *M. tuberculosis*. Durante la maduración del fagosoma por activación de macrófagos se hace escaso el hierro, produciendo una inducción de los genes relacionados con la adquisición de Fe mediado por sideróforos

(*irtAB* y *mbtA-J*). En los macrófagos las proteínas NramP-1 son las encargadas del cambio en el contenido de Fe^{2+} dentro del fagosoma. Figura tomada de [8].



Como *M. tuberculosis* expresa un sistema complejo para la adquisición de hierro, que involucra la producción de micobactina (insoluble en agua) y carboximicobactina (soluble en agua), estos sideróforos micobacterianos presentan afinidades altas y pueden capturar el ión del Fe^{3+} libre, transferrina, lactoferrina, lipocalina-2 y ferritina (sideróforo de Fe^{3+} del macrófago) [9, 10]. El proceso de transporte de $\text{Fe}^{2+/3+}$ mediado por sideróforo ha sido asociado con el sistema de secreción (ESX)-3 (complejo de ESAT-6) que se especula transporta los sideróforos libres de metal a través de la membrana plasmática [48]. Una vez fuera de la micobacteria, el sideróforo forma un complejo con Fe^{3+} que luego es transportado por IrtAB, un transportador ABC de alta afinidad por el complejo Fe^{3+} -carboximicobactina [46]. Se ha reportado que la inactivación de alguno de estos transportadores afecta la supervivencia de las micobacterias dentro del macrófago [9]. Hasta el momento el mecanismo que elucida la translocación de estos sideróforos a través de la envoltura celular no se encuentra caracterizado. El sistema de secreción tipo 7

(ESX)-3, perteneciente a la familia MFS (*Major Facilitator Superfamily*, siglas en Ingles) ha sido asociado con el transporte de Fe^{2+/3+} y Zn²⁺ [49]. Por lo tanto, este sistema es necesario para la adaptación del bacilo en el ambiente intracelular.

Finalmente, existen dos ATPasas tipo P_{1B}, CtpD y CtpJ, que se han asociado con el eflujo de Fe²⁺ [25].

1.6.4 Transporte de Co²⁺ y Ni²⁺

Las ATPasas tipo P_{1B}, CtpD y CtpJ también se han asociado con el transporte de Co²⁺ y Ni²⁺ [50]. Otro tipo de transportador CDF/Rv2025c de la familia CDF, cumple la función de expulsar Co²⁺ y Ni²⁺, que responde en condiciones de concentración de Co²⁺ normales y moderadamente altas, mientras que CtpD responde en condiciones extremas ayudando a la desintoxicación de este metal [51].

1.6.5 Transporte de Mn²⁺

MramP captura y transporta Mn²⁺ de forma dependiente de H⁺ en *M. tuberculosis* durante diferentes estadios de la infección [43]. Posiblemente otro transportador tipo ABC también cumpla la función de capturar este metal pesado para dirigirla hacia el interior de la micobacteria [33]. A la ATPasa tipo P_{1B} CtpC se le había asociado inicialmente con la respuesta a altas concentraciones fagosomales de Zn²⁺; sin embargo, hoy se conoce que está relacionada con el eflujo de Mn²⁺, un sustrato preferencial para CtpC. El transporte de Mn²⁺ mediado por CtpC está relacionado con la respuesta al estrés oxidativo, ya que su función es entregar el Mn²⁺ a la superóxido dismutasa periplasmática, SodA [23].

1.7 ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P son enzimas que están distribuidas en todos los organismos. Su nombre deriva del hecho de la formación transitoria de un intermediario fosforilado durante el ciclo catalítico de la enzima [17]. Estas bombas pertenecen a una superfamilia de proteínas presente en las membranas de las células, que se encargan del transporte de cationes metálicos y lípidos en contra del gradiente de concentración usando la energía de hidrólisis del ATP [17]. Estas enzimas se clasifican como hidrolasas de anhídridos ácidos que catalizan el movimiento transmembranal del sustrato y se identifican como EC 3.6.3.

Estructuralmente las ATPasas tipo P se caracterizan por tener entre 8 a 10 segmentos transmembranales (TM) y un núcleo estructural conservado entre arqueas, procariotas 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 ATPasa Tipo P para Na^+ , K^+ , H^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , Cu^+ , Cd^{2+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} , y también para aminofosfolípidos [17, 23, 25, 52]. Todas las ATPasas tipo P contienen cinco dominios funcionales y estructurales distintos (Figura 1-6), de los que tres son citoplasmáticos (A, actuador; N, unión a nucleótido; P, fosforilación) y dos membranales (T, transporte; S, dominio de soporte específico de la clase). En algunos casos se encuentra otro dominio citoplasmático extra que se sitúa en la región N-terminal y/o C-terminal de la enzima, que se conoce como dominio de unión al metal (MBD) y es capaz de unir el catión en la parte citoplasmática de la célula [17]. Cada dominio tiene una función específica durante el ciclo catalítico [17]. El dominio N se encarga de unir el ATP y produce la fosforilación de un residuo de Asp localizado en el dominio P. El dominio A produce la defosforilación de la enzima regresando a su estado inicial [17]. Por lo tanto, se puede considerar que el dominio N actúa como una quinasa, y el dominio A como una fosfatasa que utilizan el mismo sustrato. 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 localizados en la región TM y dependen de la especificidad del catión transportado [17].

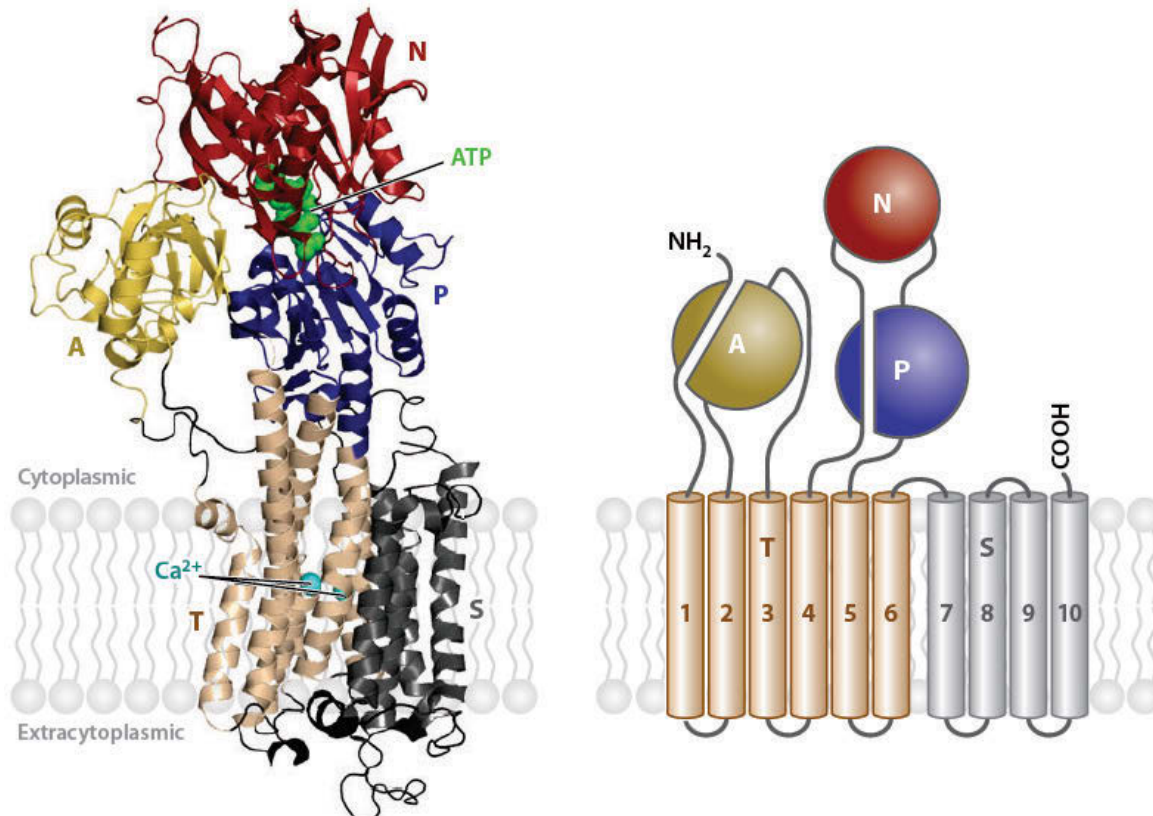
Las características específicas de cada uno de los cinco dominios de las ATPasas son: El dominio A cumple la función de una fosfatasa, y se compone por un módulo globular conectado a los TM. La unión del dominio A con estos segmentos es flexible para facilitar su rotación, y así controlar la disposición espacial del motivo TGE que es necesario para la reacción de defosforilación de la enzima [17, 53-55].

El dominio P aporta el residuo de Asp que es fosforilado y pertenece al motivo conservado DKTGTLT. En este dominio también se encuentra un sitio de unión a Mg^{2+} que facilita el acercamiento del ATP con el sitio de fosforilación [17, 54].

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 [56]. Entre los dominios citoplasmáticos, N es el más variable tanto en tamaño como en

secuencia, puede tener largas inserciones o deleciones, aun así, su núcleo estructural es conservado [17, 53-55, 57].

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 Ca²⁺-ATPasa tipo P SERCA2a (ID PDB 1T5S [58]), 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 [17].



El dominio T es el encargado de unir el ion que va a ser transportado en la enzima. Consta de seis segmentos TM; el sitio de unión a ion es localizado en la parte media de las hélices que atraviesan la membrana. Dependiendo del sustrato se pueden 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 dissociado [17]. Aunque presenta baja identidad de secuencia entre las diferentes ATPasas tipo P, su estructura tridimensional es muy similar entre ellas [17, 53-55]. Todas la ATPasas tipo P tienen un residuo de Pro en medio del TM4 que se encarga de romper la α hélice y acomodar el catión a transportar [17]. Esta Pro hace parte del motivo PEG_L y CPC en los

transportadores de metales alcalinos/alcalinotérreos y metales pesados, respectivamente [18].

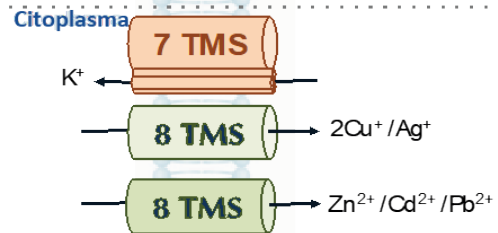
El dominio S es una unidad auxiliar que funciona como soporte estructural para el dominio T. A diferencia del dominio T, este dominio es mucho más rígido sin muchas variaciones conformacionales durante el ciclo catalítico [17]. Se ha encontrado que en las ATPasas tipo P_{1B} este dominio se localiza en la región N-terminal mientras que las tipo P₂-P₃ en el C-terminal.

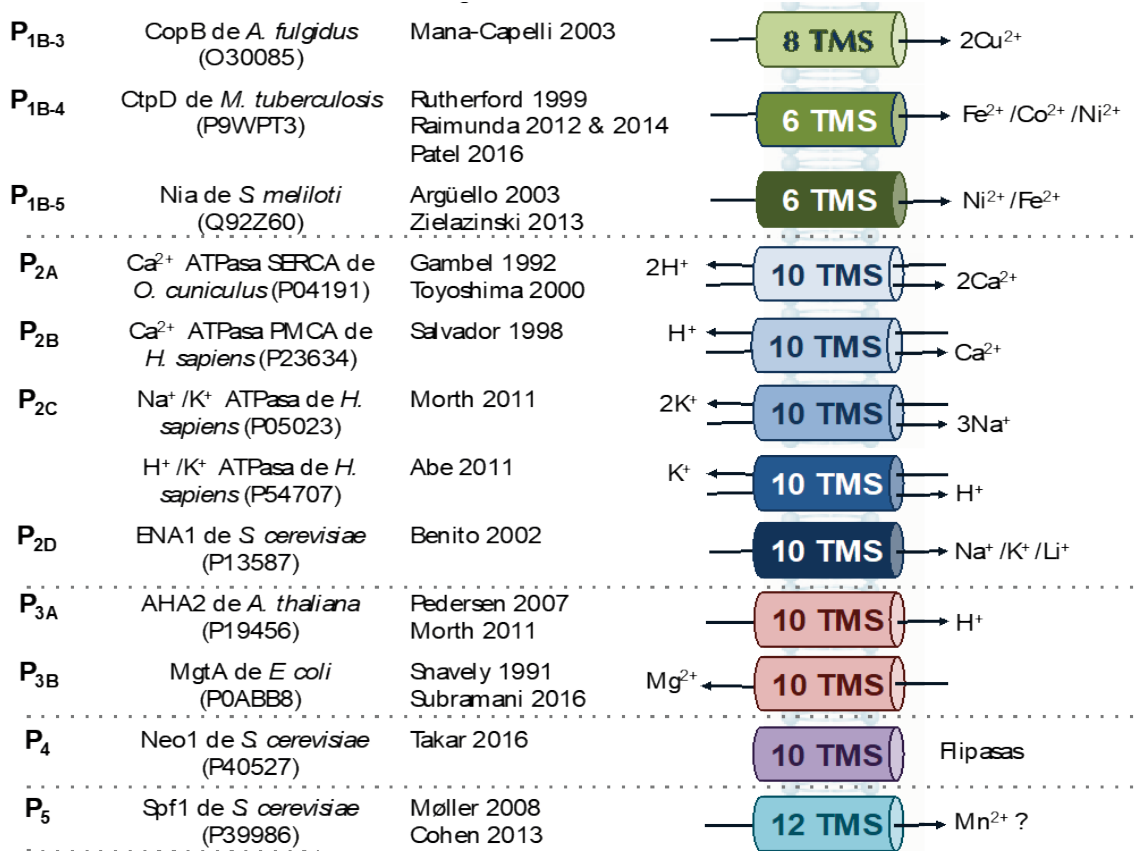
Dependiendo del sustrato que transporten y sus relaciones filogenéticas, las ATPasas tipo P se clasifican en 5 subclases. Las bombas tipo P₁, P₂ y P₃ son encontradas en bacterias y eucariotas, mientras que las tipo P₄ y P₅ solo están presentes en células eucariotas [17, 54]. En la Figura 1-7 se relacionan características y ejemplos de cada subclase.

Las enzimas tipo P₁ se dividen en P_{1A} y P_{1B}, las primeras son un complejo de 4 subunidades (KdpFABC), de las que KdpB es el centro catalítico que exhibe características de ATPasas tipo P. Son exclusivas de bacterias y transportan K⁺ al interior celular cuando hay escasez del mismo [54, 59, 60]. Por su parte, las P_{1B} son bombas presentes en todas las formas de vida, convirtiéndose en las ATPasas tipo P más comunes en bacterias y archeas. las P_{1B} son responsables del eflujo de metales de transición (Cu⁺, Cu²⁺, Ag⁺, Zn²⁺, Cd²⁺, Pb²⁺, Co²⁺, Fe²⁺ y Ni²⁺) [17, 25, 50, 61-67] y han sido clasificadas en 5 subfamilias (Figura 1-7). La especificidad hacia los sustratos es determinada por motivos invariantes presentes en las tres últimas hélices TM [61, 62].

Figura 1-7: Clasificación de las ATPasas tipo P. Las flechas representan la direccionalidad del transporte desde o hacia el interior celular. Cuando se conoce, se indica la estequiometría de transporte y los posibles contraiones, de lo contrario solo se identifica el sustrato principal (catión transportado). Los números dentro de los cilindros indican el número de hélices TM de cada bomba. Figura tomada de [68].

Familia	Ejemplo	Referencias
P _{1A}	KdpB de <i>E. coli</i> (P03960)	Ballal 2007 Greie 2011
P _{1B-1}	CtpA de <i>M. tuberculosis</i> (P9WPU1)	León-Torres 2015 Mandal 2002
P _{1B-2}	ZntA de <i>E. coli</i> (P37617)	Rensing 1998 Sharma 2000 Wang 2014





El subgrupo P₂ se divide en P_{2A}, P_{2B}, P_{2C} y P_{2D}. En la primera se encuentran las bombas Ca²⁺ ATPasa de retículo sarco(endo)plásmico SERCA, que transporta 2 iones en cada ciclo catalítico [69, 70]. Ellas poseen 10 TM y coordinan los cationes mediante hidroxilos de cadena lateral (Thr, Ser), carboxilatos de cadena lateral (Asp, Glu) y de manera menos eficientemente, mediante oxígenos del esqueleto de la proteína [70, 71]. Las bombas P_{2B} son Ca²⁺ ATPasas de membrana plasmática PMCA que a diferencia de las SERCA, transportan solo un ión Ca²⁺ por molécula de ATP hidrolizado y poseen un dominio regulatorio de unión a calmodulina [72]. Por su parte, al grupo P_{2C} pertenecen la Na⁺/K⁺ ATPasa y la H⁺/K⁺ ATPasa, las primeras expulsan 3 iones sodio mientras captan 2 iones potasio por ciclo catalítico, gastando cerca del 30% del ATP celular. En tanto que la H⁺/K⁺ ATPasa es una bomba electroneutra encargada de la acidificación del lumen gástrico, ya que expulsa H⁺ citoplasmáticos y a su vez introduciendo iones K⁺ extra-citoplasmáticos [17, 54, 73, 74]. Finalmente, las bombas tipo P_{2D} son Na⁺ ATPasas de eucariotas (hongos, briofitas y protozoos) conocidas como ENA (*exitus natru*: salida de sodio), participan en la tolerancia a choques osmóticos y pH alcalino [75-77]. Las bombas del grupo P₂ presentan una velocidad de transporte mayor comparada con la de ATPasas tipo P₁, ya que crean y

mantienen el potencial de membrana en las células y permite el transporte secundario de azúcares, aminoácidos y iones. Esto se observa al comparar la velocidad de transporte de las ATPasas de metales alcalinos/alcalinotérreos con las transportadoras de metales pesados, que tienen un valor cercano a 10000 min^{-1} y 200 min^{-1} , respectivamente [24].

Las ATPasas tipo P_{3A} son bombas electrogénicas que transportan H^+ y se encargan de mantener el potencial de membrana en plantas y hongos. Al igual que las bombas tipo P_2 , exhiben 10 hélices M, y poseen además una región C-terminal regulatoria [78, 79]. Por su parte las ATPasas tipo P_{3B} son un pequeño grupo de enzimas distribuidas entre procariontes, involucradas en el transporte de Mg^{2+} al citoplasma bajo condiciones de privación de este catión [80, 81].

Finalmente, las enzimas tipo P_4 y P_5 han sido encontradas en células eucariotas. Las P_4 están involucradas en el transporte de lípidos y el mantenimiento de la asimetría de bicapas lipídicas, por lo que también se les conoce como flipasas, transportando lípidos desde la capa exterior a la cara citosólica de la membrana plasmática [82]. En tanto que las bombas tipo P_5 con 12 segmentos transmembranales y un motivo PPXXP en la hélice TM anterior al dominio P [83], se han relacionado recientemente con la homeóstasis de Mn^{2+} en el retículo endoplásmico [84].

1.7.1 ATPasas tipo P_{1B} encargadas del transportar metales pesados

Se conocen como ATPasas tipo P_{1B} , a la subfamilia de ATPasas encargada de catalizar la translocación de metales pesados como Cu^+ , Cu^{2+} , Ag^+ , Zn^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Co^{2+} , Fe^{2+} y Ni^{2+} [17, 25, 50, 61-63] y han sido clasificadas en 5 subfamilias (Figura 1-7). La especificidad hacia los sustratos es determinada por motivos invariantes presentes en las tres últimas hélices transmembranales (TM), además de los dominios citoplasmáticos de unión al metal con función regulatoria [61, 62]. Entre ellas las ATPasas tipo P_{1B-1} , son bombas encargadas del transporte de Cu^+ ; P_{1B-2} transportan Zn^{2+} , Cd^{2+} y Pb^{2+} ; P_{1B-3} transporta Cu^{2+} , y aunque se parecen al primer grupo, se diferencian en el motivo de la TM 6 [62, 73] y en la región del N-terminal [85]; el grupo P_{1B-4} en el que se encuentran las ATPasas tipo P que transportan Fe^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} [25, 50, 73]; y finalmente en el grupo P_{1B-5} que son las enzimas que transportan Ni^{2+} y Fe^{2+} [63]. La estequiometría de unión al catión puede variar a lo

largo de la subfamilia; por ejemplo, a diferencia de los dos iones Cu⁺ transportados por las ATPasas P_{1B-1}, se ha reportado que la ATPasa P_{1B-2} ZntA de *E. coli* solo posee un sitio transmembranal de unión a Zn²⁺ [86-89].

Estructuralmente las ATPasas tipo P_{1B} poseen ocho segmentos TM [85] y presentan un motivo CPX o XPC (donde X=C, S, o H) en la sexta hélice (TM6), que es esencial para el transporte del catión [90]. Se ha observado que la especificidad al sustrato viene dada por las secuencias conservadas cortas en las hélices TM 6-8. Un ejemplo son las bombas Zn²⁺/Cd²⁺ que presentan el motivo CPX en TM6 el que está precedido por un motivo WIYR/K, mientras que en las bombas Cu⁺/Ag⁺ este último motivo se encuentra ausente [73].

Otra característica de algunas ATPasas tipo P_{1B} es que poseen un sitio extra de unión a metal, conocido como MBD, localizado en los extremos N y/o C-terminal ubicados en el citosol. Estos sitios difieren en longitud y secuencia entre ATPasas. A estos sitios se le han asociado funciones regulatorias y de chaperonas, a su vez de entregar el catión a los sitios de unión a metal ubicados en las TM [91]; sin embargo, los MBD no son esenciales para el transporte del ion [85]. Los MBD son formados principalmente por extensiones terminales ricas en C y a veces en residuos de H, y coordinan 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 [17]. Un ejemplo de estos dominios es el encontrado en la ATPasa tipo P transportadora de Cd²⁺ en levaduras (Pca1p), que aumenta su tiempo de vida media cuando está presente el ion metálico [92]. Otro ejemplo es la Cu⁺ ATPasa de *E. coli* que tiene dos MBD; uno de ellos tiene una función reguladora al inhibir la actividad enzimática cuando el metal se encuentra ausente y el otro se ha reportado que tiene una función análoga a las metalochaperonas, transfiriendo el catión a las regiones de unión de metal encontradas en las hélices TM [91].

Actualmente, las ATPasas tipo P_{1B} que han sido bien caracterizadas son: CadA, ZntA y CopA de bacterias y transportan Cd²⁺, Zn²⁺ y Cu⁺ respectivamente; en plantas HMA4 es una transportadora de Zn²⁺; y en humanos ATP7A y ATP7B que son transportadoras de Cu⁺²⁺. En la naturaleza la ATPasa tipo P_{1B} más común es la encargada de transporte del ion Cu⁺ [17].

1.8 Rol de las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* en el transporte de metales pesados

De las 11 ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*, conocidas como CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI, CtpJ y CtpV, siete han sido identificadas como posibles transportadores de cationes de metales pesados [18]. Como se ilustró anteriormente, las ATPasas tipo P están involucradas en el transporte de iones metálicos como Cu^+ , Zn^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , favoreciendo los procesos de desintoxicación bacteriana. La mayoría de las ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ del bacilo tuberculoso se sobreexpresan en procesos infecciosos; entre ellas, las más activas durante la infección de macrófagos humanos son: CtpG, CtpV, CtpC, y CtpA [19]. Particularmente, *ctpA* hace parte del grupo de genes de *M. tuberculosis* que se sobreexpresa *in vivo* durante el proceso de infección de células humanas [22].

Como la mayoría de las infecciones con *M. tuberculosis* progresan a una TB latente [26]; se ha encontrado en modelos *in vitro* que simulan este estado dormante de la micobacteria, que algunas ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ se activan bajo estas condiciones [19]. Específicamente, cuando la micobacteria es sometida a inanición, CtpC y CtpG se sobreexpresan [93, 94]. A su vez, cuando se trabaja en un ambiente de baja tensión de oxígeno (Hipoxia) se observa un aumento significativo en la expresión de CtpA, CtpB, CtpC y CtpV [95-97]. Sin embargo, al evaluar la adaptación de la micobacteria a la microaerofilia y anaerobiosis hay una sobreexpresión marcada de CtpB [95]. Esto demuestra la importancia del transporte de Cu^+ mediado por estas bombas tanto en la infección activa de la TB como en la latente.

La ATPasa tipo $\text{P}_{1\text{B}}$, CtpV, encargada del transporte de Cu^+ se ha relacionado con la virulencia de *M. tuberculosis* [11]. Otra ATPasa tipo P, CtpC, se conoce que protege al bacilo tuberculoso del exceso de Zn^{2+} [44] y también transporta Mn^{2+} [23]. En el caso de CtpJ y CtpD se asocian con el transporte de Fe^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , siendo la primera la encargada de la desintoxicación del metal en la célula y la segunda a la respuesta al estrés oxidativo [25, 50].

Estudios de infección en modelos animales utilizando mutantes de algunas de estas ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$ de *M. tuberculosis* han mostrado que su delección produce fenotipos atenuados; como es el caso de las mutaciones individuales en *ctpC*, *ctpD* y *ctpV* [20]. Particularmente, CtpC y CtpV se han catalogado como factores de virulencia [21], debido

a que responden al aumento de la concentración intrafagosomal de Cu⁺ y Zn²⁺ durante el proceso infectivo. La obtención de mutantes atenuados sugiere la existencia de un mecanismo compensatorio mediado por las otras ATPasas tipo P_{1B} del bacilo tuberculoso, de lo contrario se evidenciaría una pérdida total en la virulencia de *M. tuberculosis*.

Todo lo anterior sugiere que estos sistemas de transporte de metales pesados son esenciales para la micobacteria, y a su vez también sugiere que estos transportadores pudiesen considerarse como buenas dianas terapéuticas. Además de ser proteínas de membrana, su rol como transportadores y mediadores de la interacción de las micobacterias con el ambiente que los rodea sería una ventaja para el desarrollo de fármacos, ya que dianas ubicadas en la membrana plasmática evitarían los problemas relacionados con su permeabilidad [26]. Teniendo en cuenta que la delección de estas bombas conlleva a una pérdida parcial de la virulencia, también se podría explorar la utilidad de estos transportadores en el diseño de nuevas vacunas antituberculosas.

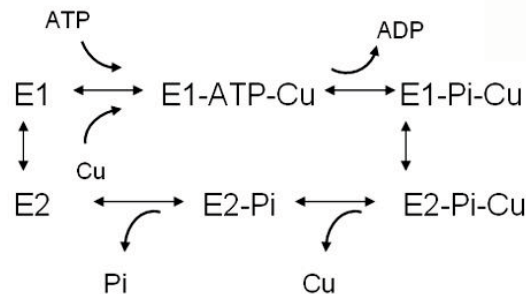
El grupo de investigación “Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias” de la Universidad Nacional de Colombia, se ha dedicado los últimos años a estudiar la afinidad iónica de las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*, y su potencial como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados con potencial vacunal. Inicialmente un análisis bioinformático permitió determinar el posible sustrato que puede ser transportado por estas enzimas [18]. Por otra parte, un metaanálisis de resultados hechos por otros autores nos permitió evidenciar la importancia de estos transportadores en diferentes procesos que se asocian con la viabilidad e infección de bacilo tuberculoso [19]. Todo esto nos motivó a desarrollar estudios funcionales, con el ánimo de encontrar evidencias del transporte de metales pesados mediado por las ATPasas tipo P_{1B} en *M. tuberculosis*, como lo hemos hecho para CtpA y CtpG. Específicamente encontramos que CtpA se encarga de mediar el transporte de iones Cu⁺ [98]. A partir de estos ensayos surgió la necesidad de conocer el efecto de la delección de estos genes e indagar en los procesos que pueden estar involucrados para la célula, pero haciendo una ampliación de esta aproximación a las 7 ATPasas tipo P_{1B} y enfatizando en el efecto de los tres transportadores de Cu⁺.

1.8.1 Mecanismo catalítico

Las enzimas ATPasas tipo P_{1B} siguen el ciclo catalítico propuesto por Post-Alberts con algunas diferencias específicamente en la naturaleza química y disponibilidad biológica de sus sustratos [62]. A diferencia de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} , algunos los metales pesados no se encuentran de forma libre en las células, por lo que las ATPasas tipo P lo recibirían de proteínas chaperonas que lo mantienen coordinado hasta que lo entregan en el sitio de coordinación de la ATPasa [99].

La Figura 1-8 muestra el mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P siguiendo el modelo propuesto por Post-Albers [17]. En donde la enzima asume dos estados conformacionales principales, E1 y E2, con diferentes afinidades por los sustratos. 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 Cu^+ [100], luego, el metal se une junto con el ATP a LA para poder producir la fosforilación de la enzima [73] (formación del intermediario E1P-Cu) permitiendo la oclusión transitoria del Cu^+ dentro de la región transmembranal. El transporte del metal es realizado siguiendo la apertura del TM-MBS al compartimiento extracelular (vesicular/luminal) [100] produciendo un cambio conformacional de la enzima para generar el intermediario E2P el que presenta una menor afinidad por el Cu^+ [73], generando así la disociación de Cu^+ acompañada de la defosforilación por el ataque nucleofílico de una molécula de agua. La enzima vuelve a su estado E1 [73], quedando lista para un nuevo ciclo catalítico.

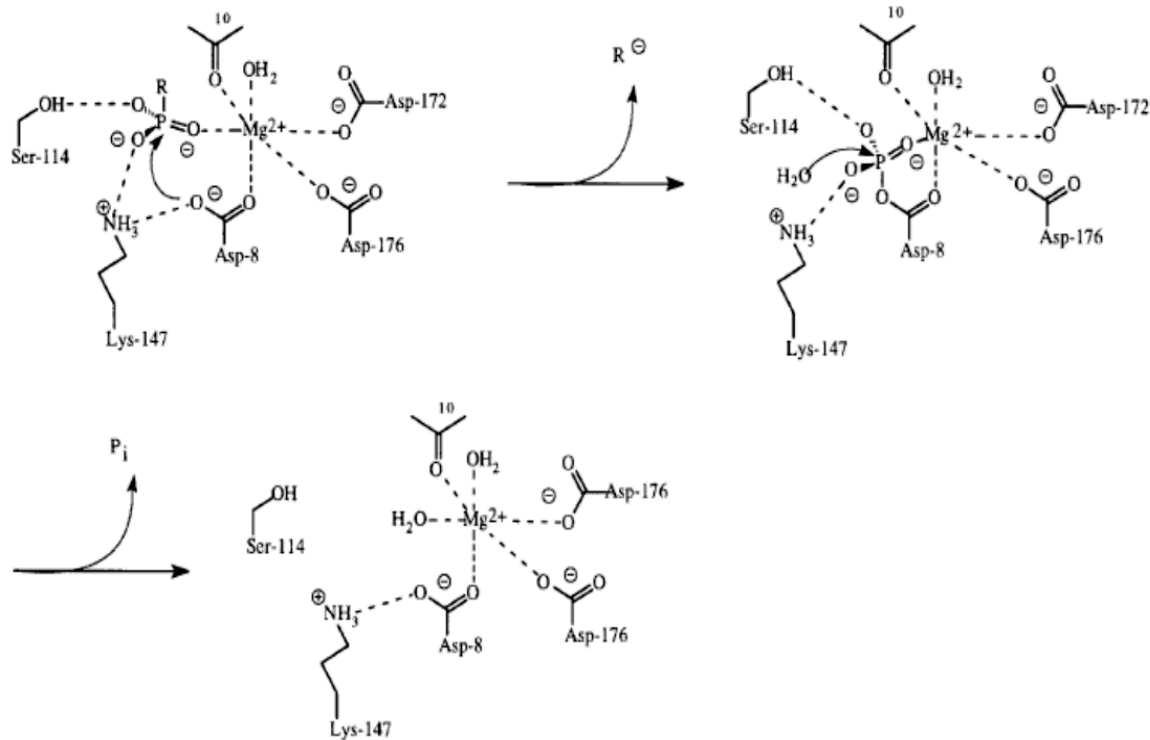
Figura 1-8: Modelo del mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P propuesto por Post-Albers. Figura tomada de [73]



La unión del catión con la ATPasa induce rearrreglos en la hélice de la enzima que son capaces de modificar el dominio P, permitiendo el acercamiento del ion Mg^{2+} al residuo

Asp y evita repulsiones electrostáticas con el γ -fosfato del ATP, y así para facilitar su fosforilación (Figura 1-9) [17].

Figura 1-9: Mecanismo del proceso de fosforilación y defosforilación de las ATPasas tipo P. (R=ADP). Figura tomada de [101].

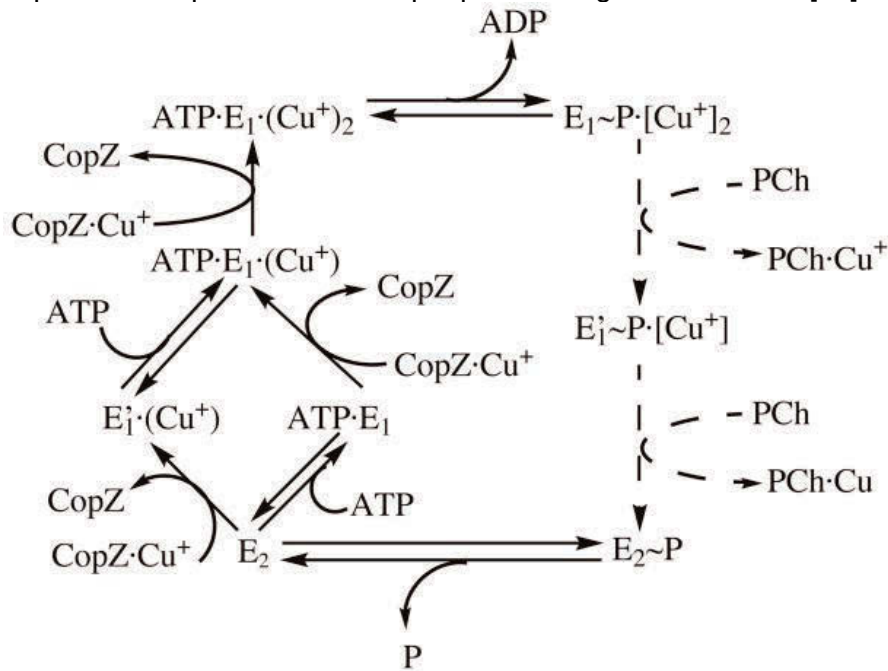


Los cambios conformacionales de la enzima entre los estados de transición E1P-Cu y E2P-Cu se asocian con el paso limitante de la reacción enzimática [17, 73]. Cuando el ion es transportado hacia la parte externa de la membrana, la bomba es defosforilada por el dominio A, como consecuencia de la coordinación de una molécula de agua con el residuo de glutamato del motivo TGE y el residuo fosforilado de Asp permitiendo el ataque nucleofílico para romper el enlace fosfato [17, 101]. 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 [73].

El mecanismo catalítico anterior se ajusta a todas las ATPasas tipo P, pero en el caso específico de las transportadoras de Cu⁺ se ha encontrado que el mecanismo tiene variaciones. En particular, en las bombas que son capaces de transportar dos iones durante cada ciclo catalítico (Figura 1-10), la unión de cada ion se hace en dos pasos separados [62]. En este caso los iones no se encuentran libres cuando se unen a TM-MBS

[33], ellos se encuentran acomplejados por proteínas chaperonas que se encargan de transferir el Cu^+ a la bomba para transportarlo y adicionalmente chaperonas extracelulares reciben el catión transportado [102].

Figura 1-10: Ciclo catalítico de las 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 Cu^+ en el periplasma. El 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 (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) [103]. Nótese que la transferencia del 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 Cu^+ del periplasma. Figura tomada de [62].



1.9 Regulación Transcripcional

Al tener que sobrevivir a diferentes hábitats durante su ciclo de vida, algunas bacterias están sujetas a cambios en condiciones ambientales como deprivación de nutrientes, calor, frío, radiación UV, estrés oxidativo, desecación, estrés ácido, estrés nitrosativo, exposición a metales pesados, estrés osmótico y otros. Con el fin de sobrevivir ellas deben responder adaptando su fisiología a través de cambios drásticos en la expresión de genes. Los

cambios en la expresión génica constituyen el componente principal que las bacterias usan en respuesta al estrés y cambios ambientales, e involucran diferentes mecanismos en los que participan elementos trans durante la transcripción como: factores sigma de la ARN polimerasa (alternativos), reguladores transcripcionales, sistemas de regulación de dos componentes, ARN pequeños no codificantes. Muchos elementos regulatorios son conservados en las diferentes bacterias; sin embargo existen elementos de regulación génica adicionales en bacterias que habitan ambientes específicos, especialmente en bacterias patogénicas que colonizan a hospederos con respuesta inmune [104]. Una aproximación para la búsqueda de estrategias para el tratamiento de estos patógenos es elucidar ciertos aspectos de estos sistemas de regulación.

Los reguladores transcripcionales son proteínas que controlan la expresión de genes al unirse al ADN en regiones promotoras, y de esta forma regulan la transcripción de genes. Existen dos tipos de regulación transcripcional, positiva o negativa. En el caso de una regulación positiva, una proteína activadora o activador promueve la expresión de genes cuando se une al ADN. Por el contrario, una regulación negativa existe cuando una proteína represora o represor previene la transcripción de genes al unirse en la región promotora [105]. La estructura de los reguladores transcripcionales cambia de forma en respuesta a una señal, como pueden ser moléculas pequeñas o iones, y solo una de sus conformaciones es capaz de unirse al ADN [105].

1.9.1 Regulación mediada por proteínas metaloreguladoras

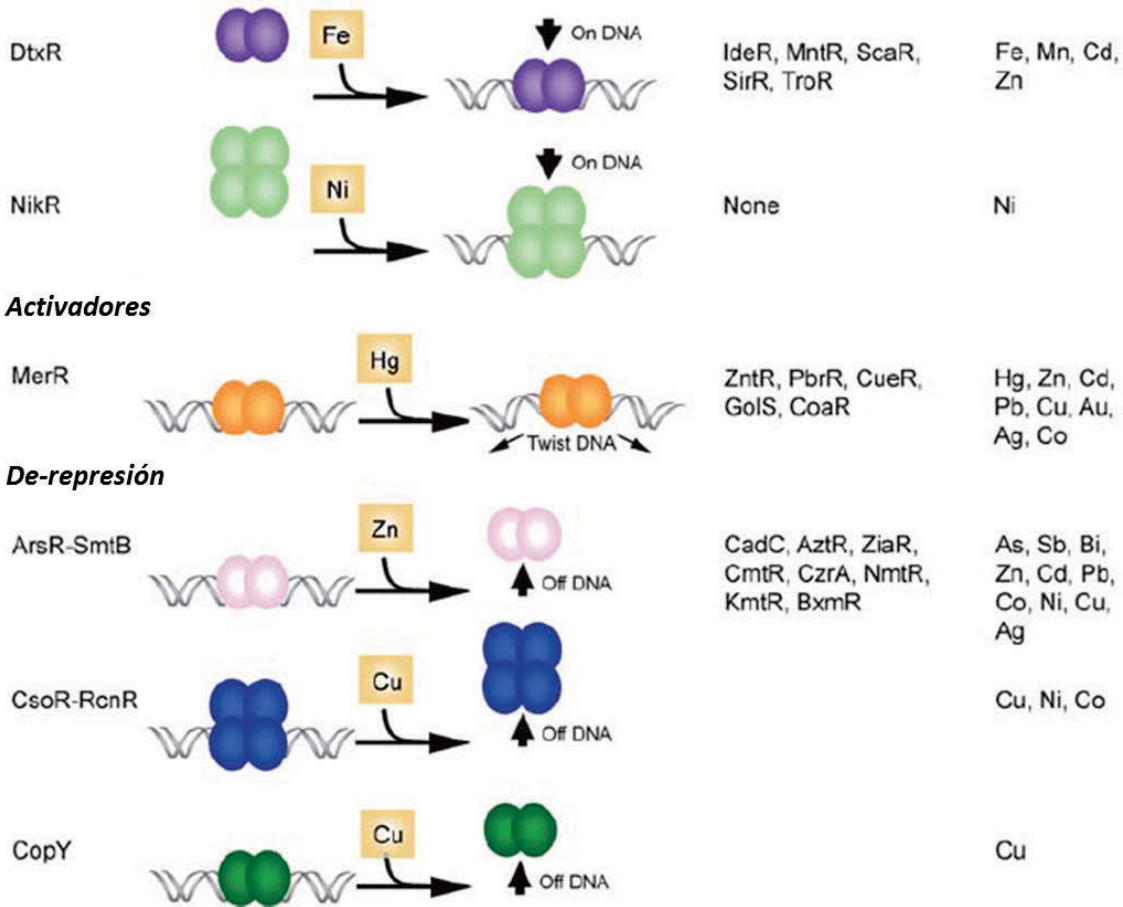
Las proteínas reguladoras que unen iones de metales pesados se conocen como proteínas metaloreguladoras. Estas proteínas citosólicas tienen como función ejercer un control a nivel transcripcional de genes relacionados con la homeostasis iónica, para así poder restaurar los niveles alterados de la concentración de iones de metales pesados. Actualmente se conocen 7 familias de reguladores transcripcionales asociados a proteínas metaloreguladoras, que han sido caracterizados funcional y estructuralmente. De acuerdo a su función estos reguladores se pueden dividir en dos grupos: aquellos que controlan la expresión de genes asociados con el eflujo y/o almacenamiento del ion, y aquellos que controlan la expresión de genes requeridos para la captura del ion [33].

En general, los mecanismos de regulación mediada por las proteínas metaloreguladoras se comportan de dos formas diferentes: 1) al controlar genes de captura de metales pesados, donde el regulador unido al ion metálico funciona como represor o regulador negativo del gen, y 2) en el control de genes que codifican transportadores relacionados con el eflujo de metales pesados, aquí el regulador funciona como represor si en su estructura se encuentra libre de unión con el ion metálico. Sin embargo, puede que estas proteínas metaloreguladoras funcionen como activadores o reguladores positivos, favoreciendo la exposición del promotor para que la ARN polimerasa se una fácilmente y se inicie la transcripción [33].

La Figura 1-11 muestra las siete familias de proteínas metaloreguladoras que han sido identificadas en bacterias, entre ellas se encuentra: ArsR/SmtB, MerR, CsoR/RcnR, CopY, DtxR, Fur y NikR [106]. Dentro de estas familias se pueden encontrar proteínas que regulan la expresión de un gen en respuesta a diferentes metales. En todas las proteínas metaloreguladoras, la correcta unión del metal efector es requerida para que cause un cambio alostérico capaz de alterar la expresión génica. Las familias Fur, DtxR y NikR son proteínas que actúan como co-represores que se unen al ADN luego de la unión al metal. Las familias de proteínas ArsR/SmtB, CsoR/RcnR y CopY actúan como de-represores, donde la unión con metal desensambla el complejo represor-ADN e interrumpiendo la represión génica. Finalmente, la familia de proteínas MerR se une a los promotores de los genes en presencia o ausencia del catión efector, cuando el regulador es capaz de unirse al ADN facilita la iniciación de la transcripción, porque el regulador favorece el desplegamiento de ADN [106].

Figura 1-11: Familias de proteínas metaloreguladoras. La figura muestra las 7 familias de las proteínas metaloreguladoras y las clasifica en reguladores negativos, positivos y activadores. Se muestra el modo de acción, principales representantes de cada familia, y los metales que unen para sensar la transcripción de genes que están regulando. Figura adaptada de la referencia [106].

Familia	Modo de Acción	Representantes	Metales Sensados
<i>Co-represión</i>			
Fur		Zur, Mur, Nur	Fe, Zn, Mn, Ni



Algunas proteínas metalreguladoras actúan sobre un único gen diana, mientras que otras funcionan como reguladores globales que alteran la expresión de múltiples genes. Por tanto algunos reguladores controlan la expresión de proteínas relacionadas con la homeostasis del metal, resistencia a estrés oxidativo, adaptación a ambientes ácidos, síntesis de toxinas, respiración y biogénesis de ribosomas [106].

A continuación, se describirá cada una de estas familias de proteínas metalreguladoras que son encontradas en *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis codifica diez proteínas de la familia de reguladores ArsR/SmtB, que en su mayoría no han sido caracterizadas funcionalmente. Esta familia se caracteriza por sensor una amplia variedad de iones de metales esenciales como Cu⁺, Zn²⁺ y Ni²⁺, y tóxicos como As³⁺, Cd²⁺ y Pb²⁺. Los reguladores estudiados actualmente en *M. tuberculosis* son: CmtR (*Cadmium M. tuberculosis Regulator*, siglas en inglés) sensor de Cd²⁺ y Pb²⁺; KmtR sensor

de Ni²⁺ y Co²⁺; y NmtR (*Nickel M. tuberculosis regulator*, siglas en inglés) sensor de Ni²⁺ y Co²⁺[51].

El regulador de Ni²⁺ NmtR de *M. tuberculosis*, detecta aumentos en la concentración de Ni²⁺ y Co²⁺ favoreciendo la unión del represor (NmtR) con uno de los metales para su inactivación, lo que resulta en la transcripción del operón. Se ha reportado que NmtR puede unir Zn²⁺ con alta afinidad, pero esto no ocurre *in vivo* [34]. La unión del ion correcto permite el cambio conformacional de estos reguladores transcripcionales, cambiando su afinidad de unión con el ADN. En este caso la proteína NmtR es capaz de discriminar entre los iones por su afinidad, pero más que ello la geometría del complejo metal ligando (entre el catión y los residuos de aminoácidos de la proteína) es quien genera una restricción; es decir, esta selección de iones está dada por la primera y segunda esfera de coordinación [33]. El represor NmtR controla la expresión de la ATPasa tipo P, CtpJ, encargada del transporte de Co²⁺/Ni²⁺ y se asocia con la desintoxicación de Co²⁺ [50, 51].

KmtR es otro represor transcripcional de *M. tuberculosis* sensible a Co²⁺ y Ni²⁺, que regula un transportador de eflujo de metales tipo CDF H⁺ antiporte. Se ha encontrado que la afinidad por Co²⁺ y Ni²⁺ es mayor en el regulador KmtR comparado con NmtR, por lo que en medio de cultivo completo se expresa constitutivamente el transportador tipo CDF [51] y en un aumento en el contenido de estos iones se expresa la ATPasa tipo P, CtpJ.

La familia CsoR/RcnR, ha sido caracterizada estructuralmente, encontrando que CsoR (*Copper Sensitive Operon Repressor*, siglas en Inglés) de *M. tuberculosis* es regulado por Cu⁺. Este operón que es inducido por Cu⁺ se conoce como *cso* (*copper sensitive operon*, siglas en Inglés) [107]. En ausencia de Cu⁺, CsoR permanece unido a la región promotora de los genes, inhibiendo su transcripción; con el aumento en la concentración de Cu⁺, este ion se une a CsoR desestabilizando su complejo con el ADN permitiendo la transcripción de los genes del operón *cso*, que incluye el propio represor y la ATPasa tipo P, CtpV (Figura 1) [11]. Como hasta el momento no se han descrito chaperonas que transporten Cu⁺ en *M. tuberculosis*, se propone que estas podrían ser innecesarias para llevar el ion a CsoR, y que por el contrario, CsoR podría tomar el ion mediante su alta afinidad por Cu⁺ [42].

Por otro lado, se ha reportado un regulón del regulador RicR que también es inducido por Cu⁺ intracelular. RicR de *M. tuberculosis* es un represor homólogo a CsoR, el que regula

los genes *lpqS* (lipoproteína putativa), *mmcO* (multicobre oxidasa micobacteriana), *rv2963* (posible permeasa), *mymT*, *socAB* (pequeño marco abierto de lectura inducido por Cu A y B), y *ricR* (proteína metaloreguladora dependiente de Cu⁺). Dentro de los genes regulados, los únicos productos génicos que se conocen al momento son MmcO, MymT y RicR. Se conoce que MmcO puede oxidar Fe²⁺ a Fe³⁺, sin embargo este puede también oxidar Cu⁺ a Cu²⁺ [37]. Las dos proteínas metaloreguladoras dependientes de Cu⁺ mostradas anteriormente, CsoR y RicR, actúan en dos regiones diferentes del genoma regulando diferentes genes, razón por la que existe compensación si hubiese disfunción en alguna de estas regiones (Figura 1-3) [37].

FurA (Regulador de captación férrica) es un regulador involucrado en la regulación de Fe²⁺ en *M. tuberculosis* mediada por proteínas metaloreguladoras. Se conoce que FurA es el mayor represor de la catalasa-peroxidasa KatG, además de regular la respuesta al estrés oxidativo. Otro regulador dependiente de hierro es IdeR (*Iron-dependent transcriptional repressor*, siglas en inglés) que pertenece a la familia DtxR encargadas de sensor Fe²⁺ y Mn²⁺. Estudios *in vitro* han demostrado que IdeR puede unir también Ni²⁺ o Co²⁺ pero no Mn²⁺, diferente de lo observado *in vivo* donde solo puede unir Fe²⁺ [33]. IdeR es un regulador negativo usado en respuesta a niveles bajos de Fe²⁺, que induce la expresión de los genes del operón *mbt*, involucrados en la biosíntesis de sideróforos [108]. La expresión de estos genes *mbt* se da cuando el macrófago se encuentra activado [109]. Cuando IdeR se expresa constitutivamente, se observa una atenuación de la virulencia [110]. Se conoce que los reguladores transcripcionales Zur (*Zinc uptake repressor*, siglas en inglés) e IdeR controlan la expresión del sistema de secreción ESX-3 en *M. tuberculosis* sugiriendo un papel en la homeostasis de Zn²⁺ y Fe³⁺ [49]. Se desconoce cómo puede estar involucrado este sistema con la captura de Zn²⁺, pero en el caso de Fe³⁺ se asocia con los dos sideróforos micobacterianos: micobactina y carboximicobactina. Por otra parte, Zur (Formalmente anotado como FurB) sensor de Zn²⁺, es un regulador que pertenece a la familia Fur (*Fe-regulated uptake repressor*), y se ha encontrado que es capaz de regular diferentes operones [111].

Finalmente, SirR es un regulador dependiente de Fe²⁺, del que se desconoce su función en el bacilo [16].

2. Justificación

La incidencia de la tuberculosis (TB) a nivel mundial es alarmante; se estima que aproximadamente cada 25 segundos muere una persona por TB [112]. Esto demuestra que no se cuenta con un control apropiado y que las herramientas utilizadas en la actualidad no son totalmente efectivas para erradicar esta enfermedad. El control de la TB se ha dificultado por la co-infección con el VIH, al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los fármacos actualmente usados [1], y que cerca de 1/3 de la población mundial se encuentra infectada de TB en forma latente asintomática, conformando un reservorio permanente de la infección [31, 113].

Si bien, se cuenta con estrategias anti-TB como la quimioterapia y la vacuna BCG, éstas están lejos de erradicar la enfermedad, ya que los fármacos usados en la quimioterapia generan una serie de inconvenientes relacionados con la larga duración del tratamiento, alto costo y efectos secundarios considerables, que causan el abandono temprano del tratamiento y favoreciendo la aparición de cepas resistentes [1]. Por otra parte, la vacuna BCG tiene una eficacia variable contra la TB pulmonar, entre un 0 a 80 % [114] y únicamente resulta ser efectiva contra la meningitis tuberculosa infantil [4]. Esto obliga a buscar nuevas alternativas para un control más efectivo de la infección tuberculosa, lo que requiere de un conocimiento detallado de los mecanismos de interacción hospedero-patógeno. Nosotros en particular, hemos centrado nuestra atención en las ATPasas tipo P_{1B}, por su capacidad de desintoxicar al patógeno de metales pesados, y por ser indispensables para la correcta metalación de enzimas de defensa al estrés oxidativo. Se pretende que las ATPasas tipo P_{1B} pudiesen ser explotadas como dianas de viabilidad y/o atenuación del bacilo tuberculoso.

3. Hipótesis Experimental

Conocer los mecanismos que le permiten a *M. tuberculosis* adaptarse y tener éxito durante el proceso de infección es esencial en el establecimiento de nuevas estrategias para el control de la TB. En ese sentido, transportadores de cationes metálicos como las ATPasas tipo P podrían jugar un papel relevante en la sobrevivencia de las micobacterias bajo condiciones de estrés, ya que la delección de algunos de ellos conlleva a una atenuación de *M. tuberculosis* (*ctpC*, *ctpD* y *ctpV*). Nuestra hipótesis central es que al inhibir ATPasas tipo P_{1B-1}, como CtpA y CtpB, se podría inducir un desbalance en el transporte de solutos a través de la membrana plasmática micobacteriana, pudiendo afectar procesos vitales para la supervivencia del bacilo tuberculoso.

El estudio del comportamiento de las ATPasas tipo P_{1B} y sus probables reguladores en respuesta a las condiciones de estrés encontradas en los fagosomas, permite indagar el modo en que estas proteínas intervienen en la adaptación a ambientes adversos propios del proceso de infección de *M. tuberculosis*. Adicionalmente, el transporte iónico mediado por las tres Cu⁺ ATPasas podría funcionar como sistemas compensatorios o responden a diferentes condiciones de estrés, teniendo papeles esenciales en el éxito de la infección, como es el caso de CtpV. Los resultados obtenidos podrían ser de gran utilidad para determinar el potencial de estas ATPasas en los procesos de adaptación del bacilo tuberculoso a ambientes adversos propios del proceso de infección, para así ser propuestas como dianas terapéuticas para el diseño racional de nuevos compuestos antituberculosos.

4. Objetivos

4.1 Objetivo general

Establecer la relación entre la actividad de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* y condiciones de estrés similares a las soportadas en los macrófagos, encaminado a evaluar el potencial de estos transportadores de membrana como posibles dianas terapéuticas.

4.2 Objetivos específicos

- I. Evaluar la respuesta transcripcional de los genes de ATPasas tipo P_{1B} y sus probables reguladores bajo las condiciones que simulan el fagosoma en el que reside *M. tuberculosis*.
- II. Determinar el efecto del transporte iónico mediado por las ATPasas tipo P_{1B-1}, CtpA y CtpB, en la viabilidad bacteriana y acumulación intracelular de metales pesados.
- III. Establecer la afinidad iónica de los transportadores CtpA y CtpB de *M. tuberculosis*.
- IV. Conocer la cinética enzimática de las ATPasas tipo P_{1B-1} CtpA, CtpB y CtpV de *M. tuberculosis*.

5. Materiales y Métodos

El presente trabajo tiene tres enfoques de estudio que buscan generar conocimiento sobre el papel de las ATPasas tipo P_{1B} en respuesta a algunas condiciones de estrés, similares a las soportadas por *M. tuberculosis* en el fagosoma. El primero es un análisis del comportamiento transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* bajo diferentes condiciones de estrés. El segundo es una búsqueda de los posibles reguladores transcripcionales de estas ATPasas tipo P_{1B}, con el objetivo de analizar su transcripción bajo las mismas condiciones de estrés. Finalmente, con el fin de indagar la posible función de las tres Cu⁺ ATPasas y su papel en la respuesta a las condiciones de estrés que la micobacteria se enfrenta durante la infección, se hizo un estudio funcional de las tres enzimas para evaluar el comportamiento de su actividad enzimática. Por lo tanto, el desarrollo metodológico de la presente investigación tuvo un componente de análisis bioinformático, manipulaciones genéticas y biología molecular, y un componente bioquímico que responden a los objetivos propuestos.

Los materiales y métodos del presente trabajo se muestran en el orden secuencial para los tres enfoques de estudio. Empezando por el análisis transcripcional bajo condiciones de estrés de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, seguido del análisis transcripcional de los posibles reguladores de las ATPasas tipo P_{1B}, y finalmente la caracterización funcional de las Cu⁺ ATPasas, CtpA, CtpB y CtpV.

5.1 Análisis transcripcional bajo condiciones de estrés de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*

Para conocer como las ATPasas tipo P_{1B} que podrían estar involucradas en la respuesta al estrés que las micobacterias deben enfrentar en el fagosoma, se evaluó la respuesta transcripcional bajo condiciones que simulan el estrés durante el proceso infeccioso.

Específicamente se evaluó la respuesta transcripcional de algunas ATPasas tipo P_{1B} frente a la presencia de metales pesados, ROS, RNS e hipoxia.

La metodología empleada para este análisis transcripcional implicó un ensayo de crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra en concentraciones variables de metales pesados, esto con el fin de conocer y definir las condiciones de cultivo para estudiar el estrés generado por estos metales. Luego las bacterias se intoxicaron con los agentes de estrés (metales pesados y agentes de estrés redox), también se cultivó *M. tuberculosis* H37Ra en condiciones de hipoxia. Una vez cultivadas las bacterias bajo estas condiciones, se hizo la extracción de ARN y síntesis de cADN, para el análisis transcripcional por qPCR de los genes de las ATPasas tipo P_{1B} en estudio. Todos estos procedimientos se describen a continuación y en el orden descrito anteriormente.

5.1.1 CMI frente a metales pesados de *M. tuberculosis*

Para el análisis transcripcional en presencia de cationes de metales pesados, primero es necesario conocer concentraciones sub-letales de los metales que permiten ver una respuesta de la micobacteria a la presencia del metal sin afectar su viabilidad. Para determinar este valor de concentración se hizo un ensayo preliminar de CMI de Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺; sobre células de *M. tuberculosis* H37Ra. Como criterio para la selección de la concentración sub-letal fue la que permitió un crecimiento bacteriano mayor al 50%.

El ensayo se hizo en placas de 96 pozos en un volumen final de 200 µL. Se partió de un cultivo en fase exponencial, el que se diluyó en medio Sauton modificado (MgSO₄ 0,05%, KH₂PO₄ 0,05%, ácido cítrico 0,2%, glicerol 6%, L-asparagina 0,4%, citrato férrico amónico 0,005%, Tween 80 0,05% y ZnSO₄ 6,2 µM con glucosa 0,2%, Fe₂(SO₄)₃ 30 µM y Tween-80 0,05 %) hasta obtener una OD_{595nm} de 0,05 en cada pozo. A continuación se realizaron diluciones seriadas de los cationes representados en las siguientes sales: CdCl₂ (0,008 a 4 mM), CoCl₂ (0,02 a 8 mM), CuSO₄ (0,002 a 1 mM), Fe₂(SO₄)₃ (0,02 a 8 mM), MnSO₄ (0,008 a 4 mM), NiSO₄ (0,02 a 8 mM), Pb(NO₃)₂ (0,001 a 0,5 mM) y ZnSO₄ (0,008 a 4 mM). Como control positivo, se utilizó un cultivo en ausencia de catión, y como control negativo de crecimiento, se utilizó un cultivo suplementado con isoniazida (INH) 1 µg/mL. Las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C por 3 semanas, posteriormente el crecimiento

bacteriano se estimó midiendo la OD_{595nm} usando un lector de placas iMark™ *Microplate Absorbance Reader* de Bio-Rad. Los valores de absorbancia se corrigieron restando la absorbancia del control negativo de crecimiento. El 50 % de crecimiento bacteriano fue calculado utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h Windows, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com, usando modelos de cálculo IC₅₀. El ensayo se hizo por triplicado biológico de cada concentración de catión.

5.1.2 Intoxicación de *M. tuberculosis* en presencia de metales pesados y agentes de estrés oxidativo/nitrosativo

Teniendo en cuenta las concentraciones sub-letales de metales pesados determinadas en el experimento anterior, se seleccionaron las concentraciones a usar para la intoxicación de *M. tuberculosis* H37Ra con estos metales y agentes de estrés oxidativo/nitrosativo, con el fin de una posterior extracción de ARN bajo estas condiciones, a ser utilizado en los experimentos de qPCR. Adicional a las concentraciones subletales de metales pesados encontradas en los experimentos de CMI, también se consideraron los valores de concentración reportados para el interior de fagosomas de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* [10]. Las sustancias probadas para generar estrés oxidativo fueron H₂O₂, tert-butil-hidroperóxido (tBuOOH) y KCN, siendo el primero un peróxido, el segundo un peróxido orgánico y el tercero el ion CN⁻ que interfiere en la cadena de transporte de electrones en la respiración aerobia. La sustancia utilizada para generar estrés nitrosativo fue el nitroprusiato de sodio (Na₂[Fe(CN)₅NO]), que funciona como donador de óxido nítrico.

A partir de 300 mL de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Ra en fase exponencial (OD_{595nm} 0.4 a 0.6), se colectó el pellet celular y se lavó dos veces con medio Sauton, se resuspendió en 1/6 del volumen inicial y se repartió en volúmenes de 4 mL en tubos falcón de 15 mL. Sobre este volumen final se añadieron las sustancias a probar a la concentración deseada, dejando una muestra como blanco (en ausencia de sustancia de intoxicación). Las concentraciones utilizadas fueron: CdCl₂ (10, 25 y 40 μM), CoCl₂ (0,45, 2 y 3,5 mM), CuSO₄ (20, 50, y 500 μM), Fe₂(SO₄)₃ (0,2, 0,41, 0,45 y 2 mM), MnSO₄ (0,2, 0,4, 1 y 15 mM), NiSO₄ (0,6, 1 y 2,5 mM), Pb(NO₃)₂ (0,5 mM) y ZnSO₄ (40, 200 y 500 μM), en el caso de las sustancias de estrés oxidativo y nitrosativo se usó una concentración de 1 mM, concentración sugerida EN [50]. Bajo estas condiciones se realizaron los cultivos

incubando con la sustancia tóxica por 3 horas a 37 °C y 80 rpm de agitación, posteriormente el pellet celular se colectó mediante centrifugación y se lavó con DEPC 0,1% (dietilpirocarbamato) con el fin de inhibir RNasas remanentes. A partir del pellet celular se siguió con el proceso de extracción de ARN.

5.1.3 Cultivo de *M. tuberculosis* bajo condiciones hipóxicas

Otra condición de estrés a las que *M. tuberculosis* debe enfrentarse durante la infección es la hipoxia, o baja tensión de oxígeno, la que se da cuando la micobacteria se encuentra en estado latente en los granulomas. Actualmente existen diversos modelos *in vitro* para estudiar cambios fisiológicos de las micobacterias en hipoxia, entre ellos, el modelo de Wayne y Hayes en el que se produce un agotamiento gradual de oxígeno en el medio de cultivo, y las bacterias entran en un estado persistente no replicativo (NRP) simulando el ambiente del bacilo tuberculoso dentro del granuloma. En la ensayo de hipoxia *in vitro* se destacan dos estados fisiológicos principales: el primero ó NRP-1, donde existe baja saturación de oxígeno, y se caracteriza por finalización en la replicación del ADN; y el segundo estado NPR-2, que se caracteriza por estar en microanaerobiosis [115]. En este estudio las bacterias se crecieron hasta un estado NPR-2 asegurando un contenido muy bajo de oxígeno en el medio de cultivo.

El ensayo de Hipoxia se hizo siguiendo el modelo de Wayne con algunas modificaciones [115]. Se partió de 100 mL de cultivo de *M. tuberculosis* H37Ra en medio líquido DUBOS-ADC crecido hasta fase exponencial (OD₆₀₀ de 0.4), se recolectó el pellet celular y se resuspendió en 30 mL del mismo medio. En tres botellas de 300 mL diferentes se añadieron por separado en la primera 200 mL de DUBOS-ADC con 10 mL de suspensión de células, la segunda 200 mL de DUBOS-ADC con 10 mL de suspensión de células más azul de metileno 1,5 µg/mL, y en la tercera 95 mL de medio DUBOS-ADC con 5 mL de suspensión de células. En este experimento el control de hipoxia está dado por la decoloración del color azul en el cultivo dado por el azul de metileno, el que se compara con un cultivo realizado con aireación. En todas las botellas se puso un agitador magnético y en el caso de los cultivos de hipoxia las botellas se sellaron con Parafilm. Todos los cultivos se incubaron a 37 °C y fueron dejados con agitación magnética hasta la desaparición del color en la botella con azul de metileno, indicando agotamiento de oxígeno en el medio y que las células se encuentran en hipoxia (3 semanas de cultivo). Finalmente,

se colectaron los pellets celulares y se lavaron con DEPC 0,1% (dietilpirocarbamato) y se usaron para extracción de ARN.

5.1.4 Extracción de ARN y síntesis de cADN de *M. tuberculosis*

Utilizando las condiciones descritas anteriormente, las micobacterias se cultivaron bajo las diferentes condiciones de estrés consideradas: concentraciones subletales de cationes de metales pesados, y presencia de ROS y RNS. Posteriormente, se aisló su ARN y se evaluó la respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}, bajo las condiciones de cultivo consideradas, comparándola con los niveles de transcripción mostrados por células cultivadas en condiciones estándar.

La extracción del ARN se realizó con el método de *single-step* [116], que consiste en separar el ARN del ADN después de una extracción celular con el reactivo de TRIzol® (Solución ácida de tiocianato de guanidinio, acetato de sodio y fenol) y cloroformo, seguido de centrifugación. En condiciones ácidas el ARN total permanece en la fase acuosa, mientras que en la interfase y fase inferior orgánica permanece la mayor parte del ADN y proteínas. El ARN puede ser recuperado mediante precipitación con isopropanol (IPA) [116]. El pellet celular se resuspendió en 700 µL del reactivo de TRIzol® (Invitrogen), y se añadió inhibidor de RNasas (Ribolock) de Thermo Scientific. Para la lisis celular, se transfirió la suspensión celular a tubos O-ring conteniendo 500 µL de perlas de zirconio; las células se lisaron mediante 3 pulsos de 2 minutos en Mini Beadbeater-16 (Biospec), con 1 minuto de reposo en hielo entre pulsos. Posteriormente se añadieron 300 µL de cloroformo al lisado celular. Se dejó en reposo por 10 minutos a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. El ARN se precipitó añadiendo isopropanol (IPA) e incubando toda la noche a -20 °C. Una vez centrifugado a 13000 rpm durante 15 min y 4 °C, los pellets que corresponde al ARN precipitado fueron secados al aire y resuspendidos en 25 µL de DEPC 0,1%. Se confirmó la integridad del ARN extraído en gel de agarosa al 2% en buffer TE 0.5X-DEPC. El ARN fue tratado con DNAsa I (Thermo Scientific), durante 30 minutos a 37°C, para eliminar ADN genómico contaminante. A partir de 2 µg de ARN se construyeron las librerías de cADN usando el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). El cADN se alicuotó y almacenó a -20°C hasta su uso.

5.1.5 Análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} por qPCR

Para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} se usaron los iniciadores que fueron diseñados previamente por Novoa-Aponte para los genes de interés [68]. Previo al análisis de qPCR, se verificó la especificidad de los iniciadores mediante PCR convencional utilizando como molde ADN de *M. tuberculosis* H37Ra, utilizando el siguiente ciclo de amplificación de 94 °C x 9min, 35 ciclos de 94 °C x 30 s – 58 °C x 30 s – 72 °C x 30 s, y finalmente 72 °C x 10 min. El diseño de iniciadores se hizo con el programa Primer 3 [117] teniendo en cuenta parámetros como tamaño de amplímero entre 150 y 250 pb, un rango de T_m de 58 a 60 °C. En la Tabla 5-1 se muestran los tamaños de los productos esperados para cada juego de iniciadores.

Tabla 5-1: Iniciadores usados para análisis por qPCR de los genes de las ATPasas tipo P_{1B}. Iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}, mostrando los tamaños del amplímero esperado para cada juego de iniciadores.

Gen	Iniciadores	Tamaño (pb)
<i>ctpA</i>	A-RT-dir y A-RT-rev	192
<i>ctpB</i>	B-RT-dir y B-RT-rev	172
<i>ctpC</i>	C-RT-dir y C-RT-rev	249
<i>ctpD</i>	D-RT-dir y D-RT-rev	178
<i>ctpG</i>	G-RT-dir y G-RT-rev	180
<i>ctpJ</i>	J-RT-dir y J-RT-rev	187
<i>ctpV</i>	V-RT-dir y V-RT-rev	206
	V-RT-dir-2 y V-RT-rev-2	196
<i>sigA</i>	RTsigA-dir y RTsigA-rev	208

Para el análisis de *ctpV* fue necesario diseñar un nuevo juego de iniciadores (Tabla 5-1). Los experimentos se desarrollaron utilizando el kit *iQTM SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad) y el termociclador CFX-96 (Bio-Rad). El gen *sigA* se usó como normalizador. Los valores de expresión relativa se calcularon usando el método Pfaffl [118] con las eficiencias determinadas para cada gen usando las curvas construidas a partir de diluciones de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra. El análisis fue hecho utilizando los diferentes cADN y el programa de temperatura usado fue 95 °C x 5 min, 50 ciclos de 95 °C x 10 s – T_m °C x 10 s (Temperatura varía dependiendo del juego de iniciadores) – 72 °C x 15 s, al final de cada ciclo se hacen lecturas de fluorescencia y se hizo una curva de fusión desde los 72

°C hasta 95 °C. Los experimentos se desarrollaron por triplicado técnico, con una réplica biológica.

Para cada juego de iniciadores se construyó previamente una curva de eficiencia de amplificación, con el fin de asegurarse que estos pudieran ser empleados para el análisis por qPCR. Las curvas de eficiencia se realizaron partiendo de diferentes concentraciones de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra, estandarizando las condiciones de reacción para que cada juego de iniciadores con el objetivo de obtener una eficiencia cercana a 2, además que las curvas de fusión evidenciaran la amplificación de un único producto, asegurando la especificidad de los iniciadores.

5.2 Análisis transcripcional de posibles reguladores de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*

Para el análisis de la actividad de los posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, inicialmente se buscaron *in silico* unos posibles reguladores, y después se analizó su actividad transcripcional bajo condiciones de estrés mediante qPCR.

5.2.1 Búsqueda de posibles reguladores de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*

Se buscaron proteínas posiblemente relacionadas con la expresión de las 7 ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Una primera aproximación fue buscar en el entorno genómico del gen de interés, utilizando el servidor Tuberculist [119]. Una segunda aproximación fue buscar los reguladores en las redes de regulación transcripcional de *M. tuberculosis* reportada por Du y colaboradores [120] y Balazsi y colaboradores, donde se relacionan posibles reguladores transcripcionales de diferentes genes de *M. tuberculosis*, búsqueda que se limitó a genes de ATPasas tipo P_{1B}. Finalmente se usó el servidor TB Network Portal [121], que relaciona datos obtenidos por técnicas de ChIP-Seq (Inmunoprecipitación de Cromatina-Secuenciación, siglas en inglés) y TFOE (sobreexpresión de factores de transcripción, siglas en inglés), que permiten conocer la región del genoma en la que un regulador transcripcional puede estar interaccionando.

5.2.2 Análisis transcripcional bajo condiciones de estrés de los reguladores de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*

Una vez seleccionados los genes de los reguladores a estudiar, se obtuvieron sus secuencias de la base de datos Tuberculist [119], y se diseñaron iniciadores para su análisis utilizando el servidor primer 3 [117] buscando amplificar un segmento del gen entre 150 a 250 pb, con un T_m de 58 a 60 °C. En la Table 5-2 se muestran las secuencias de los iniciadores diseñados. La especificidad de estos iniciadores se comprobó mediante PCR convencional utilizando como molde ADN de *M. tuberculosis* H37Ra (cepa con la que se hará el análisis transcripcional) y el mismo programa de amplificación usado para evaluar la especificidad de los iniciadores de las ATPasas tipo P_{1B}. Luego se procedió a elaborar las curvas de eficiencia, para asegurar que los iniciadores puedan ser empleados en el análisis por qPCR. Las curvas de eficiencia fueron obtenidas a partir de diferentes cantidades de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra, estandarizando condiciones como el T_m para conseguir eficiencias cercanas a 2, y obtener curvas de fusión que demuestren la especificidad de los diferentes productos.

Tabla 5-2: Iniciadores usados para análisis por qPCR de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}. Se reportan los iniciadores que fueron diseñados para el análisis transcripcional de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}, mostrando la secuencia obtenida para cada juego de iniciadores y el tamaño de los amplímeros esperados.

Gen	Nombre	Secuencia (5'-3')	Tamaño (bp)
rv2250c	RT-Rv2250c-dir	ATACCGGTGGTCGTATCCTG	241
	RT-Rv2250c-rev	ACCGCGACAATCTGCTTTAC	
rv0818	RT-Rv0818-dir	TGCACGAAGTATGGGGGTAT	225
	RT-Rv0818-rev	CGACCAGTGGTTCTTGCATA	
	RT-Rv0818-dir-2	GAGAGTCTGGGCAAGGTGAG	195
	RT-Rv0818-rev-2	GCCCCGAAGAAGTCATAC	
rv2069	RT-Rv2069-dir	GGACGATCTACCCAAGAGA	188
	RT-Rv2069-rev	GGTCGCCGTCTATGAGATGT	
rv0324	RT-Rv0324-dir	AAGACGTGGCAAGGCTGTT	225
	RT-Rv0324-rev	CGGCTATCGGGATATTGATG	
rv3223c	RT-Rv3223c-dir	CCGGATACTGACCAACACCT	183
	RT-Rv3223c-rev	GCCTCTTGATCTCGGTGTC	
rv0238	RT-Rv0238-dir	TTAACGGCTACCACGAGACC	171
	RT-Rv0238-rev	TCTGGTCGAAGTTGATGCTG	
	RT-Rv0238-dir-2	CTCCAAGGAAGACCTGTTTCG	178
	RT-Rv0238-rev-2	CTGGGTGTACATCACGATCC	

<i>rv1994c</i>	RT-Rv1994c-dir	CCAACCATCTGTCGTGTTTG	154
	RT-Rv1994c-rev	ACACAGGGTTGGTCGGTATC	
<i>rv3744</i>	RT-Rv3744-dir	ATGATCCTCACCCAGCTACG	216
	RT-Rv3744-rev	CAAGTGCTCGCTGTGGTAAA	
<i>rv0967</i>	RT-Rv0967-dir	AAGGAATTGACCGCAAAGAA	188
	RT-Rv0967-rev	CACGTCTCCAAGTGGTTGTG	

El análisis transcripcional de los posibles reguladores se hizo a las mismas condiciones de estrés en las que se estudió el comportamiento transcripcional de las diferentes ATPasas tipo P_{1B}. El ensayo se hizo utilizando el kit *iQTM SYBR® Green Supermix* (Bio-Rad) y el termociclador CFX-96 (Bio-Rad). El gen *sigA* se usó como normalizador. Los valores de expresión relativa se calcularon usando el método Pfaffl [118]. El análisis fue hecho con los diferentes cADN y el mismo programa de temperatura usado en el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}. El ensayo se hizo por triplicado técnico y una réplica biológica.

5.3 Caracterización funcional de las ATPasas tipo P_{1B-1} de *M. tuberculosis*

5.3.1 Análisis bioinformático de las ATPasas tipo P_{1B-1} de *M. tuberculosis*: CtpA, CtpB y CtpV

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de cada una de las ATPasas tipo P_{1B-1} o Cu⁺ ATPasas fueron tomadas del servidor Tuberculist [119], detallando en la localización genómica, tamaño del gen, longitud de proteína y peso molecular de la enzima.

5.3.1.1 Topología y motivos funcionales de CtpA, CtpB y CtpV

En la predicción de topología de las tres enzimas, se usaron las secuencias de los genes *ctpA*, *ctpB* y *ctpV* de *M. tuberculosis* obtenidas de Tuberculist [119]. La predicción de TM se realizó usando la herramienta TOPCONS [122]. Los motivos funcionales se buscaron utilizando el servidor InterProScan [123], y los 9 motivos característicos de esta familia de enzimas [55] se buscaron y se localizaron manualmente mediante alineamientos con secuencias consenso construidas por Novoa-Aponte y colaboradores [124].

Los alineamientos múltiples de las secuencias de aminoácidos de CtpA, CtpB, CtpV, Msmeg_5014 (Cu⁺ ATPasa putativa de *M. smegmatis* mc²155), AfCopA (Cu⁺ ATPasa de *Archaeoglobus fulgidus*) y LpCopA (Cu⁺ ATPasa de *Legionella pneumophila*), se construyeron con el programa Clustal OMEGA [125]. La posición en el que se encontraban las secuencias TM se obtuvo con el servidor TOPCONS [122]. En el caso de la región N-Terminal se tomaron los residuos ubicados antes de la primera TM.

Para conocer los residuos de CtpV que serían reemplazados en el motivo de unión a Cu⁺ del MBD, se hizo un alineamiento de estructura terciaria con el servidor TM-align [126] entre el MBD de CtpV y MBD2 de EcCopA (La metodología para la construcción de estos modelos se especifica más adelante).

5.3.1.2 Modelamiento de estructura terciaria de CtpA, CtpB y CtpV

La estructura terciaria de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* se modelaron por homología usando el servidor Phyre² [127]. Para las tres enzimas se usó como molde CopA, Cu⁺ ATPasa de *A. fulgidus* (PDB ID 3J09 cadena A, estructura determinada por microscopía crió-electrónica con una resolución de 10,00 Å) [128]. Los modelos se validaron usando el paquete de herramientas Whatif (<http://swift.cmbi.ru.nl/servers/html/index.html>). La calidad del modelo fue evaluada con 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 calculando el *Z-score* con la herramienta “*Ramachandran plot evaluation*”. El valor del *Z-score* es una medida de la calidad del modelo basado en el gráfico de Ramachandran, los modelos de alta calidad tendrán *Z-scores* cercanos a cero [129] [129, 130]. Adicionalmente, la calidad de los modelos también se corroboró al usar el servidor ProQ2 que usa un global score que varía entre 0 y 1, este valor se calcula con la suma de los S-score de cada uno de los residuos normalizado por la longitud de la secuencia, los modelos son de buena calidad tienen un valor de global score cercano a 1 [131]. Usando el programa PPM server [132] se asigna una bicapa lipídica a los modelos, y para visualizar los modelos se usa el programa Chimera [133].

5.3.1.3 Evaluación de mapas de potencial electrostático de superficie de los MBD de las Cu⁺ ATPasas

Se evaluó la densidad de carga electrostática de los MBD de las diferentes Cu⁺ ATPasas para predecir su función [91]. Para ello se construyeron por separado los modelos de estructura terciaria por homología de los MBD de las Cu⁺ ATPasas de CtpA, CtpB, CtpV, Msmeg_5014, MBD1 y MBD2 de EcCopA (Cu⁺ ATPasa de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *E. coli*, respectivamente). Los modelos se construyeron por homología usando el servidor Phyre² [127]. Para evaluar la calidad se calculó el parámetro de global score del programa ProQ2, cuyos valores cercanos a 1 indican una buena calidad del modelo [131]. Para la calcular los mapas de potencial electrostático de superficie se usó el servidor PDB2PQR [134], que usa el programa de cálculo electrostático macromolecular APBS (*Adaptive Poisson-Boltzmann Solver*, sigla en Ingles). Todos los parámetros se hicieron por defecto, y se añadieron parámetros como: 2 especies iónicas presentes en el sistema (el primero: carga +1, concentración 0,01M, Radio iónico 2 Å; el segundo carga -1; concentración 0,01M, Radio iónico 2 Å) y en el formato de salida (*Output of scalar data calculated during the PB run*) se usó la opción que muestra la densidad de energía en unidades de $K_bT/e_d\text{Å}^2$ (*Write out the energy density in units of $K_bT/e_d\text{Å}^2$ (multigrid only)*). Para visualizar los modelos con el mapa de potencial electrostático de superficie se usó el mismo servidor usando la opción *3Dmol visualization*.

5.3.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas utilizadas en este trabajo (Tabla 5-3) se conservaron como stocks glicerizados a -80 °C. Las micobacterias fueron revisadas con regularidad usando la tinción de Ziehl-Neelsen [135]. En todos los casos el material para cultivo, incluidos los medios, se esterilizaron en autoclave (121°C por 15 minutos); para suplementos especiales (proteínas, antibióticos, etc.) que no se podían ser esterilizados con autoclave, esta se hizo esterilización por filtración con membranas de 0,22 µm.

Tabla 5-3: Cepas bacterianas utilizadas a lo largo de este estudio.

Cepa	Características ¹	Referencia/Fuente
<i>E. coli</i> LMG194	Cepa de expresión de proteínas que no metaboliza arabinosa (Δ ara714)	Life Technologies [136]
<i>E. coli</i> DC194	Mutante de <i>E. coli</i> LMG194 Δ copA (Cu ⁺ ATPasa)	Donado por el Laboratorio del Profesor Argüello (WPI).

<i>E. coli</i> TOP10	Cepa para el almacenamiento de plásmidos recombinantes	Life Technologies [136]
<i>E. coli</i> DH5α	RecA ⁻ , endA ⁻ , permite selección Blanco/Azul sin necesidad de IPTG	Life Technologies [136]
<i>E. coli</i> HB101	str ^R , RecA ⁻ , endA ⁺ , actividad γδ negativa	Catalogo ATCC [137]
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155	Micobacteria no patógena de crecimiento rápido, amp ^R , chx ^R , cb ^R	Snapper,1993 [138]
<i>M. tuberculosis</i> H37Ra	Micobacteria avirulenta de referencia de crecimiento lento, amp ^R , chx ^R , cb ^R	Zheng, 2008 [139]

¹Abreviaturas: RecA-Recombinasa; endA-endonucleasa; str-estreptomicina; chx-cicloheximida; cb-carbenicilina; tet-tetraciclina.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron con agitación en medio Luria-Bertani (LB) caldo o 2YT, a 37°C durante 12-24 h. Aquellas cepas que contenían plásmidos se cultivaron suplementando el medio de cultivo con el antibiótico apropiado a las siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Hyg 100 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).

M. smegmatis se cultivó en LB caldo o agar durante 3-5 días a 37°C y 80 rpm, mientras que *M. tuberculosis* fue cultivado durante 3-4 semanas a las mismas condiciones en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% OADC (Albumina 0.5%, dextrosa 0.2%, catalasa 0.004% y ácido oleico 50 µg/mL), o medio sólido Middlebrook 7H10 o 7H11 -OADC. El crecimiento de micobacterias en medio mínimo se realizó en medio Sauton modificado (MgSO₄ 0,05%, KH₂PO₄ 0,05%, ácido cítrico 0,2%, glicerol 6%, L-asparagina 0,4%, citrato férrico amónico 0,005%, Tween 80 0,05% y ZnSO₄ 6,2 µM con glucosa 0,2%, Fe₂(SO₄)₃ 30 µM y Tween-80 0,05 %), que corresponde al medio Sauton, pero suplementado con Fe₂(SO₄)₃ 30 µM y Tween-80 0,05 %. Estos suplementos permiten llegar a un mayor OD_{595nm} al cultivar *M. tuberculosis* H37Ra y evitar la agregación celular, respectivamente. Cuando se requirió, el medio se suplementó con: Amp (50 µg/mL), Hyg (50 µg/mL), Km (20 µg/mL), y Tween80 (0,05%).

5.3.3 Construcción de recombinantes de sobreexpresión

Todos los plásmidos recombinantes construidos en el presente trabajo se muestran en el Anexo B, que para su construcción y análisis se utilizaron los iniciadores relacionados en

el Anexo A. Para el diseño de estos iniciadores se usaron los programas *GeneRunner* [140] y *A Plasmid Editor – ApE* [141]. Las características fueron: longitud entre 18 y 29 nucleótidos, %GC entre 50 y 60 %, Tm 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 [142].

Mediante técnicas convencionales de clonación y biología molecular se construyeron recombinantes de sobreexpresión en micobacterias de CtpA y CtpB en el plásmido lanzadera pMV261, y recombinantes de expresión en *E. coli* para CtpA, CtpB y CtpV, usando el sistema pBAD. A continuación, se describen las técnicas convencionales de clonación y la estrategia metodológica empleada para la construcción de cada recombinante de sobreexpresión de las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*.

5.3.3.1 Técnicas convencionales de clonación

- PCR:

Las amplificaciones de ADN se hicieron mediante PCR siguiendo las recomendaciones del proveedor de la ADN polimerasa. La enzima, los iniciadores y el molde de la reacción varió de acuerdo con la región de ADN que quería ser amplificada (Tabla 5-4) junto al programa de reacción, que depende de la temperatura de anillaje de los iniciadores y el tamaño del producto esperado. En todas la PCR se incluyeron como control negativo, reacciones suplementadas con agua en vez de molde de ADN. Por otra parte, como control positivo se utilizaron reacciones suplementadas con ADN conteniendo la secuencia del producto de amplificación.

La visualización de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,7-2 % en buffer TBE (Tris-Borato-EDTA) por tinción con HydraGreen™. En los casos donde era necesario purificar ADN a partir de una banda de agarosa se usó el kit *Gel Purification Kit* (Favrogen Biotech Corp), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Finalmente, en los casos donde era necesario cuantificar la cantidad de ADN se hizo mediante medidas de absorbancia a 260 nm en el NanoDrop™ 2000c (Thermo Scientific).

Tabla 5-4: Condiciones de las PCR realizadas a lo largo de este estudio.

Producto	Molde	Iniciadores	Polimerasa	Denat. Inicial	35 ciclos:			Elong Final
					Denat.	Anilla.	Elong	
Construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpA								
<i>ctpA</i> pBAD	ADN H37Rv	pBAD-ctpA- dir/ pBAD-ctpA- rev	<i>Pfu ADN</i> pol	94°C x 9min	94°C x 30s	66°C x 45s	72°C x 3min	72°C x 10min
Comprobación pALT17	pALT17	A-RT-dir/ SP6 DOWN	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Comprobación pALT20	pALT20	A-RT-dir/ pBAD comp down	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpB								
<i>ctpB</i> pBAD	ADN H37Rv	pBAD-ctpB- dir/ pBAD-ctpB- rev	<i>Pfu ADN</i> pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 45s	72°C x 3min	72°C x 10min
<i>ctpB</i> pMV	ADN H37Rv	pMV-ctpB- dir/ pMV-ctpB- rev	<i>Pfu ADN</i> pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 3min	72°C x 10min
Comprobación pALT18	pALT18	B-RT-rev/ T7	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Comprobación pALT21	pALT21	B-RT-rev/ pBAD comp up	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Comprobación pALT9	pALT9	B-RT-rev/ T7	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Comprobación pALT10	pALT10	B-RT-rev/ PMV comp up	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	58°C x 30s	72°C x 45s	72°C x 10min
Construcción de los recombinantes de sobreexpresión de CtpV								
<i>ctpV</i> pBAD	ADN H37Rv	pBAD topo ctpV For/ pBAD-ctpV- rev	<i>Pfu ADN</i> pol	94°C x 9min	94°C x 30s	72°C x 30s	72°C x 2min	72°C x 10min
Comprobación pALT26	pALT26	5 ctpV seq/ pBAD For	ADN Taq Pol	94°C x 9min	94°C x 30s	50°C x 30s	72°C x 2min	72°C x 10min

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

- Digestión con enzimas de restricción:

La digestión de ADN con enzimas de restricción se hizo partiendo de 1 µg de ADN plasmídico, y siguiendo las indicaciones del proveedor. En el caso de usar *enzimas Fast Digest* (Thermo Scientific), las reacciones se hicieron durante 30 min a 37 °C; en el caso de una digestión doble se usó el mismo buffer *Fast digest*. Cuando se emplearon las

enzimas convencionales, las reacciones enzimáticas se llevaron a cabo durante 2 horas a 37 °C, y las dobles digestiones se hicieron siguiendo las indicaciones del programa *DoubleDigest* de Thermo Scientific.

El mapeo de restricción permite analizar las secuencias de un ADN, conociendo los sitios que reconocen las diferentes enzimas dentro de las secuencias y los tamaños producidos. Para conocer las enzimas a utilizar en los mapeos de restricción, se usó el programa de construcción de plásmidos ApE (*A Plasmid Editor*). En el análisis por mapeo, lo ideal es usar enzimas que permitan diferenciar 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 para un mismo ADN.

En el caso de los plásmidos o vectores usados en las clonaciones, se hizo una defosforilación luego del corte con las enzimas de restricción, para evitar la religación del vector. La defosforilación se llevó a cabo con la fosfatasa alcalina FastAP (Thermo Scientific) siguiendo las indicaciones del proveedor, en el caso de las digestiones con enzimas *Fast Digest*, la fosfatasa fue adicionada en la mezcla de reacción enzimática de las enzimas de restricción.

- **Ligación:**

La ligación de fragmentos de ADN hizo con la T4 ADN ligasa (Thermo Scientific). La relación molar vector e inserto utilizada fue 1:1 y 1:2 para insertos grandes (>2 kb); y para fragmentos pequeños (< 1kb) se utilizaron las relaciones 1:3 y 1:5. Se partió de 50-100 ng de vector, utilizando el siguiente programa de temperatura 16 °C x 90 min, 21 °C x 30 min, 22 °C x 45 min, 23 °C x 30 min y 24 °C x 30 min. En el caso de las ligaciones en pGEM-T easy® (Promega) se siguieron las indicaciones del proveedor y la incubación se hizo una hora a temperatura ambiente y 4 °C durante una noche.

- **Transformación de células competentes**

Electrocompetencia:

A partir de 50 mL de un cultivo en fase exponencial (OD_{600nm} 0,5 a 0,6) se recuperó el pellet bacteriano por centrifugación. Se hicieron tres lavados con 25, 12 y 7 mL de glicerol 10% (para *E. coli* y *M. smegmatis*) o glicerol 10 % con Tween-80 0,05% (para *M. tuberculosis*).

Las células se resuspendieron en 1 mL la misma solución de lavado y se alicuotaron. Esta alícuotas fueron usadas para la transformación. El procedimiento anterior se hizo bajo condiciones estériles en frío en el caso de *E. coli* y *M. smegmatis*, y a temperatura ambiente en el caso de *M. tuberculosis*. Las células electrocompetentes de *E. coli* y *M. smegmatis* se almacenaron a -80 °C hasta su uso; para el caso de *M. tuberculosis* se electroporaron las células electrocompetentes recién preparadas.

Para la electroporación se usaron de 10 a 100 ng de ADN. En el caso de *E. coli* se usó una alícuota de 50 µL, y la electroporación se realizó utilizando un pulso de 25 µF, 2,5 kV, 200 Ω y 4-5ms en celdas de 0,2 cm en Electroporador Xcell™ (BIORAD). Luego del pulso las bacterias se recuperaron añadiendo 200µL de medio SOC, y se incubaron a 37°C con agitación por 2 horas. Para el caso de micobacterias se usó una alícuota de 100 µL de electrocompetentes y un pulso de 25 µF, 2,5 kV y 1000Ω entre 15-25 ms. La recuperación de las micobacterias se hizo con 1 mL de medio LB (*M. smegmatis*) o 7H9-OADC-Tween-80 (*M. tuberculosis*), las que se incubaron a 37 °C con agitación por 3 h para *M. smegmatis* y toda la noche para *M. tuberculosis*. Finalmente, el producto de transformación se plaqueó en el respectivo medio sólido suplementado con el antibiótico de selección y se incubó a 37 °C hasta obtener colonias.

Termocompetencia:

A partir de una colonia aislada se hizo un precultivo de 7,5 mL de medio LB, el que se incubó durante una noche a 37 °C con agitación. El cultivo se transfirió a 100 mL de LB-A (LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y glucosa 0,2 %) e incubó a 37 °C con agitación hasta alcanzar un OD_{595 nm} de 0,4 a 0,6. Se recuperó el pellet por centrifugación y se lavó con solución fría de MgCl₂ 80 mM y CaCl₂ 20 mM. Finalmente, el pellet se resuspendió en 0,5 mL de LB-A y 2,5 mL de LB-B (LB + MgSO₄ 12 mM + Glicerol 36 % + PEG 12 %), e inmediatamente se alicuotó en volúmenes de 50 µL. Estas alícuotas fueron usadas para la transformación y pueden ser almacenadas a -80 °C.

Para la transformación se utilizaron de 10 a 100 ng de ADN y 50 µL de células termocompetentes. Se incubaron en hielo durante 30 min y se hizo un choque térmico rápido que consiste en una incubación a 42 °C durante 90 s e inmediata incubación en hielo durante 5 min. Las células se recuperan con 200 µL de medio SOC y se incubaron a 37 °C con agitación durante 2 horas. Finalmente, el producto de transformación se plaqueó

en el respectivo medio sólido suplementado con el antibiótico de selección, el que se incubó a 37 °C hasta obtener colonias.

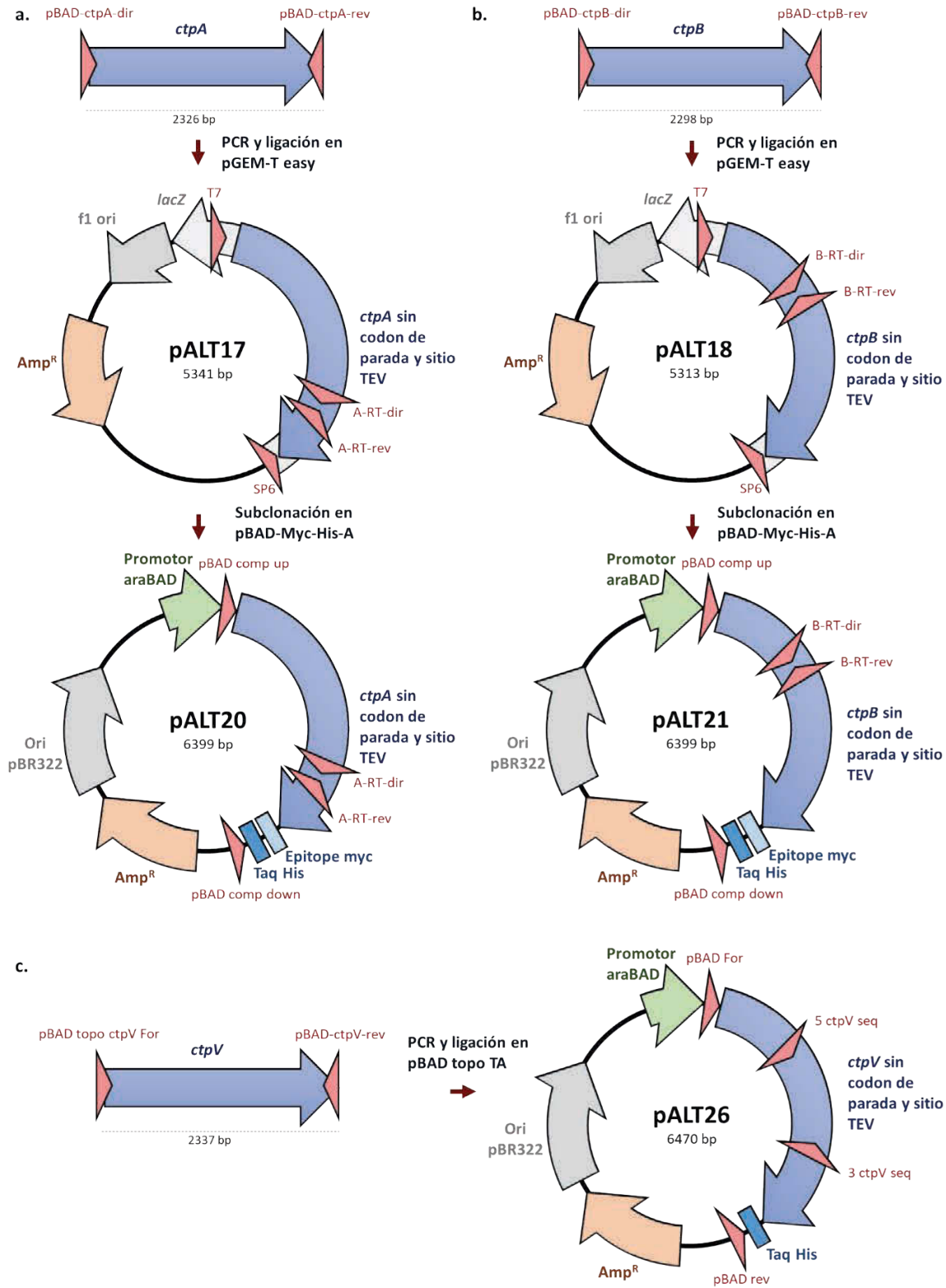
5.3.3.2 Construcción de recombinantes de sobreexpresión de CtpA, CtpB y CtpV en *E. coli*

Como parte de la caracterización funcional de las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* se construyeron recombinantes de sobreexpresión de las proteínas en *E. coli*, que permitieron la expresión de las proteínas y su posterior purificación. Para ello, los genes de *ctpA*, *ctpB* y *ctpV* de *M. tuberculosis* se clonaron en el vector pBAD. La Figura 5-1 ilustra la estrategia experimental empleada para la construcción de los plásmidos recombinantes pALT20, pALT21 y pALT26, que resultaron de la clonación de los respectivos genes en el vector pBAD.

- CtpA

El gen *ctpA* de *M. tuberculosis* (rv0092) se clonó en el vector pBAD-Myc-His-A (Thermo Scientific), para generar el recombinante pALT20 (Figura 5-1a). Para la clonación, *ctpA* se amplificó usando iniciadores dirigidos a la parte inicial y final del gen sin incluir los codones de inicio y terminación naturales. En los extremos del producto de PCR se añadieron los sitios de restricción *Hind*III y *Xho*I. Adicionalmente, en el iniciador reverso incluyó una secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV) antes de la etiqueta de His, con el fin de remover esta etiqueta luego de purificar la proteína. La PCR se hizo usando *Pfu* ADN polimerasa (Thermo Scientific), los iniciadores pBAD-*ctpA*-dir/pBAD-*ctpA*-rev, utilizando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv extraído por el método de CTAB [143]. Al producto se le añadió una Adenina en el extremo 3' al utilizar Taq ADN polimerasa (Thermo Scientific) en la siguiente mezcla de reacción: Producto de PCR con *Pfu* (6,7 µL), Buffer Taq Pol 10X con (NH₄)₂SO₄ (1 µL), MgCl₂ (0,8 µL), dATP 4 mM (0,5 µL) y Taq Pol (1 µL); esta mezcla se incubó a 70 °C durante 30 min.

Figura 5-1: Esquema de construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpA, CtpB y CtpV en *E. coli*. a. Esquema de clonación del gen *ctpA* en el plásmido pBAD-Myc-His-A. b. Esquema de clonación del gen *ctpB* en el plásmido pBAD-Myc-His-A. c. Esquema de clonación del gen *ctpV* en el plásmido pBAD-topo-TA.



Este producto del gen de *ctpA* se clonó en el vector pGEM-T easy (Promega) siguiendo las indicaciones del proveedor. El producto de ligación se transformó en células termocompetentes de *E. coli* DH5α y los transformantes se seleccionaron sobre placas de

LB/agar/Amp. Se analizaron 60 colonias blancas por PCR con dos juegos de iniciadores, T7/A RT dir y SP6 DOWN/A RT dir. A partir de las colonias positivas (14 a 19) se extrajeron los plásmidos recombinantes con el kit *Plasmid DNA Extraction Mini Kit* (Favorgen Biotech Corp) y se verificaron por mapeo de restricción las colonias 15, 18 y 19 usando las enzimas *HindIII-XhoI* y *NotI*. A partir plásmido recombinante pALT17, extraído de la colonia 19, se hizo la subclonación del gen *ctpA* en el plásmido pBAD-Myc-His-A entre los sitios *HindIII* y *XhoI* (generando el plásmido pALT20). Esta subclonación se hizo mediante una digestión doble del pBAD-Myc-His-A y pALT17 con las enzimas *HindIII* y *XhoI Fast digest* (Thermo Scientific); en el caso del vector adicionó fosfatasa FastAP (Thermo Scientific), se purificaron los fragmentos correspondiente al gen *ctpA* y pBAD cortado, y se hizo la ligación entre ellos usando relaciones molares vector e inserto 1:1 y 1:2. Los productos de ligación entre el vector e inserto se confirmaron por PCR usando los iniciadores pBAD comp down y A RT dir, la transformación del producto de ligación se hizo por termocompetencia en *E. coli* TOP10 y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/Amp. Se analizaron 12 colonias por PCR usando los iniciadores pBAD comp down y A RT dir. A partir de las colonias 10 a 12 se extrajeron los plásmidos recombinantes, los que se verificaron por mapeo de restricción usando las enzimas *HindIII-XhoI*. El plásmido recombinante pALT20 de la colonia 10 se seleccionó para verificar la integridad del constructo y confirmar si el gen se encuentra en marco de lectura correcto.

- **CtpB**

El gen *ctpB* de *M. tuberculosis* (*rv0103c*) se clonó en el vector pBAD-Myc-His-A (Thermo Scientific), generando el plásmido de sobreexpresión pALT21 (Figura 5-1b). La estrategia metodológica fue muy similar a la usada para la construcción de pALT20, por lo que para la amplificación del gen *ctpB* se tuvieron las mismas consideraciones. Se hizo la PCR usando los iniciadores pBAD-ctpB-dir y pBAD-ctpB-rev para amplificar el gen *ctpB* flanqueado por los sitios de restricción *EcoRI* y *HindIII*. El producto de PCR con la posterior adición de la A en el extremo 3' se clonó en el vector pGEM-T easy para generar el plásmido pALT18, que fue transformando en células termocompetentes de *E. coli* DH5 α y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/Amp. Se analizaron las colonias por PCR usando los iniciadores T7 y B-RT-rev. Se extrajeron los plásmidos recombinantes de las colonias seleccionadas 1 a 4, los que se verificaron por mapeo de restricción con las enzimas *EcoRI-HindIII* y *PvuII*. A partir del plásmido recombinante de la

colonia 4 se hizo la subclonación entre los sitios *Hind*III y *Eco*RI del plásmido pBAD-Myc-His-A. Esta subclonación se hizo mediante una digestión doble del pBAD-Myc-His-A y pALT18 con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI *Fast digest* (Thermo Scientific); en el caso del vector trató con fosfatasa FastAP (Thermo Scientific), y se purificaron los fragmentos correspondientes al gen *ctpB* y pBAD cortado, a partir del gel de agarosa utilizando el kit *Gel Purification Kit* (Favrogen Biotech Corp). La ligación se hizo con relaciones molares de vector e inserto 1:1 y 1:2, y los productos de ligación se analizaron por PCR usando los iniciadores pBAD comp up y B-RT-rev. La ligación se transformó por termocompetencia en *E. coli* TOP10 y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/Amp. Las colonias obtenidas se analizaron por PCR usando los iniciadores pBAD comp up y B-RT-rev. Se extrajo los plásmidos recombinantes de las colonias 1 a 6 y se verificaron por mapeo de restricción con las enzimas *Eco*RI-*Hind*II y *Nde*I. El plásmido pALT21 de la colonia 1 fue secuenciado.

- **CtpV**

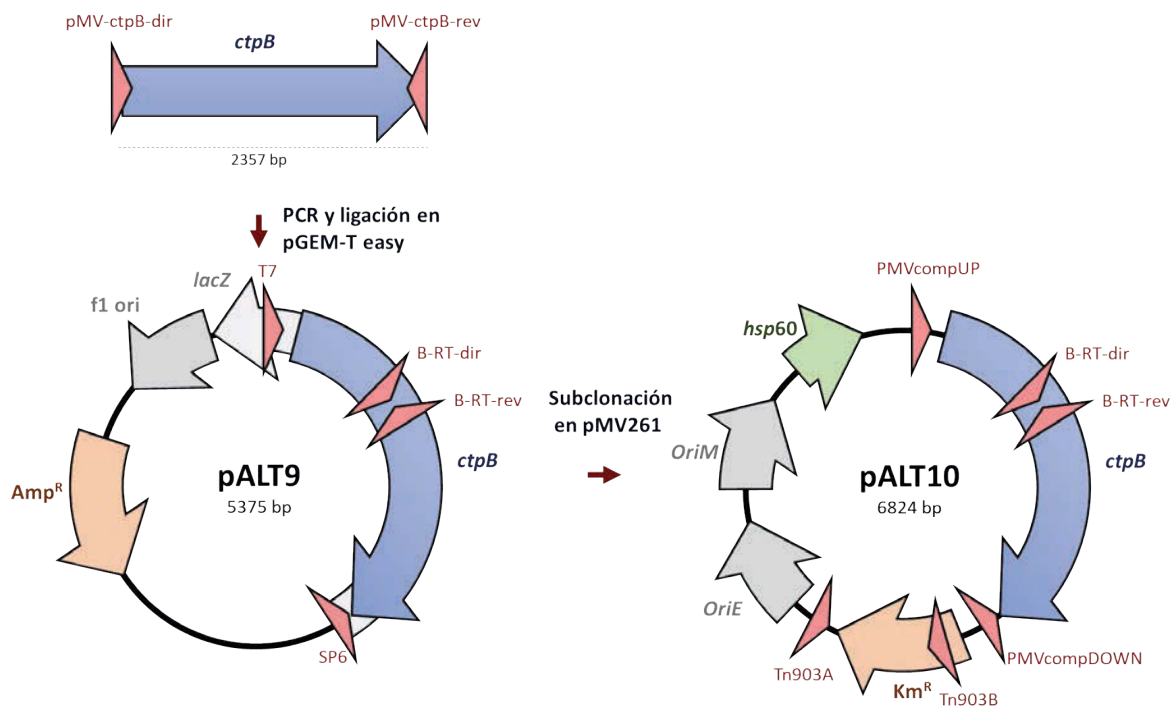
El gen *ctpV* de *M. tuberculosis* (*Rv0969*) se clonó en el vector pBAD topo TA (Thermo Scientific) generando el plásmido recombinante pALT26 (Figura 5-1c). Inicialmente se amplificó el gen por PCR usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv e iniciadores dirigidos a la parte inicial y final del gen sin incluir los codones de inicio y terminación naturales (pBAD topo *ctpV* For y pBAD-*ctpV*-rev). En el caso del iniciador reverso también se incluyó la secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV) antes de la etiqueta de His, en este caso se usó una mezcla de Taq ADN polimerasa 1 U y Q5® High Fidelity ADN polimerasa 0,1 U (NEB, *New England Biolabs*) en una relación 10:1. El producto de PCR se clonó en el vector pBAD topo TA siguiendo las indicaciones del proveedor. El producto de ligación se transformó en células termocompetentes de *E. coli* TOP10 y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/Amp. Se analizaron por PCR 8 colonias obtenidas, y la direccionalidad del fragmento se verificó también por PCR usando los iniciadores pBAD rev y 5 *ctpV* seq. Se seleccionó la colonia 2 para extraer su plásmido recombinante y se secuenció para verificar el marco de lectura y la integridad del constructo resultante.

5.3.3.3 Construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias

Para la determinación de la especificidad iónica y de los parámetros cinéticos de CtpB de *M. tuberculosis*, se construyó un recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias. Para ello el gen *ctpB* de *M. tuberculosis* se clonó en el vector pMV261, resultando el plásmido de sobreexpresión pALT10. La Figura 5-2 ilustra la estrategia experimental empleada para la construcción de este plásmido recombinante.

Inicialmente el gen se amplificó por PCR a partir de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv usando los iniciadores pMV-ctpB-dir/pMV-ctpB-rev dirigidos a la parte inicial y final del gen, añadiendo los sitios de restricción *Hind*III y *Eco*RI en los extremos del amplímero. El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T easy para generar el plásmido pALT9, y la ligación se comprobó por PCR usando los iniciadores T7 y B-RT-rev. El plásmido recombinante se transformó en células termocompetentes de *E. coli* DH5 α , y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/Amp. Las colonias obtenidas fueron comprobadas por PCR usando los iniciadores T7 y B-RT-rev. A partir de las colonias 2 y 3 se extrajeron los plásmidos recombinantes y se verificaron por mapeo de restricción con las enzimas *Eco*RI-*Hind*III, *Xho*I, *Pvu*II, y *Bam*HI. Se usó el plásmido recombinante de la colonia 3 para hacer la subclonación del gen *ctpB* entre los sitios *Hind*III y *Eco*RI del plásmido pMV261. Esta subclonación se hizo mediante una digestión doble del pMV261 y pALT9 con las enzimas *Hind*III y *Eco*RI *Fast digest* (Thermo Scientific), tratando también el vector con fosfatasa FastAP (Thermo Scientific). Los productos de digestión correspondientes al gen *ctpB* y pMV261 se purificaron a partir de gel de agarosa utilizando el kit *Gel Purification Kit* (Favrogen Biotech Corp). La ligación vector e inserto se realizó utilizando las relaciones molares 1:1 y 1:2, y los productos de ligación se confirmaron por PCR usando los iniciadores PMVcompUP y B-RT-rev. Una vez verificado el éxito de la ligación, estos productos de ligación se transformaron en células termocompetentes de *E. coli* TOP10, seleccionando las bacterias transformantes sobre placas de LB/agar/Km. Los plásmidos recombinantes se extrajeron a partir de tres colonias, los que se verificaron por mapeo de restricción con las enzimas *Pvu*II y *Bam*HI. El plásmido de la colonia 1 fue secuenciado para verificar la integridad del recombinante y confirmar si el gen se encuentra en marco de lectura correcto.

Figura 5-2: Esquema de construcción del recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias. Esquema de clonación del gen *ctpB* en el plásmido pMV261.



5.3.4 Ensayos de toxicidad frente a metales pesados de *M. smegmatis* sobreexpresando CtpB

Dentro del análisis funcional de CtpB, se consideró determinar la especificidad iónica del transportador y evaluar el efecto de su sobreexpresión en la viabilidad de *M. smegmatis* mc²155, para lo que se realizaron ensayos de toxicidad del recombinante frente a metales pesados. Este ensayo consiste en determinar el grado de crecimiento celular en presencia de diferentes concentraciones de un metal pesado. Se comparan cepas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas con pALT10 y pMV261, donde la primera sobreexpresa CtpB y la segunda es un control de no expresión, transformada solo con el vector. El crecimiento bacteriano se estimó midiendo el cambio en las medidas de absorbancia a 595 nm entre cepas, en ausencia y presencia de los cationes evaluados: Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Zn²⁺.

Las bacterias se cultivaron en un volumen final de 200 µL en placas de 96 pozos. Se partió de un cultivo en fase exponencial (OD_{600nm}=0,6) el que se diluyó en medio LB/Km/Tween 80 para obtener un OD_{595nm} de 0,05 en cada pozo. De la misma forma, la concentración a

probar de catión se ajustó con el mismo medio. Para este efecto, se emplearon cada una de las siguientes sales y rangos de concentración: CdCl_2 (5-60 μM), CoCl_2 (0,25-1,5 mM), CuSO_4 (0,5-3 mM), MnSO_4 (1-8 mM), NiSO_4 (0,125-1,5 mM) y ZnSO_4 (0,1-1 mM). Cultivos no suplementados con catión se utilizaron como control positivo de crecimiento, y como control negativo se usaron cultivos suplementados con INH 1 $\mu\text{g/mL}$. Las placas fueron selladas e incubadas a 37 °C por 72 horas, posteriormente se midió el crecimiento bacteriano a $\text{OD}_{595\text{nm}}$ usando el lector de placas iMark™ *Microplate Absorbance Reader* de Bio-Rad. Los valores de absorbancia se corrigieron restando de los cultivos, la absorbancia de los controles negativo de crecimiento. El ensayo se hizo por triplicado biológico de cada concentración de catión y cepa analizada.

5.3.5 Sobreexpresión y purificación de CtpA, CtpB y CtpV en *E. coli*

Una aproximación para la caracterización funcional de las tres posibles Cu^+ ATPasas de *M. tuberculosis* fue utilizar las enzimas puras en ensayos bioquímicos que permitan evaluar la actividad enzimática de las proteínas. Por lo tanto, se partió de recombinantes de CtpA, CtpB y CtpV expresadas en *E. coli*, y fusionadas a una etiqueta de His en sus extremos C-terminal, lo que permite su detección por ensayos de Dot-Blot y Western-Blot. Usando un anticuerpo 1º dirigido contra la etiqueta de His (*6x-His Epitope Tag Antibody Rabbit*, Thermo Scientific) y secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate*, Thermo Scientific), se evaluó el nivel de expresión de estas ATPasas de *M. tuberculosis* en *E. coli*, utilizando el sistema Pierce™ ECL *Western Blotting Substrate* (Thermo Scientific).

La expresión de CtpA y CtpB se evaluó en *E. coli* LMG194 transformada con los plásmidos recombinantes pALT20 y pALT21, respectivamente. Para el caso de CtpV, se usó la cepa *E. coli* DC194 transformada con el plásmido pALT26. Un análisis preliminar de expresión se evaluó mediante Dot-Blot. La inducción de la proteína se hizo suplementado el medio de cultivo LB con 0,05% de L-arabinosa, 37 °C, a 180 rpm de agitación y 3 horas de incubación.

Las proteínas recombinantes también se expresaron cultivando las células en medio autoinductor (A) [144] partiendo de 500 mL de medio, induciendo a 20 °C, 180 rpm y 18

h, utilizando también Dot-Blot para estimar la expresión de la proteína. Para iniciar el proceso de purificación de las proteínas, las bacterias se lisaron mediante una prensa francesa, para obtener una fracción de membrana plasmática, solubilizar las proteínas de membrana, y separarlas por cromatográfica de afinidad.

5.3.5.1 Purificación de CtpA

Para la purificación de CtpA se siguió el procedimiento descrito en [23], con ligeras modificaciones. Todo el proceso se realizó a 4°C; a partir del cultivo crecido en medio *AI* (OD_{600nm} 4,7), se colectó el pellet celular y se lavó con buffer 25 mM Tris-HCl, 100 mM KCl, pH 7,4. Las células se resuspendieron en buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM sacarosa, 1 mM PMSF) y fueron lisadas en una prensa francesa a 20.000 psi. El lisado celular se centrifugó a 8.000 xg, 4°C por 30 min, y el sobrenadante se centrifugó a 229.000 xg, 4°C por 1 hora. El pellet correspondiente a la fracción de membrana, se resuspendió y homogeneizó en buffer A (25 mM Tris-HCl pH 7, 100 mM sacarosa y 1 mM PMSF) usando un homogeneizador con pistón de vidrio. Para la solubilización de la membrana, la concentración de proteína se ajustó a 3 mg/mL en buffer B (25 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM sacarosa, 500 mM NaCl y 1mM PMSF), se añadió dodecil-β-D-maltosido 1 % (DDM; Calbiochem) y se agitó suavemente por una hora a 4 °C. La fracción sin solubilizar se removió por centrifugación a 229.000 xg, 4°C por 1 hora. La fracción soluble (sobrenadante) se incubó por 1 hora a 4°C con 1 mL de la resina Ni²⁺-NTA (Roche) pre-equilibrada con buffer B, 0,05% DDM y 5 mM imidazol. Una vez se removieron las proteínas no retenidas, la resina se lavó con buffer B*(25 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM sacarosa, 500 mM NaCl, 1 mM PMSF, 0,01% DDM y 0,01% asolectina) suplementado con concentraciones de imidazol 5 mM y 20 mM (10 mL cada lavado). La elución de la proteína de interés se realizó con buffer C (25 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM sacarosa, 1 mM DDT, 1 mM PMSF, 0,01% DDM y 0,01% asolectina) suplementado con 300 mM imidazol. La proteína eluida fue concentrada usando un Centricon de corte 50 kDa (Millipore), que a su vez permitió hacer un intercambio de buffer (buffer C sin imidazol) para disminuir la concentración de imidazol por debajo de 1 mM. La proteína se alicuotó y almacenó a 4°C hasta su uso. El contenido de proteína de todos los eluidos y extractos fueron cuantificados por el método de Bradford-Zor-Selinger (Bradford 1976). Las proteínas se visualizaron en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) al 10% y posterior tinción con Azul de Coomassie coloidal o Western-Blot.

5.3.5.2 Purificación de CtpB

Para la purificación de CtpB se partió de medio litro de cultivo en medio A/ (OD_{600nm} de 4,5). Una vez verificada la expresión de la proteína por Dot-Blot, las bacterias colectadas fueron lisadas, luego se aisló la membrana plasmática y extrajeron las proteínas de membrana de la bicapa lipídica con DDM al 1%, de manera similar a lo realizado con CtpA. La proteína se separó mediante cromatografía de afinidad, eluyendo con un gradiente de imidazol entre 5 y 500 mM, utilizando imidazol 150 mM y 300mM en buffer C. Las fracciones de 150 mM y los dos primeros volúmenes con 300 mM donde eluye CtpB, fueron mezcladas y concentradas con el Centricon de corte 50 kDa (Millipore). Al final los extractos de proteína fueron cuantificados y analizados por SDS-PAGE y Western-Blot.

5.3.5.3 Purificación de CtpV

Para la purificación de CtpV se empleó la misma metodología que CtpA y CtpB. En el caso específico de CtpV se partió de medio litro de cultivo bacteriano a un OD_{600nm} de 4,0, y se utilizó un gradiente de imidazol entre 5 y 150 mM, eluyendo con 150 mM imidazol, para separar la proteína de la columna de afinidad.

5.3.6 Ensayo de actividad *p*NPPasa de los extractos purificados CtpA, CtpB y CtpV

La actividad *p*-nitrofenil fosfatasa (*p*NPPasa) es una actividad enzimática no específica de ATPasas tipo P, que se fundamenta en la hidrólisis de monoésteres de fosfato por parte de estas enzimas [145]. Por lo que es posible verificar la integridad del extracto de proteína al evaluar su actividad fosfatasa hidrolizando el *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP). La hidrólisis enzimática del sustrato incoloro *p*NPP produce un compuesto amarillo *p*-nitrofenol (*p*NP) cuyo máximo de absorción ocurre en 410 nm con un coeficiente de extinción molar ϵ de $17000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. La actividad se reporta como nmol de *p*NPP hidrolizado por mg de proteína, por minuto de reacción (nmol *p*NPP/mg.min). Para diferenciar la hidrólisis enzimática y no enzimática del *p*NPP se hizo una comparación de la producción de *p*NP en presencia y ausencia de proteína en reacciones paralelas bajo las mismas condiciones.

Las reacciones enzimáticas se realizaron con 2 y 4 μg de proteína purificada a volumen final 50 μL . La reacción se hizo en buffer Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM con MgCl_2 3mM, NaCl 800 mM, Cys 20 mM, asolectina 0,01% y DDM 0,01%, suplementado con 3 mM de sustrato

pNPP. La reacción se inició añadiendo la enzima y se llevó a cabo por 10 minutos a 37°C. En el caso de CtpB se varió el tiempo de reacción enzimática usando 10, 20 y 30 min. La reacción se detuvo por la adición de 1 volumen de NaOH 1 M, y se midió la absorbancia a 410 nm (coeficiente de extinción molar del p-nitro fenol (pNP) ϵ 17000 M⁻¹.cm⁻¹). La actividad se reportó como nmol de pNPP hidrolizado por mg de proteína, por minuto de reacción (nmol pNPP/mg.min) [146]. Se realizaron experimentos en paralelo en ausencia de proteína para establecer el grado de hidrólisis no enzimática del pNPP.

5.3.7 Ensayo de actividad Cu⁺ ATPasa de los extractos de de CtpA, CtpB y CtpV purificados

Como parte de los ensayos para el estudio funcional de las ATPasas tipo P, se determinó la actividad ATPasa de las enzimas recombinantes. En estos ensayos, se utilizan como sustratos el ATP y el catión que puede ser transportado por la enzima; la tasa de hidrólisis de ATP se cuantifica midiendo el fosfato liberado en cada ciclo de reacción. La metodología seguida fue la descrita en [147] comparando la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) liberado en presencia y ausencia de Cu⁺.

Las reacciones enzimáticas se hicieron en un volumen final de 250 μ L; se usaron 2,5 μ g de enzima, buffer Tris-HCl (pH 7,5) 50 mM, MgCl₂ 3 mM, NaCl 200 mM, Cys 20 mM, DTT 2,5 mM, asolectina 0,01 %, DDM 0,01 %, y la concentración de CuSO₄ se varió entre 1 y 1000 μ M; en el caso de CtpB se probó con AgNO₃ 100 y 1000 μ M. La mezcla se hizo en frío, la reacción se comenzó con la adición ATP 3 mM, y se prosiguió incubando a 37 °C durante 20 min. La reacción se detuvo poniendo las muestras en hielo y añadiendo 750 μ L del reactivo de coloración (mezcla fresca de 1 volumen de molibdato de amonio 4,2% y 3 volúmenes de verde de Malaquita 0,045 %) seguido de la adición de 100 μ L de citrato de sodio 34 %. Luego las reacciones se cuantificaron midiendo la absorbancia a 660 nm. Se hizo una curva de calibración con Pi usando concentraciones de 0 a 20 μ M, las soluciones se hicieron en el mismo medio de reacción enzimática sin la adición de la enzima y catión. Para el cálculo de actividad enzimática se usó la diferencia del Pi liberado entre muestras que contienen el catión y ausencia del mismo. Partiendo de estos valores se calculó la actividad ATPasa específica de cada catión. La actividad se reporta como μ mol de Pi liberado por mg de proteína, por hora de reacción (nmol Pi. mg⁻¹.min⁻¹). Estos ensayos se hicieron por triplicado técnico.

5.3.8 Extracción de membrana plasmática

Otra de las aproximaciones para la caracterización funcional de las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* fue trabajar con proteína sobreexpresada y embebida en la membrana plasmática, la que también fue empleada en ensayos bioquímicos que permitieron evaluar la actividad enzimática de las proteínas. Se hizo la extracción de la fracción de membrana de diferentes cepas de sobreexpresión de *M. smegmatis* mc²155 y *E. coli* DC194. La metodología empleada se describe a continuación para cada una de las cepas trabajadas.

5.3.8.1 Extracción de membrana de *M. smegmatis* mc²155 sobreexpresando CtpA

El aislamiento de membrana se hizo a partir de cepas de *M. smegmatis* mc²155 transformadas con pALT4 y pMV261. Se partió de 3 L de cultivo bacteriano crecido en medio LB/Km/Tween 80 a 37°C hasta OD₆₀₀ 0,6. La expresión de las enzimas recombinantes se indujo a 45° C durante 30 min con agitación de 120 rpm. Una vez inducidas las proteínas, el pellet celular se colectó por centrifugación y se lavó dos veces con buffer A (MOPS 10 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM). En adelante el procedimiento se realizó a 4°C. Las células se resuspendieron en buffer de lisis (MOPS 10 mM (pH 7,4), EDTA 1 mM, PMSF 0,3 mM) y se lisaron mediante 5 ciclos de 1 min en un Mini Beadbeater-16 (Biospec). Los desechos celulares se removieron por centrifugación a 25.000 x g por 30 min a 4°C (Megafuge 16R, Thermo Scientific). Los sobrenadantes (fracción de membrana y citoplasmática) se centrifugaron a 100.000 x g por 90 min a 4°C (Sorvall™ WX Floor Ultra Centrifuge, Thermo Scientific). El sobrenadante se descartó y el pellet, correspondiente a la fracción de membrana plasmática se resuspendió en buffer A. La concentración de proteína en la membrana se determinó por el método de Bradford-Zor-Selinger (Bradford 1976). Las membranas se almacenaron a -20°C hasta su uso. Estas membranas fueron usadas para ensayos de actividad ATPasa.

5.3.8.2 Extracción de membrana de *M. smegmatis* mc²155 sobreexpresando CtpB

Se aisló la fracción de membrana plasmática de células de *M. smegmatis* mc²155 transformadas con pALT10 y pMV261. El aislamiento de membrana fue similar al usado para CtpA con algunas modificaciones. Se partió de 1 L de cultivo bacteriano en medio

LB/Km/Tween 80 a 37°C hasta OD₆₀₀ 0,6. La expresión de la proteína se indujo a 45 °C durante 3 horas y 80 rpm de agitación. El pellet celular se recogió por centrifugación y se lavó dos veces con buffer A. Cada gramo de pellet seco se disolvió en 2 mL de buffer de lisis (MOPS-KOH 10 mM (pH 7,4), EDTA 0,3 mM, PMSF 1 mM, y Lisozima 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Las células se lisaron mecánicamente con un Mini Beadbeater-16 (Biospec), mediante 4 pulsos de 2 minutos e incubación en hielo por 2 minutos entre pulso. Se usó el mismo protocolo de centrifugación para obtener la fracción de membrana. El pellet correspondiente a la fracción de membrana plasmática se resuspendió en buffer (MOPS-KOH 10 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM, y PMSF 1 mM). La proteína de membrana se cuantificó mediante el método de Bradford-Zor-Selinger (Bradford 1976), y posteriormente se utilizaron para ensayos de actividad ATPasa.

5.3.8.3 Extracción de membrana de *E. coli* DC194 sobreexpresando CtpV

Para el caso de la sobreexpresión de CtpV no se contó con un recombinante de sobreexpresión en micobacterias, por tanto, se hizo el análisis partiendo de la cepa *E. coli* DC194 que tiene como ventaja que la Cu⁺ ATPasa endógena (CopA) se encuentra mutada. La fracción de membrana plasmática se obtuvo a partir de células de *E. coli* DC194 transformadas con pBAD y pALT26. Se partió de 500 mL de cultivo bacteriano en medio A//Amp de un OD₆₀₀ 4,0; las bacterias se colectaron por centrifugación y se lavaron dos veces con buffer (MOPS-KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM, KCl 200 mM, MgSO₄ 10 mM). Cada gramo de pellet seco se resuspendió en 2 mL de buffer de lisis (MOPS-KOH 50 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM, KCl 200 mM, MgSO₄ 10 mM, PMSF 1 mM, y Lisozima 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos. Las células se lisaron mecánicamente con un Mini Beadbeater-16 (Biospec), mediante 3 pulsos de 2 minutos e incubación en hielo por 2 minutos entre pulsos. Se usó el mismo protocolo de centrifugación para obtener la fracción de membrana de *M. smegmatis* mc²155. El pellet correspondiente a la fracción de membrana plasmática se resuspendió en buffer (MOPS-KOH 10 mM (pH 7,4), sacarosa 250 mM, y PMSF 0,3 mM). Se determinó el contenido de proteína en las membranas, para luego ser usadas para ensayos de actividad ATPasa.

5.3.9 Ensayo de actividad ATPasa en membrana plasmática enriquecidas con CtpA, CtpB y CtpV

Dentro de la caracterización funcional de las Cu^+ ATPasas de *M. tuberculosis* planteada, se consideraron ensayos enzimáticos de actividad ATPasa, cuyo fundamento es el mismo al usado al ensayo hecho con las proteínas puras (Numeral 5.3.8), la diferencia radica que en este caso se trabajó con la fracción membrana plasmática que sobreexpresa la ATPasa y permitió determinar y comparar los parámetros cinéticos CtpA, CtpB y CtpV.

Los ensayos de actividad ATPasa se hicieron sobre fracción de membrana plasmática extraídas de tres cepas de *M. smegmatis* mc²155: transformada con pMV261, pALT4 y pALT10, para el análisis de CtpA y CtpB respectivamente; en el caso de CtpV se usó la fracción de membrana plasmática extraída de dos cepas de *E. coli* DC194: transformada con pBAD y pALT26. El ensayo de actividad consiste en determinar el fosfato (PO_4^{3-} o Pi) que es liberado por la hidrólisis de ATP producto del transporte del ión particular mediado por la ATPasa tipo $\text{P}_{1\text{B}}$, CtpA, CtpB o CtpV, u otra ATPasa afín al ión analizado. El Pi liberado se cuantificó siguiendo el método de Fiske-Subbarow [148], el que se modificó haciendo uso de citrato de bismuto que aumenta la sensibilidad del método [149]. La técnica se fundamenta en la reacción del Pi con molibdato en medio ácido para generar ácido fosfomolibdico, luego es reducido por el ácido ascórbico formando el ácido fosfomolibdico reducido que forma un complejo azul cuyo color se intensifica en presencia de bismuto y puede ser leído a 690 nm. 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 [149].

5.3.9.1 Ensayos de actividad ATPasa mediada por CtpB y dependiente de metales pesados

Los ensayos de actividad se hicieron sobre preparaciones de membrana cruda de *M. smegmatis* mc²155, estableciendo la diferencia de actividad entre las membranas sobreexpresando la proteína CtpB y membranas aisladas de la bacteria transformadas con el vector pMV261 vacío. Las reacciones enzimáticas se realizaron en un volumen final de 50 μL usando 20,0 μg de proteína de membrana en buffer de reacción (MOPS-TRIS 40 mM (pH 7,4), MgCl_2 3 mM, NaN_3 5 mM, Na_2MoO_4 0,25 mM, Cys 0,5 mM). El ensayo

también se desarrolló estimulando la reacción con los cationes Co²⁺, Cu⁺ (con DTT 2,5 mM), Cu²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Zn²⁺ a concentración final de 10 µM. Las reacciones enzimáticas se iniciaron por la adición de 1 mM Na₂ATP. Se incubaron a 37°C por 30 min y se detuvieron por adición de 100 µL de solución de parada (3% ácido ascórbico; 0,5% molibdato de amonio; 3% SDS; 2 M HCl). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 min, se adicionó 150 µL de solución de estabilización (3,5% citrato de bismuto; 3,5% citrato de sodio; 2 M HCl) y se incubó por 10 min adicionales a 37°C. Los valores de OD₆₉₀ se determinaron usando el lector de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad. Los valores de absorbancia se corrigieron restando la absorbancia de los controles, que en este caso se utilizaron reacciones idénticas donde el ATP se agregó luego de la solución de parada. Cada ensayo se realizó en triplicado técnico y duplicado biológico. La actividad ATPasa se reporta como nmol de fosfato liberado por mg de proteína por minuto de reacción (nmol Pi. mg⁻¹.min⁻¹).

5.3.9.2 Determinación de parámetros cinéticos de CtpB

Los parámetros cinéticos de CtpB hacen parte de los ensayos planteados en la caracterización funcional de la enzima. Al comparar los parámetros cinéticos de CtpB con los conocidos para las otras Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*, se podría hacer un acercamiento a la posible función de esta enzima.

En la determinación de parámetros cinéticos se tomó como base la reacción enzimática a las siguientes condiciones: membrana 20 µg, MOPS-TRIS 40 mM (pH 7,4), MgCl₂ 3 mM, NaN₃ 5 mM, Na₂MoO₄ 0,25 mM, Cys 0,5 mM, DTT 2,5 mM, Na₂ATP 3 mM, 37 °C y 30 min; a partir de estas condiciones se hizo la variación del parámetro a determinar. La cantidad óptima de proteína se determinó variando la proteína adicionada entre 5 y 40 µg. El pH óptimo se estableció variando el pH de las reacciones enzimáticas desde 5,5 hasta 9,0 (MES-KOH para pH 5,5 y 6,2; MOPS-KOH para pH 6,8 y 7,4; y Tris-HCl para pH 8 y 9). El tiempo y la temperatura de reacción se optimizaron en el rango de 10 – 120 min y 4 – 60 °C, respectivamente. La concentración óptima de Cys se evaluó desde 0,1 hasta 10 mM. La cinética enzimática se realizó bajo condiciones óptimas de reacción variando la concentración de Cu⁺ de 0,25 a 10 µM. El método de detección fue el mismo empleado en los ensayos de actividad dependiente de metales pesados. En todos los casos la actividad atribuida a CtpB se calculó como la diferencia entre la actividad de las vesículas de membrana de células recombinantes y la actividad de vesículas aisladas de las células

transformadas con el vector pMV261 vacío (control). Los valores de K_m y V_{max} se calcularon utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

5.3.9.3 Efecto de Cys en la actividad Cu^+ ATPasa de CtpA

Adicional a los parámetros cinéticos de CtpA previamente obtenidos [150], se evaluó el efecto que tiene la Cys en la actividad ATPasa de la enzima, con el fin de conocer el efecto que tiene este aminoácido con el transporte de Cu^+ al formar un complejo con el metal. Estos ensayos de actividad también se hicieron sobre preparaciones de membrana cruda de *M. smegmatis* mc²155, estableciendo la diferencia de actividad entre membranas sobreexpresando la proteína CtpA y membranas a partir de bacterias transformadas con el vector pMV261 vacío. Se evaluaron diferentes concentraciones de Cys de 0 hasta 20 mM. Las reacciones enzimáticas (50 μL) se realizaron en placas de 96 pozos usando 4,0 μg de proteína de membrana en un medio de reacción compuesto por un buffer MOPS 100 mM (pH 7,5) suplementado con DTT 2,5 μM , MgCl_2 3 mM, Brij-58 0,02 %, y CuCl_2 10 μM . Las reacciones enzimáticas se iniciaron por la adición de Na_2ATP 3,5 mM. Se incubaron a 37°C por 30 min y se detuvieron por adición de 100 μL de solución de parada (ácido ascórbico 3 %, molibdato de amonio 0,5 %, SDS 3 %, y HCl 0,5 M). Las muestras se mantuvieron en hielo durante 10 min, se agregaron 150 μL de solución de estabilización (citrato de bismuto 3,5 %; citrato de sodio 3,5 %; HCl 2 M) y se incubó por 15 min adicionales a 37 °C. Los valores de absorbancia a 690 nm se determinaron usando el lector de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad. Estos valores se corrigieron restando la absorbancia de los controles (reacciones idénticas donde el ATP se agregó luego de la solución de parada). Cada ensayo se realizó en triplicado técnico y duplicado biológico. La actividad ATPasa se reporta como nmol de fosfato liberado por mg de proteína por minuto de reacción ($\text{nmol Pi. mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$).

5.3.9.4 Determinación de parámetros cinéticos de CtpV

Como parte de la caracterización funcional de CtpV se consideró la determinación de los parámetros cinéticos de la enzima, lo que permitiría tener un acercamiento a la función que puede cumplir esta enzima.

Al determinar los parámetros cinéticos de CtpV, se midió la actividad Cu⁺ ATPasa de membranas plasmáticas de *E. coli* DC194 enriquecidas con esta enzima. Para conocer la contribución de CtpV, a la actividad enzimática de las membranas obtenidas de la cepa transformada con pALT26, se descontó la actividad de las membranas de la cepa transformada con el vector pBAD vacío.

Para la determinación de la cinética enzimática de CtpV se hizo la reacción enzimática en las siguientes condiciones: membrana 20 µg, MOPS-KOH 40 mM (pH 7,4), MgCl₂ 3 mM, NaN₃ 5 mM, Na₂MoO₄ 0,25 mM, Cys 0,5 mM, DTT 2,5 mM, Na₂ATP 3 mM, 37 °C y 30 min. La reacción también se desarrolló variando la concentración de Cu⁺ de 10 a 500 µM. El método de detección fue el mismo empleado en los ensayos de actividad dependiente de metales pesados; en todos los casos la actividad atribuida a CtpV se calculó como la diferencia entre la actividad de las vesículas de membrana de células recombinantes y la actividad de vesículas aisladas de las células transformadas con el vector pBAD vacío (control). Los valores de K_m y V_{max} se calcularon utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com.

5.3.10 Extracción de vesículas evertidas de membrana de *E. coli* sobreexpresando Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*

La extracción se hizo siguiendo la metodología descrita en Gonzales-Guerrero [151] partiendo de células de *E. coli* DC194 transformadas con pALT20, pALT21 y pALT26 que expresan CtpA, CtpB y CtpV, respectivamente. Se partió de 250 mL de cultivo bacteriano en medio A//Amp con un OD_{600 nm} cercano a 4,0. El pellet celular se colectó por centrifugación y se lavó dos veces con buffer de lavado (MOPS-KOH 25 mM (pH 7,0), y KCl 100 mM) usando 10 mL por gramo de pellet. Cada gramo de pellet seco se resuspendió en 5 mL de buffer de sacarosa (MOPS-KOH 50 mM (pH 7,0), sacarosa 250 mM, KCl 200 mM, y MgSO₄ 10 mM) y se trató con Lisozima 1 mg/mL incubando a 37 °C, 200 rpm por 1 hora. Las células se lisaron en una prensa francesa a 10.000 psi. El lisado celular se centrifugó dos veces a 12.000 xg, 4°C manteniendo el sobrenadante en cada centrifugación. El sobrenadante se centrifugó a 160.000 xg, 4°C por 90 min. El pellet que corresponde a las vesículas evertidas de membrana fue resuspendido en buffer sacarosa con PMSF 0,3 mM, con ayuda de un homogeneizador con pistón de vidrio.

La determinación del contenido de las Cu⁺ ATPasas en las vesículas se hizo detectando la proteína por inmunofluorescencia. Al ser proteínas de fusión con una etiqueta de His y haciendo uso de anticuerpos que la reconocen, se usó de la técnica de Dot-Blot. Como patrón se empleó TEV fusionado a la misma etiqueta puro de concentración de proteína conocida. Se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de TEV; la intensidad de los puntos correspondientes al patrón y las muestras se midió por densitometría usando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). Una vez determinado el contenido de proteína estas vesículas evertidas de membrana fueron usadas para ensayos de transporte de Cu⁺.

5.3.11 Transporte de Cu⁺ de CtpA, CtpB y CtpV en vesículas evertidas de membrana

Otro de los análisis funcionales planteados para evaluar la actividad enzimática de CtpA, CtpB y CtpV, fue evaluar el transporte de Cu⁺ a través de vesículas evertidas enriquecidas con las Cu⁺ ATPasas. El ensayo se encaminó en determinar el comportamiento de la tasa de transporte del catión en la vesícula que es mediado por los transportadores evaluados.

Los ensayos de transporte de transporte de Cu⁺ se hicieron usando vesículas evertidas de membrana de *E. coli* DC194 (*E. coli* LMG194 $\Delta copA$, deficiente Cu⁺ ATPasa endógena) enriquecidas con *EcCopA*, CtpA, CtpB o CtpV. La metodología que se siguió fue adaptada de González-Guerrero y colaboradores [151]. Como método de detección de Cu⁺ dentro de las vesículas se usó espectroscopia de absorción atómica usando una atomización con horno de grafito (AAS-GF, por sus siglas en inglés).

Las reacciones enzimáticas se hicieron con 1 μ g de proteína en un volumen de 100 μ L en buffer MOPS-KOH 50mM (pH 7,3), MgCl₂ 3 mM, NaCl 400 mM, Cys 20 mM y ácido ascórbico 2,5 mM, CuSO₄ a diferente concentración (1, 10, 100 y 1000 μ M). Las reacciones se precalentaron durante 1 min a 37 °C, Y se inició mediante la adición de Na₂ATP 3 mM, después se incubó a 37 °C durante 30 minutos. Para el caso específico de las vesículas enriquecidas con *EcCopA*, se hicieron variaciones de parámetros como cantidad de proteína (3 y 11 μ g) y tiempo de reacción enzimática (10, 20 y 30 min). Para detener la reacción enzimática la mezcla se pasó a través en un filtro de nitrocelulosa de 0,20 μ m, y las vesículas fueron lavadas con 2 mL de buffer MOPS-KOH 50mM (pH 7,3),

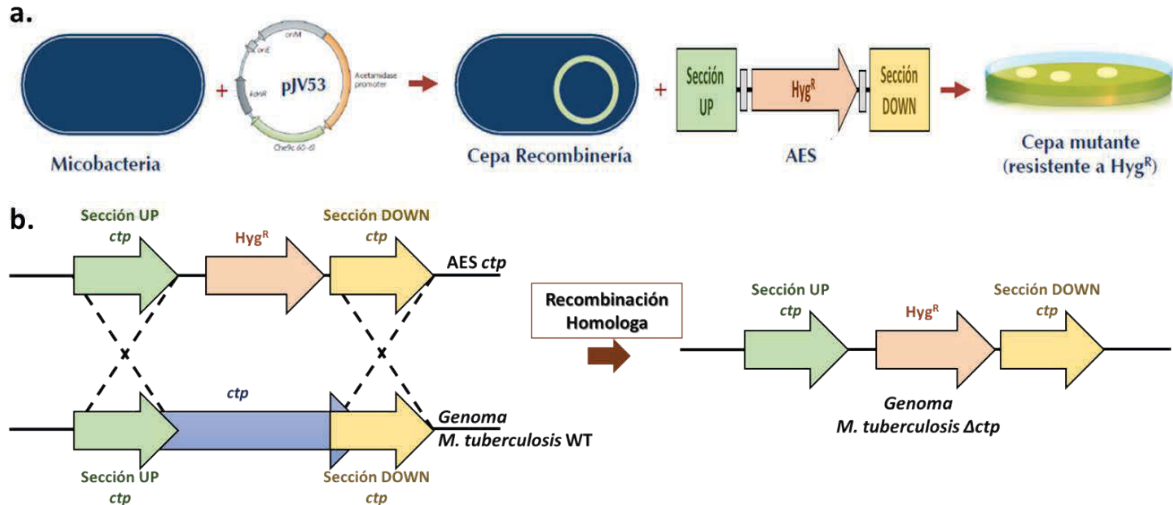
MgCl₂ 3 mM, NaCl 400 mM, Cys 20 mM y ácido ascórbico 2,5 mM. El filtro fue mineralizado con 250 µL de HNO₃ fumante (calidad trazas de metales), la digestión se realizó a 80 °C durante una hora y a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente se adicionaron 20 µL de H₂O₂ 30 %. Finalmente, las muestras se diluyeron hasta 1 mL con HNO₃ 2% y el contenido de Cu fue analizado por AAS-GF en el equipo PinAAcle 900Z (PerkinElmer) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como diluyente se utilizó HNO₃ 2% (v/v) preparado en agua 18,2 MOhm.cm. Se utilizaron 4 estándares de Cu (10, 25, 50 y 100 ppb) preparados a partir del stock de Cu para AAS de 1000 ppm (Acros Organics) y el mismo disolvente. La longitud de onda de trabajo fue 324,75 nm y el programa de temperatura del horno de grafico fue: 110 °C x 30 s, 130 °C x 30 s, 1200 °C x 20 s, 2000 °C x 5 s, y 2450 °C x 3 s. La actividad de transporte de Cu⁺ se reporta como nmol de Cu⁺ dentro de la vesícula por mg de proteína por minuto de reacción (nmol Cu⁺. mg⁻¹.min⁻¹).

5.3.12 Construcción de mutantes defectivos de *M. tuberculosis*

Los ensayos anteriores que hacen parte de la caracterización funcional de CtpA y CtpB, se basaron en sistemas de sobreexpresión de las enzimas. Para complementar, se planteó la construcción de mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra defectivos en los genes de estas ATPasas, que posteriormente puedan ser usados en ensayos fenotípicos que corroboren la función de estas enzimas.

La metodología escogida para construir mutantes defectivos fue mediante la técnica de recombinación. Esta estrategia se basa en un intercambio alélico mediado por proteínas de recombinación codificadas por micobacteriófagos, con el fin de reemplazar el gen a mutar por un casete de resistencia higromicina (*Hyg*^R) [152]. El esquema de la estrategia experimental se muestra en la Figura 5-3. Inicialmente se construyó una cepa de recombinación encargada de expresar las proteínas de recombinación, en este caso se trata de una cepa de *M. tuberculosis* H37Ra transformada con el plásmido pJV53. La expresión de las proteínas Gp60 (exonucleasa) y Gp61 (recombinasa) del micobacteriófago Che9c está controlada por un promotor de acetamida. Una vez inducidas las proteínas se transformó un sustrato de intercambio alélico (AES) que permite el proceso de recombinación para reemplazar el gen a mutar por un casete *Hyg*^R. El AES consiste en un ADN de doble cadena lineal cuya secuencia tiene en un casete *Hyg*^R flanqueado por secuencias homologas de las regiones corriente arriba y abajo del gen a mutar.

Figura 5-3: Estrategia para la construcción de mutantes defectivos en *M. tuberculosis*. a. Esquema de obtención de mutantes defectivos en genes por la técnica de recombinación. b. Diagrama del proceso de recombinación entre el AES y el gen a mutar localizado en el genoma.

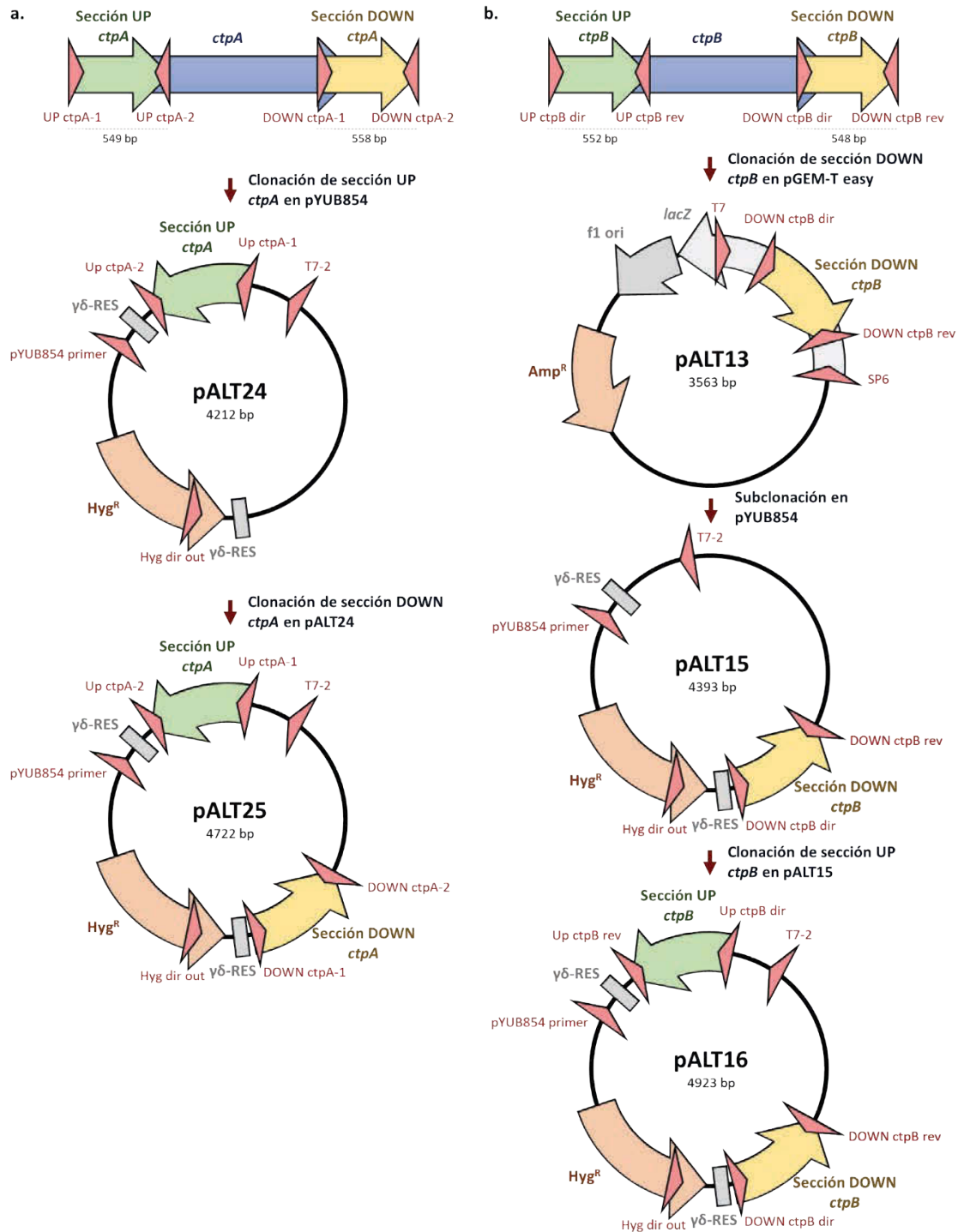


Para la obtención de la cepa de recombinación, células de *M. tuberculosis* H37Ra cultivadas en medio Middlebrook 7H9-OADC hasta fase exponencial (OD_{600nm} de 0,5) se trataron con glicina 0,2 M durante 24 h previas a la preparación de las células electrocompetentes. Estas últimas se electroporaron con el plásmido pJV53 y los recombinantes se seleccionaron en placas de Middlebrook 7H10-OADC/Km. La verificación de las colonias recombinantes se realizó por PCR de colonia usando iniciadores dirigidos hacia el casete de resistencia a Km (Tn903A y Tn903B).

5.3.12.1 Construcción de sustrato de intercambio alélico (AES)

Para la construcción de los AES usados en el presente trabajo se siguió la estrategia de la doble clonación de las regiones flanqueantes del gen a mutar en el vector pYUB854, que posee un cassette *Hyg^R* flanqueado por sitios $\gamma\delta$ resolvable y sitios múltiples de clonación (MCS). La estrategia metodológica para la construcción de los AES de *ctpA* y *ctpB* se describen en la Figura 5-4.

Figura 5-4: Estrategia para la construcción de AES de *ctpA* y *ctpB*. Procedimiento para la obtención del AES por múltiples clonaciones usando el vector pYUB854 como donante del casete de *Hyg^R*. a. Esquema para la construcción del plásmido recombinante pALT25 que contiene el AES de *ctpA*. b. Esquema para la construcción del plásmido recombinante pALT16 que contiene el AES de *ctpB*.



En el caso del AES de *ctpA* el producto de la doble clonación es el plásmido recombinante pALT25. La estrategia empleada para la construcción del plásmido pALT25 se describe en la Figura 5-4a. Inicialmente se amplificó la región corriente arriba de *ctpA* (o sección up). El producto de PCR se clonó en el vector pYUB854 entre los sitios de restricción *Bsp*HI y *Kpn*I, generando el plásmido recombinante pALT24, que fue transformado en células

termocompetentes de *E. coli* HB101 y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/hyg. La colonia positiva fue confirmada por PCR usando los iniciadores pYUB854 primer y Up ctpA-1. A partir de la colonia 1 se hizo la extracción del plásmido recombinante y se verificó el tamaño cortando con las dos enzimas de restricción necesarias para hacer la segunda clonación de la sección corriente debajo de *ctpB* (o sección down). La segunda clonación de la sección down se hizo entre los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* del plásmido pALT24, para generar un nuevo plásmido recombinante nombrado como pALT25. La transformación del producto de ligación se hizo en células electrocompetentes de *E. coli* HB101 y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas de LB/agar/Hyg. Se seleccionaron 3 colonias para la extracción y mapeo de restricción de sus plásmidos recombinantes. Se seleccionó la colonia 1 para analizar por PCR usando los iniciadores Hyg dir out y DOWN ctpA-2. Finalmente, los plásmidos construidos fueron secuenciados para verificar la integridad de los constructos. El AES de *ctpA* se obtuvo mediante digestión doble de pALT25 (extraído de la colonia 1) con las enzimas *XhoI* y *BspHI*.

El AES de *ctpB* está contenido en el plásmido recombinante pALT16 (Figura 5-4b). Para la construcción del plásmido pALT16, inicialmente se amplificó la región corriente abajo de *ctpB* (o sección down). El producto de PCR se clonó en el vector pGEM-T easy para generar el plásmido pALT13 el cual fue transformado en células termocompetentes de *E. coli* DH5 α y las bacterias transformantes se seleccionaron sobre placas de LB/agar/amp. Las colonias positivas fueron seleccionadas por PCR usando los iniciadores T7 y DOWN *ctpB*-rev. A partir de las colonias positivas 2 y 4 se extrajeron los plásmidos recombinantes y se verificaron por mapeo de restricción. Se seleccionó el plásmido recombinante de la colonia 4 para hacer la subclonación en el plásmido pYUB854 entre los sitios *HindIII* y *XhoI*, generando el plásmido pALT15. El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* HB101 y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas de LB/agar/Hyg. Se eligieron 4 colonias, a las que se extrajo y se realizó mapeo de restricción de sus plásmidos recombinantes. Se tomó el plásmido de la colonia 3 para continuar con la segunda clonación con la región corriente arriba de *ctpB* (o sección UP) entre los sitios *AvrII* y *XbaI*, para generar el plásmido recombinante pALT16. Al igual que en la clonación anterior se hizo la misma selección de las bacterias, se analizaron 4 colonias por PCR usando los iniciadores pYUB854 primer y UP *ctpB*-dir. A partir de las colonias 1, 2 y 4 se analizaron sus plásmidos por mapeo de restricción. Finalmente, todos

los plásmidos construidos fueron secuenciados para verificar la integridad de los constructos. El AES de tamaño de 2987 bp se obtuvo por digestión de pALT16 (extraído de la colonia 2) con las enzimas de restricción *Xho*I y *Avr*II.

5.3.12.2 Obtención de mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra Δ ctpA y Δ ctpB

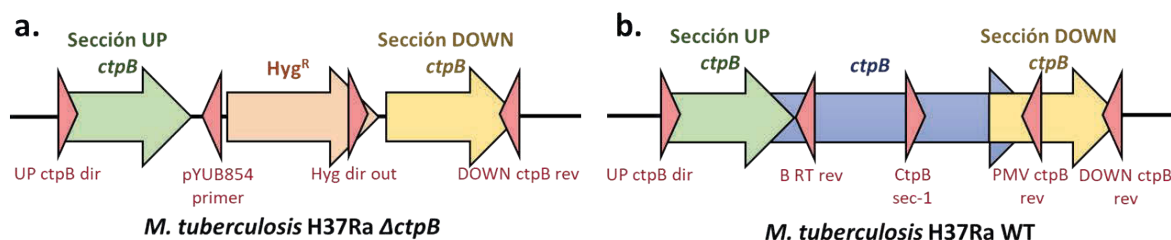
El paso final para la obtención del mutante por sustitución de *M. tuberculosis* H37Ra Δ ctpA o Δ ctpB es la transformación del AES en la cepa de recombinería inducida con acetamida al 0,2 %. En este paso se siguió la metodología sugerida por Van Kessel [152] con modificaciones como el medio de cultivo para el masivo de la cepa de recombinería, se usó 7H9-OADC-Km-Chx-Tween 80 suplementado con succinato 0,2 %. Cuando el masivo llegó a un OD_{600nm} de 0,6 se indujo la expresión de las proteínas de recombinación con acetamida al 0,2 %, y como segunda modificación se adicionó glicina 1,5 %, la mezcla se incubó 37°C y 80 rpm de agitación durante 18 h. En la transformación se aumentó la cantidad de AES transformado, en este caso se emplearon 200 ng en vez de 100 ng de ADN, luego del pulso se dejaron recuperar las células en medio líquido 7H9-OADC por 24 h a 37 °C y 80 rpm. Las células se plaquearon en 7H11-OADC-Km-Chx-Hyg (50 µg/mL) y se incubaron hasta la aparición de colonias.

5.3.12.3 Comprobación del genotipo mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ ctpB

A partir de las 8 colonias de *M. tuberculosis* H37Ra con el fenotipo resistente a Hyg se hicieron cultivos en medios líquidos y se extrajo el ADN genómico, que fue usado como molde para las PCR de comprobación del genotipo mutante. El esquema de análisis por PCR se ilustra en la Figura 5-5. El primer análisis que permite evidenciar la presencia del gen de resistencia a Hyg en la región genómica de *ctpB*, donde debió ocurrir la sustitución. Se usaron dos juegos de iniciadores que anillan en el casete de Hyg^R y en la región corriente arriba o abajo de *ctpB*. El primer juego de iniciadores son UP *ctpB* dir y pYUB854 primer amplifican un fragmento de 766 bp, y el segundo juego de iniciadores (DOWN *ctpB* rev y Hyg dir out) amplifica un producto de 808 bp. Para confirmar el genotipo mutante es necesario demostrar la ausencia del gen *ctpB* en el genoma. En este caso la mutación se indica por ausencia de un producto de PCR al usar los tres diferentes juegos de iniciadores que anillan en la parte interna y externa del gen. Se usaron tres juegos de iniciadores UP *ctpB* dir/B RT rev, CtpB sec 1/PMV *ctpB* rev, y CtpB sec 1/DOWN *ctpB* rev. En todas las PCR se analizaron las tres posibles colonias mutantes en *ctpB* (Δ ctpB) y como control ADN

genómico de *M. tuberculosis* H37Ra cepa silvestre (WT) y el plásmido pALT16 que contiene el AES de *ctpB* (AES), los controles fueron seleccionados de tal manera que el primero comprueba la presencia del gen y el segundo la mutación del mismo.

Figura 5-5: Comprobación del genotipo mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB*. a. Esquema de la región del genoma de *M. tuberculosis* H37Ra donde ocurrió la sustitución de *ctpB* por el casete de Hyg, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR positivas en colonias mutantes). b. Región genómica de *ctpB* en *M. tuberculosis* H37Ra, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR negativas en colonias mutantes).



5.3.13 Ensayos fenotípicos del mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB*

Estos ensayos se hacen como parte de la caracterización funcional de CtpB, ellos son complementarios a los resultados obtenidos de la sobreexpresión de la proteína, y buscan en conocer el efecto que tiene la mutación del gen *ctpB* en el crecimiento y acumulación de Cu en la bacteria.

5.3.13.1 Ensayo de toxicidad de Cu^{2+} en células de *M. tuberculosis* defectivas en el gen *ctpB*

El ensayo fenotipo se hace para conocer el efecto que tiene la mutación del gen *ctpB* en el crecimiento de *M. tuberculosis* H37Ra frente a concentraciones tóxicas de Cu^{2+} . Para ello se compara el crecimiento de la cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* y la cepa silvestre en presencia del metal. La metodología empleada es similar a la usada en la determinación de la CMI de *M. tuberculosis* frente a metales pesados (Numeral 5.1.1), con las siguientes diferencias: se evaluó el crecimiento bacteriano solo en presencia de CuSO_4 , se compararon dos cepas y se modificó el volumen de cultivo.

El ensayo se hizo tubos Falcon de 15 mL en un volumen final de 3 mL. Se partió de un cultivo en fase exponencial, el que se diluyó en medio Sauton modificado hasta obtener una OD_{595nm} de 0,05 en cada tubo. A continuación, se realizaron diluciones de CuSO₄ (5 a 100 µM). Como control positivo, se utilizó un cultivo en ausencia de catión, y como control negativo de crecimiento, se utilizó un cultivo suplementado con isoniazida (INH) 1 µg/mL. Los tubos fueron incubados a 37 °C por 3 semanas, posteriormente el crecimiento bacteriano se estimó midiendo la OD_{595nm} usando un lector de placas iMark™ Microplate Absorbance Reader de Bio-Rad. Los valores de absorbancia se corrigieron restando la absorbancia del control negativo de crecimiento. El ensayo se hizo por triplicado biológico de cada concentración de catión y cepa.

Adicionalmente se hizo un ensayo de crecimiento de en medio sólido 7H11-OADC suplementado con CuSO₄ (0, 25 y 100 µM). Para este ensayo se partió de un cultivo crecido en fase exponencial de cada cepa (OD_{600nm} de 0,5), se hicieron seis diluciones seriadas en base 10 del cultivo en medio Sauton modificado, hasta a una dilución 10⁻⁶; luego se sembraron puntos de 5 µL de cada dilución en las placas de medio sólido, que fueron incubadas a 37 °C por 3 semanas. Este ensayo se hizo por replica biológica para cada cepa de trabajo y concentración de metal.

5.3.13.2 Acumulación de Cu⁺ en células de *M. tuberculosis* defectivas en *ctpB*

Dentro de la caracterización fenotípica del mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* se propuso un análisis de acumulación de Cu en células completas. Este ensayo consiste en intoxicar las células con CuSO₄ y determinar el contenido del catión intracelular post intoxicación, comparando los valores obtenidos en la cepa mutante y la cepa silvestre.

El ensayo se hizo a partir de 100 mL de cultivo de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* y *M. tuberculosis* H37Ra WT, crecidos en medio 7H9-OADC-Tween 80 a 37 °C hasta OD_{600nm} 0,5. Las células fueron colectadas por centrifugación, lavadas 3 veces con 1 volumen de medio Sauton modificado y resuspendidas en 30 mL del mismo medio. La suspensión celular se alicuotó en volúmenes de 5 mL, a la mitad de las muestras se les hizo una intoxicación con CuSO₄ 50 µM y la otra mitad se usó como control de no adición de catión. Se hizo una incubación a 37 °C y 80 rpm de agitación durante 3 horas. Luego las células fueron colectadas por centrifugación y lavadas 4 veces con 1 volumen de NaCl 150 mM. El pellet final fue secado a 37°C durante 24 horas y se determinó su peso seco. Luego las

células fueron mineralizadas con 500 μL de HNO_3 fumante (calidad ultrapura, Merk), la digestión se realizó a 80 $^\circ\text{C}$ durante una hora y a temperatura ambiente durante una noche. Posteriormente se adicionaron 20 μL de H_2O_2 30 %. Finalmente, el contenido de Cu en las muestras fue determinado por AAS-GF en el equipo contraAA® 800 D (Analytikjena) siguiendo las instrucciones del fabricante. Como diluyente se utilizó HNO_3 0,5 %. Se utilizaron 7 estándares de Cu (4, 10, 20, 40, 60, 80 y 100 ppb) preparados a partir del stock de Cu para AAS de 1000 ppm (Acros Organics) y en mismo disolvente. Se usó como modificador 5 μL de $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 0,1 %/ $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ 0,05%. La longitud de onda de trabajo fue 324,754 nm y la temperatura de pirolisis fue 1100 $^\circ\text{C}$ y atomización a 1500 $^\circ\text{C}$. La acumulación de Cu^+ se reporta como μg de Cu^+ acumulado por g de pellet celular seco (μg Cu^+ . g^{-1}), y se restó el valor obtenido de la muestra control. El ensayo se hizo con tres replicas biológicas biológica para cada cepa de trabajo y su respectivo control.

6. Resultados y Discusión

Inicialmente el estudio de la regulación transcripcional las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, permitió hacer un acercamiento a su posible función bajo ciertas condiciones de estrés similares a las que *M. tuberculosis* enfrenta durante la infección.

Aunque inicialmente se consideró evaluar el comportamiento transcripcional para todas las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, el estudio posteriormente se enfocó en las tres posibles Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* (CtpA, CtpB y CtpV), las que fueron caracterizándolas funcionalmente. Los resultados de esta caracterización permitieron postular su posible papel diferencial en la célula, repartido entre la desintoxicación del metal y posiblemente la entrega del cofactor a enzimas involucradas en la respuesta de estrés.

6.1 Respuesta de las ATPasas tipo P_{1B} a condiciones de estrés

Análisis bioinformáticos previos nos permitieron sugerir los posibles cationes que pueden ser transportados por las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*; específicamente estas enzimas serían capaces de transportar principalmente Cu⁺, Zn²⁺ y Co²⁺ [150]. Nuestras predicciones mostraron que CtpA, CtpB y CtpV posiblemente transportarían Cu⁺, CtpC y CtpG transportarían Zn²⁺, y CtpD y CtpJ transportarían Co²⁺ [150]. Actualmente, algunos estudios muestran que cationes como Co²⁺, Cd²⁺, Cu⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺ y Zn²⁺ son transportados por ATPasas tipo P_{1B}, subclasificándolas en los subgrupos P_{1B-1}, P_{1B-2}, P_{1B-3} y P_{1B-4}.

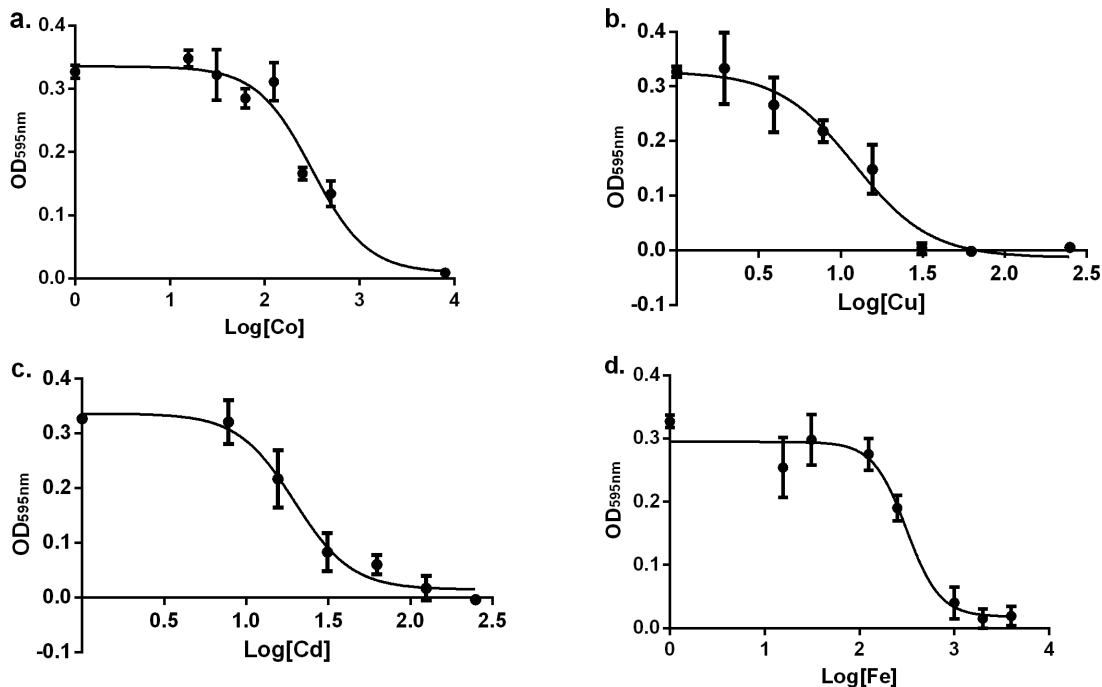
Para indagar como estas enzimas están involucradas en el proceso de infección de *M. tuberculosis*, en el presente trabajo se evaluó su respuesta a nivel transcripcional bajo diferentes condiciones de estrés. Se tuvieron en cuenta condiciones propias del ambiente

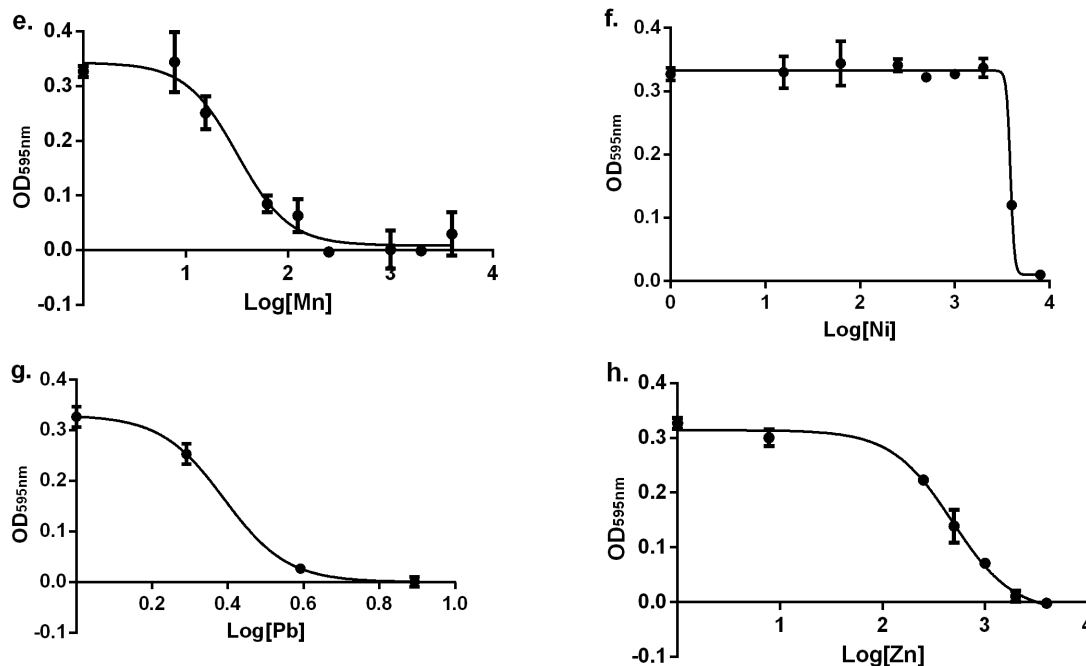
fagosomal bacteriano como la presencia de diferentes metales pesados; además de los cationes descritos como sustrato de estas enzimas, y que no se han relacionado dentro del fagosoma. Adicional a los cationes, se tuvieron en cuenta sustancias que causan estrés oxidativo (como H₂O₂, terbutilhidroperóxido, y KCN) y nitrosativo (como nitroprusiato de sodio). La respuesta transcripcional también se estudió en hipoxia o baja tensión de oxígeno, condición que se da cuando la micobacteria se encuentra en un estado latente.

6.1.1 Selección de condiciones de estrés que *M. tuberculosis* enfrenta durante la infección

Para el estudio con cationes de metales pesados se usaron concentraciones subletales con el fin de saber cuáles ATPasas podrían estar involucradas en procesos de desintoxicación de metal. Estas concentraciones se tomaron de los resultados obtenidos de los ensayos de toxicidad de *M. tuberculosis* frente a cationes de Co²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Fe³⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺ (Figura 6-1).

Figura 6-1: Ensayo de toxicidad de *M. tuberculosis* frente a metales pesados. El resultado del ensayo de toxicidad de *M. tuberculosis* H37Ra se hizo con diferentes cationes: **a.** Co²⁺, **b.** Cu²⁺, **c.** Cd²⁺, **d.** Fe³⁺, **e.** Mn²⁺, **f.** Ni²⁺, **g.** Pb²⁺, y **h.** Zn²⁺. La viabilidad se determinó por medidas de OD_{595nm}. Los valores del 50 % de crecimiento bacteriano se calcularon utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas.





Como concentraciones subletales, se consideraron como aquellas donde crece más del 50% de la población bacteriana, por lo que fue necesario determinar esta concentración en la que crece el 50% (Tabla 6-1). Por otra parte, el valor de CMI se consideró como la concentración de catión capaz de inhibir el crecimiento bacteriano detectable (OD_{595nm} de 0) [153]. También se consideraron las concentraciones de los metales reportadas dentro los fagosomas de macrófagos infectados con *M. tuberculosis* [10]. Todos estos valores se muestran en la Tabla 6-1, y considerados en los ensayos de intoxicación para el análisis transcripcional.

Tabla 6-1: Concentración subletal, CMI, y concentración de cationes de metales pesados en el fagosoma de *M. tuberculosis*. Se reportan los valores de concentración subletal (en la que crece el 50% de la población bacteriana), CMI y concentraciones de metales pesados en el interior del fagosoma de *M. tuberculosis*. Los valores del 50 % de crecimiento bacteriano fueron calculados con el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Los valores de concentración fagosomal fueron sacados de [10] en algunos de ellos se muestran los rangos de concentración, porque estos varían durante el progreso de la infección. En algunos metales la concentración no ha sido reportada (ND).

Catión	Cd	Co	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn
Concentración subletal	40 μ M	3,5 mM	20 μ M	410 μ M	213 μ M	2,9 mM	2,5 μ M	480 μ M

CMI	125 μM	8 mM	31 μM	2 mM	1 mM	8 mM	4 μM	2 mM
Concentración fagosomal	ND	ND	25-426 μM	135-2680 μM	17 mM	ND	ND	38-459 μM

Los ensayos de toxicidad de *M. tuberculosis* frente a metales pesados mostraron que las concentraciones fagosomales de Cu, Fe y Mn también son tóxicas para la célula, las que en este trabajo se encontraron por encima del CMI (Tabla 6-1). Esto también sugiere que *M. tuberculosis* dentro del macrófago posee mecanismos adicionales que le dan una mayor tolerancia a concentraciones tóxicas de metales pesados. Hay que tener en cuenta que la desviación reportada de concentración intrafagosomal de metales es muy alta pudiéndose alejar del contenido real del metal en el fagosoma; adicionalmente hay que considerar que el ensayo determina el contenido total del metal, que incluye libre y acomplejado por moléculas como proteínas [10], y en el caso del ensayo de CMI solo se tiene en cuenta el metal libre.

Teniendo en cuenta los valores de concentraciones subletales y las concentraciones intrafagosomales de los cationes, entonces se eligieron las siguientes concentraciones de sales para el análisis transcripcional: CdCl₂ (10, 25 y 40 μM), CoCl₂ (0,45, 2 y 3,5 mM), CuSO₄ (20, 50 y 500 μM), Fe₂(SO₄)₃ (0,2, 0,41 y 2 mM), MnSO₄ (0,2, 0,4, 1 y 15 mM), NiSO₄ (0,6, 1 y 2,5 mM), Pb(NO₃)₂ (2,5 μM) y ZnSO₄ (40, 200 y 500 μM).

Otra de las condiciones de estrés que tiene *M. tuberculosis* soportar cuando reside en el fagosoma, es la producción de ROS y RNS que son capaces de causar un estrés oxidativo y nitrosativo para la bacteria. Para simular estrés oxidativo se emplearon las sustancias H₂O₂, tert-butil hidroperóxido (tBuOOH) y KCN, siendo el primero un peróxido, el segundo un peróxido orgánico y el tercero quien aporta el ion CN⁻ que interfiere en la cadena de transporte de electrones en la respiración aerobia. Para generar estrés nitrosativo se utilizó nitroprusiato de sodio (Na₂[Fe(CN)₅NO]), que funciona como donador de óxido nítrico. Las sustancias para estrés redox se trabajaron a una concentración de 1 mM, la que había sido empleada en análisis transcripcionales previos [50], y estas concentraciones para los peróxidos y óxido nítrico son subletales para *M. tuberculosis* [154] y en el caso de KCN esta concentración es adecuada para inhibir la oxidación del NADH en la cadena respiratoria [155].

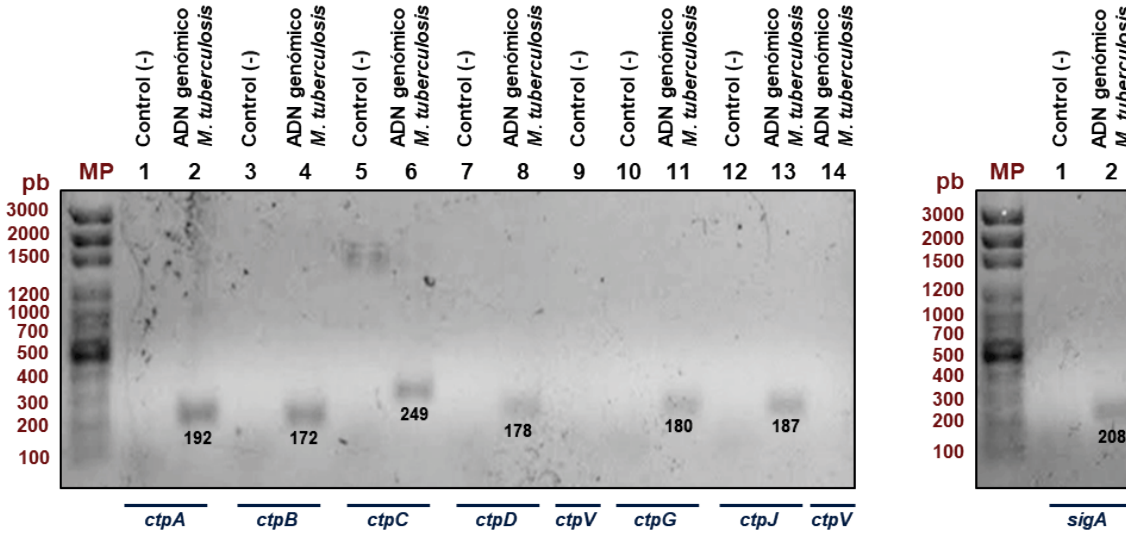
Otra condición de estrés a las que *M. tuberculosis* debe enfrentarse durante la infección es la hipoxia o baja tensión de oxígeno que existe en los granulomas y se da cuando la micobacteria se encuentra en un estado latente. El modelo de Wayne y Hayes produce un agotamiento gradual de oxígeno en el medio, donde las bacterias entran en un estado persistente no replicativo (NRP) simulando el ambiente del bacilo tuberculoso dentro del granuloma. Para este estudio se dejó a que se llegara a un estado NPR-2 que se caracteriza por presentar un estado de microanaerobiosis. El contenido de oxígeno en el cultivo se controló mediante la desaparición total de la tonalidad azul dada por azul de metileno añadido, lo que indica agotamiento o ausencia de oxígeno [115].

Las anteriores condiciones fueron usadas para evaluar la respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}, cuando los cationes, ROS y RNS están presentes y se comparan con un control de ausencia de la sustancia de estrés; la hipoxia se comparó con la actividad transcripcional mostrada por cultivos realizados con plena aireación.

6.1.2 Estandarización de parámetros para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} mediante qPCR

Para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} se usaron los iniciadores diseñados previamente en nuestro grupo de investigación (Tabla 5-1) [68]. La especificidad de estos iniciadores se comprobó mediante PCR convencional utilizando como molde ADN de *M. tuberculosis* H37Ra (Figura 6-2), donde se evidenció que el tamaño de los amplicómeros obtenidos correspondió al tamaño de las bandas esperadas. Cabe anotar que en el caso de *ctpV* fue necesario diseñar unos nuevos juegos de iniciadores, porque los diseñados previamente no amplificaban la sección de ADN esperada.

Figura 6-2: Comprobación por PCR de los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}. Productos de amplificación por PCR usando los iniciadores de las ATPasas tipo P_{1B} diseñados previamente, y utilizando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra. Los tamaños de los amplicómeros obtenidos corresponden al tamaño esperado.



Una vez confirmado que los iniciadores amplificaran el producto esperado, se procedió a obtener las curvas de eficiencia de amplificación de cada pareja de iniciadores, para conocer si ellos podían ser empleados para el análisis por qPCR. Estas curvas se hicieron utilizando diferentes concentraciones de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra. Las condiciones de reacción se estandarizaron buscando que cada juego de iniciadores mostrara una eficiencia cercana a 2, y las curvas de melting evidenciaran un único producto, asegurado así la especificidad del de los iniciadores. La Tabla 6-2 muestra las condiciones de reacción de la qPCR utilizadas, estableciendo temperatura de anillaje de cada juego de iniciadores y las eficiencias de reacción. Estos resultados demostraron que los iniciadores eran apropiados para el análisis mediante qPCR.

Tabla 6-2: Parámetros utilizados para el análisis por qPCR de los genes de las ATPasas tipo P_{1B}. Se relacionan los genes de las ATPasas tipo P_{1B}, las condiciones con las que se hicieron las amplificaciones por qPCR y los parámetros para la cuantificación.

Gen	Iniciadores	T _{anillaje} (°C)	Eficiencia	R ²	Threshold
<i>ctpA</i>	A-RT-dir y A-RT-rev	58,0	2,04	0,996	5,103
<i>ctpB</i>	B-RT-dir y B-RT-rev	58,0	1,98	0,992	7,915
<i>ctpC</i>	C-RT-dir y C-RT-rev	57,0	2,25	0,986	9,885
<i>ctpD</i>	D-RT-dir y D-RT-rev	58,0	1,91	0,984	12,580
<i>ctpG</i>	G-RT-dir y G-RT-rev	58,0	2,20	0,974	10,111
<i>ctpJ</i>	J-RT-dir y J-RT-rev	61,2	1,97	0,945	7,173
<i>ctpV</i>	V-RT-dir-2 y V-RT-rev-2	60,0	1,91	0,986	14,939
<i>sigA</i>	RTsigAdir y RTsigArev	58,0	2,13	0,993	8,120

6.1.3 Respuesta transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B}

El método de análisis fue una transcripción relativa de cada gen utilizando como normalizador la transcripción del gen de expresión constitutiva *sigA* (factor sigma A de la ARN polimerasa). Los resultados fueron obtenidos utilizando el método Pfaffl [118] que tiene en cuenta las eficiencias de los iniciadores usados y descarta errores asociados al comparar iniciadores con diferentes eficiencias. Los resultados del análisis transcripcional se obtuvieron para cada gen de ATPasa tipo P_{1B}, en cada una de las condiciones de estrés consideradas. En algunos casos se muestra el resultado del análisis de un solo catión, a una sola concentración; sin embargo, para análisis a diferentes concentraciones de catión, las gráficas se obtuvieron teniendo presente las siguientes consideraciones: si el resultado de la transcripción es diferente entre concentraciones de un mismo catión, se muestra en la graficas cada concentración y se especifica su valor. Si entre las concentraciones de un mismo catión se obtienen valores de transcripción cercanos se muestra en la gráfica como un único valor y no se especifica su concentración, porque indica que independiente de la concentración de catión usada se obtiene el mismo valor de transcripción.

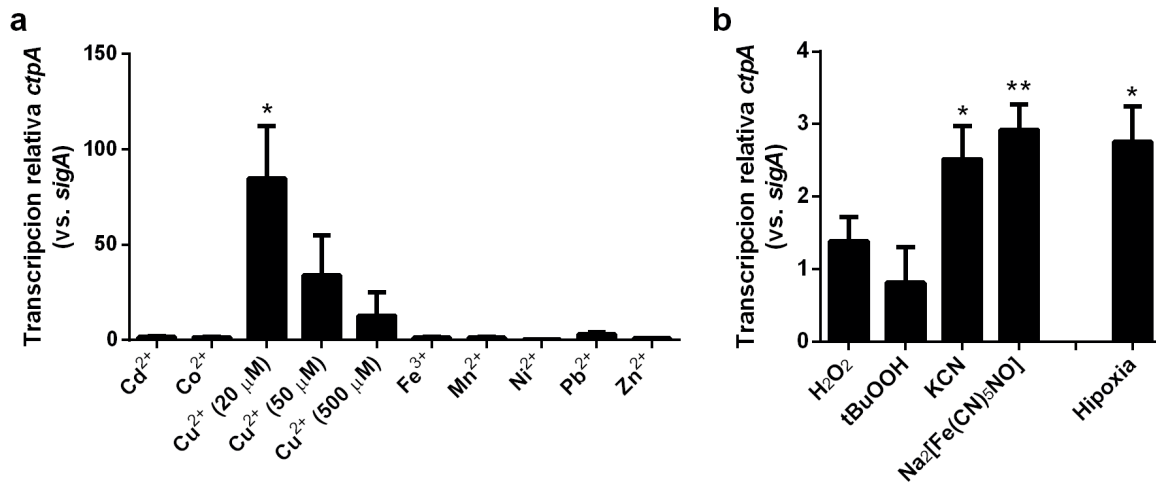
A continuación, se muestran los resultados del análisis transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* bajo condiciones de estrés. El orden en que se en el que aparecen se hace alfabéticamente por el nombre de las ATPasas.

6.1.3.1 CtpA

El análisis transcripcional del gen *ctpA* se muestra en la Figura 6-3. Se evidenció una inducción en la transcripción del gen a bajas concentraciones de Cu²⁺, y al aumentar la cantidad del metal existe una represión en la transcripción (Figura 6-3a). Considerando que la expresión del gen se activa a una concentración cercana a 20 µM de catión, es posible hacer una comparación con la concentración fagosomal de (Cu 24,7 ± 9,5 µM) luego de 24 h de infección con *M. tuberculosis* [10], sugiriendo que CtpA estaría implicada en una respuesta temprana en el proceso de infección de la micobacteria. La represión encontrada con el aumento en la concentración de Cu²⁺ puede indicar que otra de las Cu⁺ ATPasa de *M. tuberculosis* presenta mayor actividad bajo estas condiciones y que CtpA funcionaría en ambientes de menor contenido de catión.

También se observó una inducción en la transcripción del gen bajo condiciones de Hipoxia y en presencia de sustancias de estrés oxidativo y nitrosativo, como KCN y Nitroprusiato de sodio, respectivamente (Figura 6-3b). Al tener una respuesta de activación bajo estas condiciones se puede presumir que CtpA está involucrada en la respuesta al estrés redox e hipoxia. Algunas Cu⁺ ATPasas que se han asociado a funciones diferentes a la desintoxicación del catión, se han relacionado con la metalación de cuproenzimas extracitoplasmáticas haciéndolas apoenzimas funcionales [24]. Es posible sugerir blancos de metalación por parte de CtpA considerando aquellas proteínas extracitoplasmáticas que utilizan Cu como cofactor.

Figura 6-3: Respuesta transcripcional de *ctpA* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *ctpA* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: **a.** presencia de cationes de metales pesados como Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺; **b.** Hipoxia y agentes de estrés redox como: H₂O₂, tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio, todos ellos a una concentración de 1 mM. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (**p*<0,05 y ***p*<0,01) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



Dentro de las enzimas extracitoplasmáticas que pueden contener Cu en su centro catalítico se encuentran la superóxido dismutasa (SodC), citocromo oxidasa, y multicobre oxidasa (MmcO). SodC es una lipoproteína glicosilada que se encarga de catalizar la dismutación del radical superóxido (O₂⁻) a oxígeno molecular (O₂) y peróxido de hidrogeno (H₂O₂) [156], y se conoce que contiene Cu en su estructura [14]. Esta enzima se ha asociado a la respuesta a especies reactivas de oxígeno que son generadas por el macrófago [36], y adicionalmente es inducida cuando hay producción de superóxido por la NADPH oxidasa en cuando la micobacteria entra en los macrófagos [157], por otro lado su expresión es

reprimida en estado de persistencia no replicativa, cuando la actividad de la NADPH se encuentra a niveles muy bajos [158]. La expresión de SodC que disminuye en un estado de hipoxia, similar al estado de persistencia no replicativa [115], no se relacionaría con CtpA, quien se estimula en hipoxia. Sí por ejemplo CtpA se encargará de la metalación de SodC ambas deberían estar expresadas en la misma condición.

La MmcO (muticobre oxidasa) es una lipoproteína que cataliza la oxidación de sustratos inorgánicos, Fe^{2+} y Cu^+ , por la transferencia de un electrón que se acopla a la reducción de oxígeno a agua [159, 160]. En su estructura hay cuatro iones de Cu que hacen parte de dos centros catalíticos que componen el sitio activo de la multicobre oxidasa [161], y la metalación puede darse después de la exportación de la enzima [162]. Por lo tanto, existe la posibilidad que una Cu^+ ATPasa como CtpA cumpla la función de metalar MmcO ubicada fuera del citosol bacteriano sin el cofactor de Cu^+ , el que podría ser entregado por CtpA, quien como se verá mas adelante, transporta Cu^+ al exterior celular. La transcripción de CtpA aumenta a bajas concentraciones de Cu, indicando que el transportador está involucrado en el proceso de desintoxicación de Cu a bajas concentraciones. Este efecto puede verse reflejado en el proceso de metalación de la MmcO, ya que bajo estas condiciones la ATPasa puede entregar el cofactor a la multicobreoxidasa que se encarga del proceso de desintoxicación del Cu^+ periplasmático, ya que la función de la MmcO es oxidar el Cu^+ de periplasma a una especie menos reactiva como Cu^{2+} . [159].

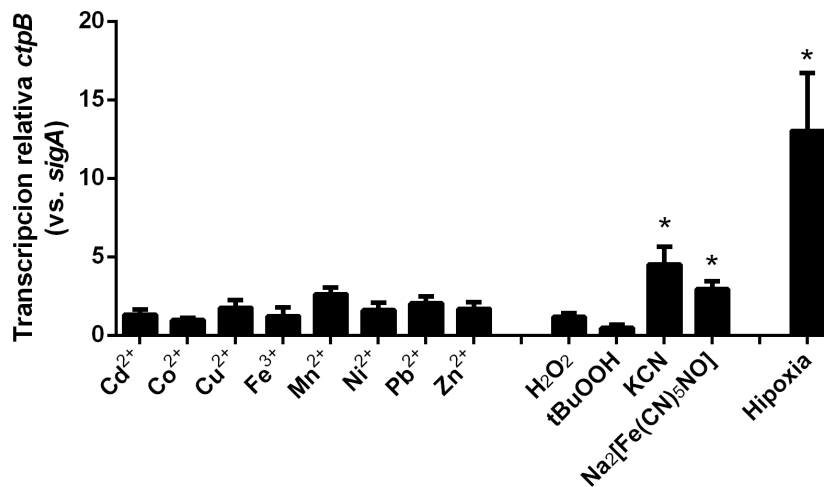
Al encontrar que CtpA presenta actividad en respuesta a condiciones de estrés redox e hipoxia, y al relacionar la ATPasa con el transporte de Cu^+ y la homeostasis iónica; permite postular que CtpA juega un papel en la respuesta a estas condiciones es de una manera indirecta, entregando cofactores a proteínas fuera del citosol bacteriano que responden al estrés redox e hipoxia. Sin embargo, con la evidencia experimental que se tiene hasta el momento no es posible conocer que enzimas podría estar metalando CtpA.

Una manera de conocer si CtpA estaría relacionada con la metalación de MmcO seria evaluar si hay una respuesta transcripcional por parte de la multicobreoxidasa bajo la misma condición en la que fue estimulada *ctpA*; u otra clase de experimentos para determinar la interacción entre dos proteínas como los sistemas de *Two-Hybrid system* [163].

6.1.3.2 CtpB

De manera similar a CtpA, el análisis transcripcional del gen *ctpB* (Figura 6-4) muestra una inducción de la transcripción bajo condiciones de hipoxia, y al usar los agentes de estrés redox como KCN y nitroprusiato de sodio. Otros estudios también encontraron la activación de CtpB bajo condiciones de hipoxia NPR-2 [95], confirmando nuestros resultados. Si bien la transcripción de la enzima no es inducida por los diferentes cationes evaluados en el presente trabajo (incluyendo las tres concentraciones de Cu²⁺ evaluadas: 20, 50 y 500 µM, representados como un único valor que indica la tendencia obtenida para todas las concentraciones), pero si hay una inducción en condiciones de hipoxia y presencia de agentes de estrés redox, el resultado podría indicar que la ATPasa estaría relacionada con la homeostasis iónica posiblemente cumpliendo una función, como en CtpA, de entrega de cofactores a enzimas extracitoplasmáticas implicadas en la respuesta a la hipoxia y estrés redox. Esta función se ha evidenciado previamente con otras Cu⁺ ATPasas que se encargan de la metalación de citocromo C oxidasas [164-166] y superóxido dismutasas [167].

Figura 6-4: Respuesta transcripcional de *ctpB* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *ctpB* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺; hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1 mM: H₂O₂, tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (**p*<0,05) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.

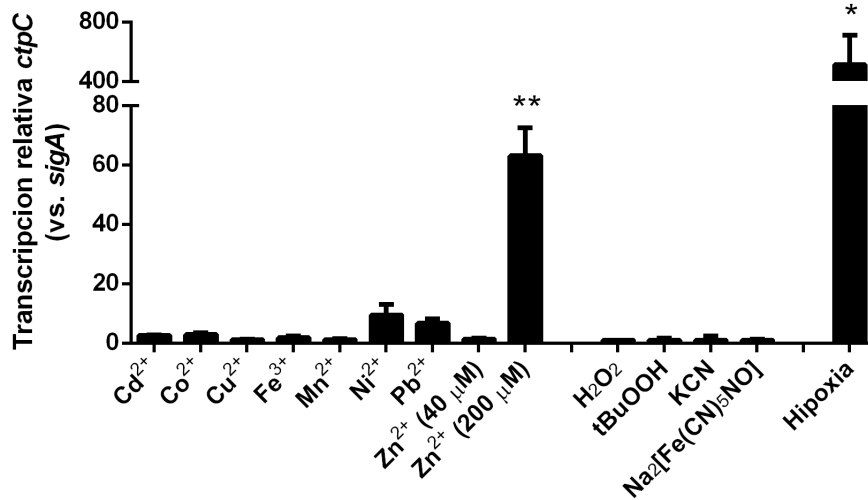


CtpB podría entonces también encargarse de la metalación de cuproenzimas, y las posibles dianas para la entrega del Cu^+ podrían ser las cuproenzimas conocidas como: la superóxido dismutasa (SodC), citocromo oxidasa, y multicobre oxidasa (MmcO). Al inducirse mayoritariamente la transcripción del gen *ctpB* en hipoxia se puede relacionar la enzima con la metalación de proteínas involucradas en la adaptación metabólica a un ambiente bajo en oxígeno, potencialmente proteínas de los complejos de la cadena de transporte de electrones como las citocromos oxidasas, que usan Cu como cofactor [24]. Se conoce que nitroprusiato de sodio que es un agente que produce óxido nítrico (NO), y este óxido es capaz de inducir la expresión de genes relacionados con la dormancia y afectar la respiración aerobia de la micobacteria [168]. También se ha determinado que el NO y CN^- presentan el mismo blanco de inhibición, la subunidad CtaD de la citocromo c oxidasa, encontrada en de la cadena de transporte de electrones en la respiración de *M. tuberculosis* [169]. La importancia de la citocromos oxidasa en la adaptación a la hipoxia se observa que al inhibirse esta citocromo c oxidasa, la bacteria responde usando la citocromo bd quinol oxidasa, que presenta una mayor afinidad por el oxígeno [169]. Lo anterior sugiere que la inhibición de la citocromo c oxidasa está dada por las tres condiciones de: hipoxia, presencia de NO y CN^- , por lo que una posible inducción de *ctpB* en estas tres condiciones se deba a una respuesta a la inhibición de esta citocromo oxidasa que permite un cambio en la respiración aerobia de la bacteria a una condición de hipoxia.

6.1.3.3 CtpC

En el caso de *ctpC*, una concentración de Zn^{2+} 200 μM indujo la transcripción del gen (Figura 6-5), lo que también se había evidenciado anteriormente por Botella y colaboradores [44]. El aumento de la expresión se observó en una concentración alta del catión, toda vez que a concentraciones bajas (40 μM Zn^{2+}), no se evidencio ningún cambio en la expresión.

Figura 6-5: Respuesta transcripcional de *ctpC* a condiciones de estrés. La transcripción relativa de *ctpC* se muestra usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} ; además de hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1 mM: H_2O_2 , tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



La función biológica de CtpC se ha relacionado anteriormente con la desintoxicación del Zn²⁺ [44], pero también se ha asociado con la metalación de enzimas que tienen como cofactor Mn²⁺ [23]. En el presente trabajo, los resultados del análisis transcripcional de *ctpC* evidencian la función de desintoxicación de Zn²⁺ al aumentar su transcripción relativa en presencia de concentraciones altas de ese catión; sin embargo, no se observa cambio en presencia de concentraciones de Mn²⁺ usadas en este análisis.

La hipoxia indujo fuertemente la transcripción del CtpC, lo que coincide con estudios de microarreglos y proteómica previamente reportados donde la hipoxia activa este transportador [95, 97]. Al ser el transporte de cationes su función principal, las ATPasas no podrían estar directamente relacionadas con la hipoxia, pero sí con la homeostasis iónica, y en consecuencia posiblemente su función en la respuesta a hipoxia sea metalar enzimas extracitoplasmáticas que se encarguen de mitigar la baja concentración de oxígeno.

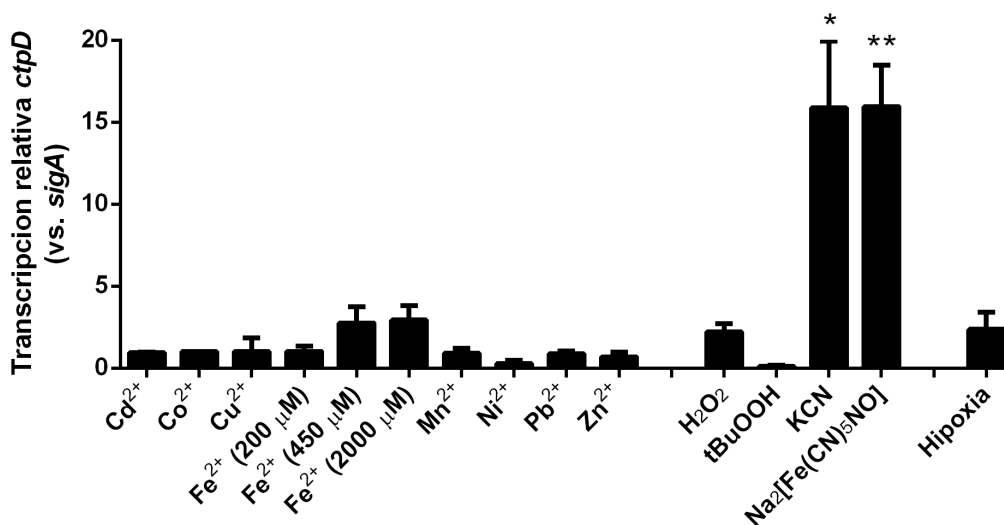
Se ha reportado que CtpC es capaz de transportar eficientemente Mn²⁺ y que posiblemente su blanco de metalación sea la superóxido dismutasa SodA, que tiene como cofactor Mn²⁺ y Fe²⁺ [23], todo asociado con la respuestas al estrés oxidativo [170].

A partir de los resultados del análisis transcripcional en el presente trabajo es posible ver el posible papel dual que puede tener CtpC, encargándose de la desintoxicación de Zn²⁺ y metalando enzimas extracitoplasmáticas que pueden estar asociadas con la respuesta a un ambiente de hipoxia.

6.1.3.4 CtpD

El gen *ctpD* se activó en condiciones de estrés redox inducido por KCN y nitroprusiato de sodio (Figura 5-6), y en menor proporción con H₂O₂ e hipoxia. El aumento en la expresión de CtpD por la presencia de KCN y nitroprusiato se había evidenciado previamente en ensayos de qPCR [50], donde se relaciona esta ATPasa con el transporte de Co²⁺ y Ni²⁺ y al estrés redox, que posiblemente lo haga metalando enzimas encargadas con actividades que mitiguen la presencia de RNS y ROS. Recientemente CtpD se ha relacionado con el transporte eficiente de Fe y con la respuesta de estrés redox [25].

Figura 6-6: Respuesta transcripcional de *ctpD* a condiciones de estrés. Transcripción relativa de *ctpD* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺; además de hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1mM: H₂O₂, tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas técnicas. Las diferencias significativas (**p*<0,05 y ***p*<0,01) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



Se observó una baja transcripción de *ctpD* al intoxicar las bacterias con Fe³⁺, sugiriendo una posible respuesta al estrés generado por el catión. Actualmente se ha relacionado esta enzima con el transporte de Fe²⁺ en micobacterias, y como respuesta al estrés redox [25]. En estudios previos se había analizado el comportamiento transcripcional de *M. tuberculosis* H37Rv con diferentes metales pesados, donde el Fe²⁺ a una concentración de 100 μM no indujo cambio en la producción del mRNA de *ctpD* [50]. En este estudio se

evidenció que el Fe a una concentración 200 μM no indujo la transcripción relativa del gen, pero al usar una concentración superior a 450 μM si hubo un aumento en la expresión relacionando esta enzima con el transporte del catión. Esto indicaría que posiblemente la enzima hace parte del proceso de desintoxicación de este metal. Sin embargo, los resultados transcripcionales muestran que la actividad de CtpD se relaciona principalmente a la respuesta al estrés redox.

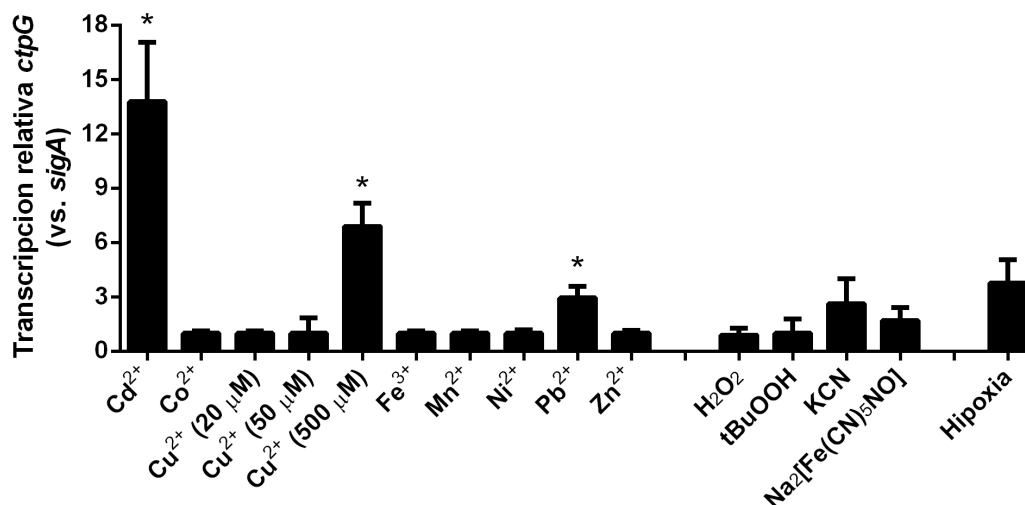
6.1.3.5 CtpG

La Figura 5-7 muestra los resultados de la transcripción relativa del gen *ctpG* cuando *M. tuberculosis* se enfrenta a las diferentes condiciones de estrés. Los resultados muestran una mayor inducción del gen en presencia de Cd^{2+} a una concentración subletal (25 μM), también se encontró una inducción en menor proporción cuando se adicionan concentraciones tóxicas de Cu^{2+} (500 μM). Estos resultados sugieren que posiblemente CtpG se encargue de la desintoxicación de estos dos metales. Recientemente nuestro grupo de investigación caracterizó funcionalmente la enzima, encontrando que CtpG podría estar relacionada con el transporte de Cd^{2+} y Cu^{2+} , presentando una mayor afinidad por primer catión [171].

El aumento en la transcripción de *ctpG* con Cd^{2+} y ligeramente con Pb^{2+} se podría explicar debido a que el operón que contiene a CtpG se encuentra el regulador transcripcional CmtR, sensible a Cd^{2+} y Pb^{2+} [172]. Se ha reportado que CmtR es sensible a Cd^{2+} , mediante ensayos de EMSA se encontró que el represor se disocia parcialmente promotor de CtpG en concentraciones cercanas a 10 μM del Cd^{2+} . En el caso del Pb^{2+} , no se observó disociación del regulador [173], lo que explica la mayor inducción del CtpG por Cd^{2+} comparado con Pb^{2+} . En cuanto a la inducción mostrada por altas concentraciones de Cu^{2+} , ya había sido evidenciada anteriormente por Ward y colaboradores [11], indicando que posiblemente la enzima pueda ayudar en procesos de desintoxicación de Cu en la célula, como mecanismo alternativo a la actividad de CtpV.

Figura 6-7: Respuesta transcripcional de *ctpG* a condiciones de estrés. Transcripción relativa de *ctpG* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} ; además de hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1 mM: H_2O_2 , tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se

hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



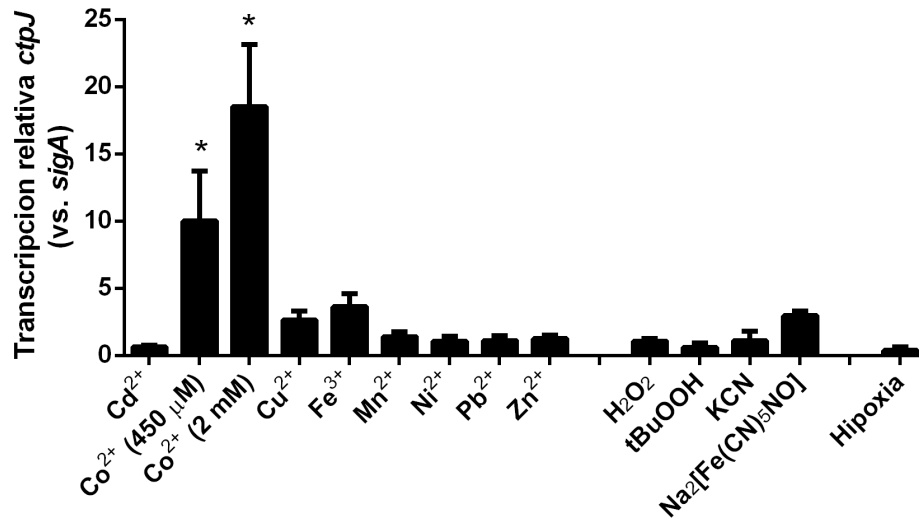
También se observó que CtpG se induce transcripcionalmente en una menor proporción cuando *M. tuberculosis* encuentra en condiciones de hipoxia. Esta inducción se había observado anteriormente por ensayos transcripcionales de microarreglos [97]. La expresión de la ATPasa bajo esta condición puede ser una respuesta en la homeostasis iónica, donde se necesita el transporte de los cationes. Sin embargo, consideramos que la actividad de CtpG es principalmente en la desintoxicación de metales como Cd^{2+} y Cu^{2+} .

6.1.3.6 CtpJ

En el caso de *ctpJ*, se observó una inducción de la transcripción dosis dependiente en presencia de Co^{2+} 450 μM y 2 mM (Figura 6-8). De forma similar, una activación similar de CtpJ se había evidenciado frente a Co^{2+} 100 μM [50]. Actualmente se conoce que CtpJ es capaz de transportar Fe^{2+} , Co^{2+} y Ni^{2+} , cuya función ha sido asociada a la desintoxicación de estos mismos metales [25, 50]. Específicamente se encontró que la enzima transporta con mayor eficiencia Fe^{2+} [25]; sin embargo, en nuestro análisis transcripcional no se observó una inducción de CtpJ al intoxicar con Fe^{3+} pero si frente a Co^{2+} .

Figura 6-8: Respuesta transcripcional de *ctpJ* a condiciones de estrés. Transcripción relativa de *ctpJ* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd^{2+} , Co^{2+} , Cu^{2+} , Fe^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} , Pb^{2+} y Zn^{2+} ; además de hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1 mM: H_2O_2 , tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio

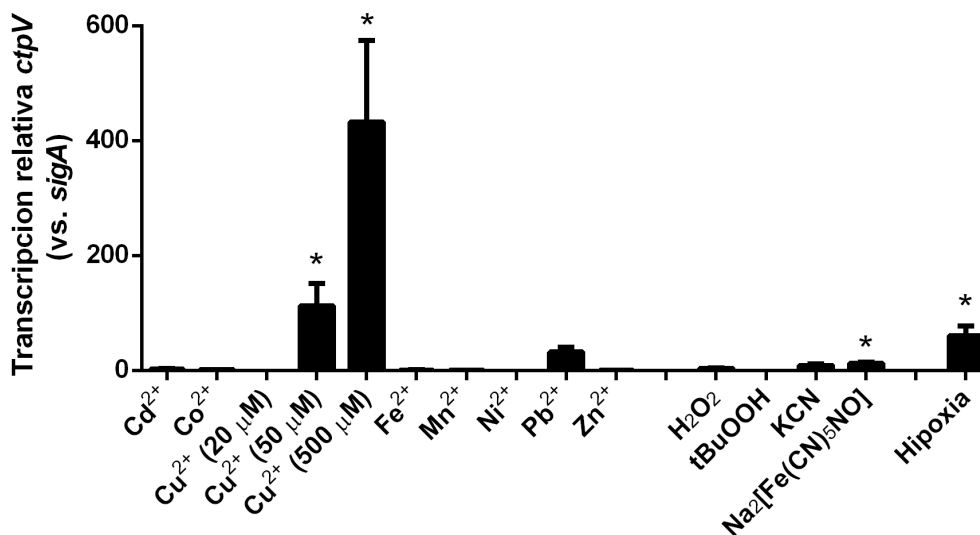
± SEM derivados de tres réplicas técnicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



6.1.3.7 CtpV

Finalmente, la transcripción del gen *ctpV* se activó de forma dosis dependiente al intoxicar *M. tuberculosis* con Cu²⁺ y en hipoxia (Figura 6-9). La activación de CtpV por Cu²⁺ se había reportado previamente, lo que fue asociado con el proceso de desintoxicación por Cu⁺ [11]. La activación de CtpV en hipoxia también había sido observada previamente mediante análisis de microarreglos [96].

Figura 6-9: Respuesta transcripcional de *ctpV* a condiciones de estrés. Transcripción relativa de *ctpV* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de cationes de metales pesados como Cd²⁺, Co²⁺, Cu²⁺, Fe²⁺, Mn²⁺, Ni²⁺, Pb²⁺ y Zn²⁺; además de hipoxia y agentes de estrés redox a una concentración 1 mM: H₂O₂, tert butil hidroperóxido, KCN y nitroprusiato de sodio. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas técnicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



En resumen, se encontró que todas las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* responden a nivel transcripcional frente a las diferentes condiciones de estrés consideradas. El resultado del análisis transcripcional mostró que CtpA, CtpG y CtpV se activan con Cu²⁺, CtpC con Zn²⁺, CtpG con Cd²⁺ y CtpJ con Co²⁺, sugiriendo que estas ATPasas potencialmente transportan y están relacionadas con la desintoxicación citosólica de estos metales. Estos resultados son comparables con estudios que establecen el sustrato de estas enzimas, donde CtpA y CtpV son transportadores de Cu⁺ [11, 174], CtpC transportador de Zn²⁺ [44], CtpG transportador de Cd²⁺ [171], y CtpJ transportador de Co²⁺ [50]. Adicionalmente, al parecer la activación de estas enzimas se da en respuesta al mantenimiento de la homeostasis iónica.

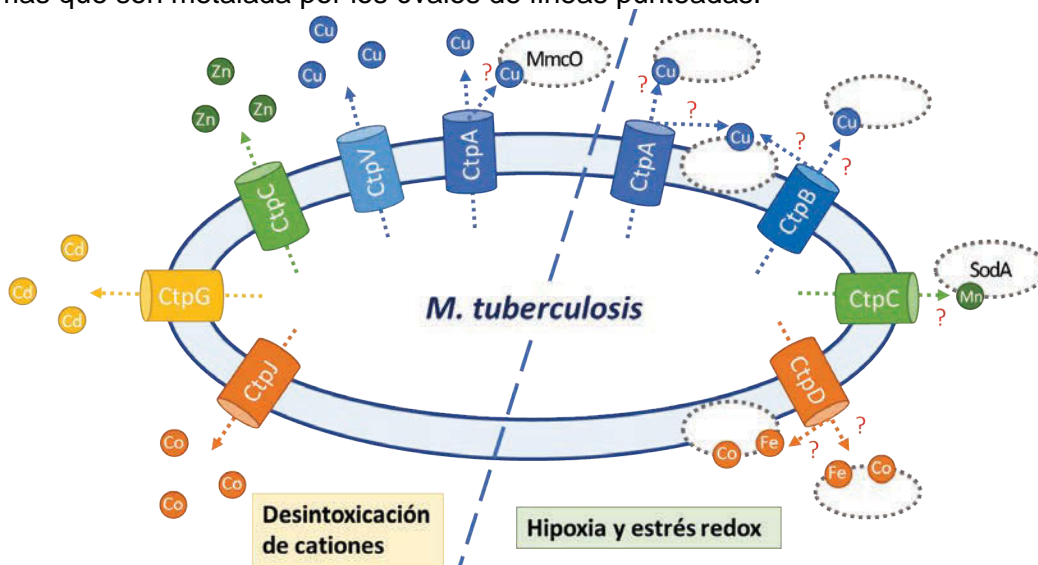
Los resultados nos permiten entonces sugerir que CtpA, CtpC, CtpJ, CtpG y CtpV están relacionadas con procesos de desintoxicación de cationes de metales pesados, al responder frente a altas concentraciones de estos metales, lo que también coincide con los sustratos de estas enzimas [11, 44, 50, 171, 174].

Los resultados obtenidos también sugieren que CtpA, CtpB, y CtpD estarían asociadas con la respuesta al estrés redox, toda vez que estos transportadores presentaron una activación en su transcripción bajo la presencia de agentes de estrés oxidativo y nitrosativo, como el KCN y nitroprusiato de sodio, respectivamente. De manera importante se puede sugerir que CtpB y CtpC pueden ser relevantes cuando *M. tuberculosis* entra a un estado

de hipoxia. En la respuesta al estrés redox e hipoxia, las ATPasas tipo P_{1B} no actúan directamente para mitigar el estrés generado, ya que ellas tienen como función el transporte de cationes a través de la membrana plasmática; cuando ellas se expresan bajo estas condiciones posiblemente su función sea la entrega de cofactores (o cationes) a enzimas extracitoplasmáticas, para estas sean activas y puedan hacer frente a la condición de estrés. Se han reportado que diversas enzimas periplasmáticas y de membrana plasmática que requieren de cofactores, son sintetizadas y translocadas a estos compartimientos sin cofactores en su estructura [167, 175, 176]. Por tanto, para que estas enzimas sean funcionales debe existir una metalación realizada en ciertos casos por ATPasas tipo P_{1B} [151, 164, 165, 167, 176-178]. Por lo tanto, podríamos sugerir que las ATPasas tipo P_{1B} tomarían el catión en el citosol para transportarlo hacia la cara extracitoplasmática, a su vez metalando a las enzimas extracitoplasmáticas de destino.

En la Figura 6-10 se muestra un esquema de la respuesta que podrían tener las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Se trata de un modelo construido a partir de los resultados de la activación transcripcional de las siete ATPasas tipo P_{1B} analizadas bajo condiciones de estrés en este trabajo.

Figura 6-10: Respuesta de las ATPasas tipo P_{1B} a condiciones de estrés. Se muestra la relación que tienen las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* con las respuestas a condiciones de estrés utilizadas en el presente trabajo. Se hace una separación de los siete transportadores en dos grupos: Aquellas ATPasas que tendrían un papel en la desintoxicación con cationes de metales pesados CtpA, CtpC, CtpG, CtpJ y CtpV; y las ATPasas que estarían involucradas en la respuesta estrés redox, que en este caso se encargarían de metalar a enzimas extracitoplasmáticas. Se representan las posibles enzimas que son metalada por los óvalos de líneas punteadas.



6.2 Análisis transcripcional de posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}

En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentran codificadas proteínas reguladoras del tipo de sistemas de dos componentes, histidina quinasa, factores sigma de la ARN polimerasa, y otros reguladores transcripcionales. Algunos de estos productos génicos están anotados con funciones como la respuesta al estrés medioambiental como estrés térmico, hipoxia, óxido nítrico, inanición, y estrés oxidativo [179].

6.2.1 Búsqueda de reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*

La respuesta a condiciones de estrés por parte de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* puede entenderse mejor al conocer algunos detalles de la regulación transcripcional de estas 7 enzimas. Por tanto, se hizo una búsqueda de algunos reguladores transcripcionales o elementos trans de regulación transcripcional de tipo proteico y sean capaces de unirse al ADN en el entorno genómico y regulando la transcripción de los genes de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*.

En el genoma de *M. tuberculosis* están anotados un total de 219 reguladores transcripcionales [119] y [121]. Como reguladores transcripcionales en el presente trabajo, se consideraron proteínas que tuviesen en su estructura sitios de unión a cationes metálicos y al ADN. Las ATPasas tipo P_{1B} transportan iones de metales pesados para controlar su contenido citosólico, por lo tanto, su expresión debería ser regulada por la presencia del catión a transportar en el citosol.

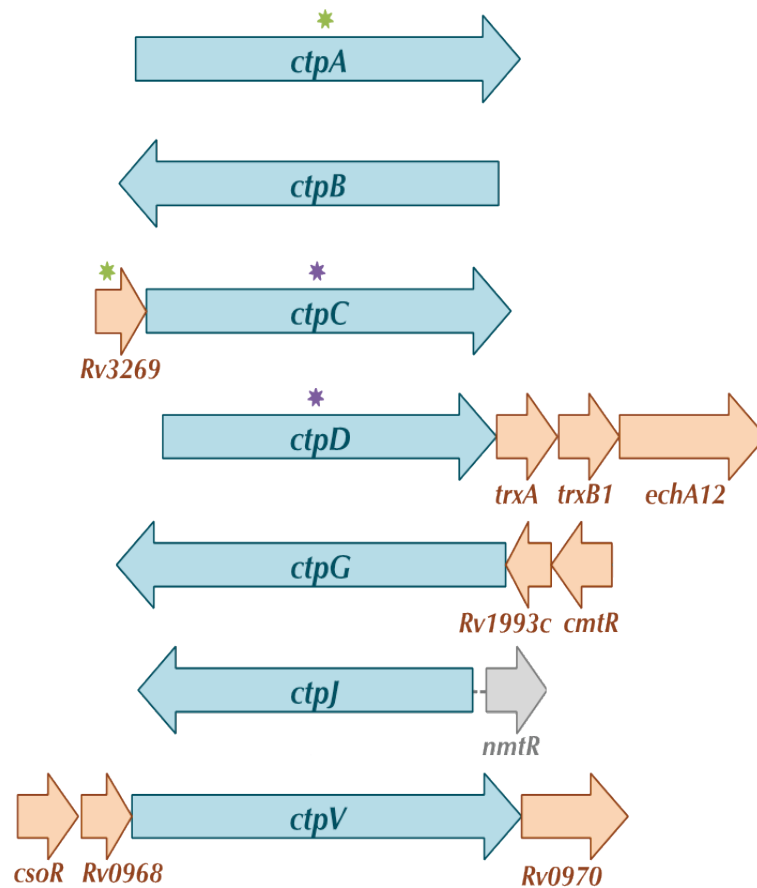
Los factores transcripcionales capaces de sensar cationes metálicos, se conocen comúnmente como proteínas metaloreguladoras. En el genoma de *M. tuberculosis* se encuentran codificadas seis de las siete familias de proteínas metaloreguladoras hasta ahora reportadas [180], representadas en un total de 25 proteínas diferentes. En la Tabla 6-3 se relacionan y clasifican las proteínas anotadas como metaloregulatorias de *M. tuberculosis*.

Tabla 6-3: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} a estudiar. Se reportan los reguladores transcripcionales seleccionados para el presente estudio y su función anotada en Tuberculist [119].

Familia	Regulador transcripcional	Función descrita en el servidor Tuberculist [119]
ArsR/SmtB	Rv0081	Posible regulador transcripcional.
	Rv0324	Posible regulador transcripcional de la familia ArsR.
	Rv0576	Posible regulador transcripcional de la familia ArsR.
	Rv0674	Proteína conservada hipotética, relacionada con regulador putativo de la degradación del ácido fenilacético de la familia ArsR de <i>Sinorhizobium meliloti</i> .
	KmtR (Rv0827c)	Represor transcripcional del operador-promotor KMTR. Represión susceptible a Ni ²⁺ o Co ²⁺ . Pertenece a la familia ArsR-SmtB.
	Rv1674c	Posible regulador transcripcional.
	CmtR (Rv1994c)	Represor transcripcional del operador-promotor CMT. Represión susceptible a Cd ²⁺ . Pertenece a la familia ArsR-SmtB.
	Rv2034	Represor transcripcional de la familia ArsR.
	SmtB (Rv2358)	Regulador transcripcional SmtB de la familia ArsR. Represión susceptible a Zn ²⁺ .
	Rv2640c	Posible regulador transcripcional de la familia ArsR.
	Rv2642	Posible regulador transcripcional de la familia ArsR.
	Rv3095	Posible regulador transcripcional.
	NmtR (Rv3744)	Represor transcripcional del operador-promotor NMTA. Represión susceptible a Ni ²⁺ y Co ²⁺ . Pertenece a la familia ArsR-SmtB.
	Rv3773c	Función desconocida.
	CsoR/RicR	Rv0190
CsoR (Rv0967)		Represor transcripcional del operón cso. Represión susceptible a Cu ⁺ . Pertenece a la familia CsoR.
Rv1766		Función desconocida.
DtxR	IdeR (Rv2711)	Represor y activar dependiente de hierro IdeR. Regulador transcripcional de la biosíntesis de sideróforos y captura de hierro.
	SirR (Rv2788)	Represor transcripcional SirR.
FuR	FurA (Rv1909c)	Regulador de captura de hierro FurA. Actúa como elemento de control global negativo, empleando Fe ²⁺ como cofactor para unirse al operador de los genes reprimidos. Regula la transcripción de KatG.
	Zur (Rv2359)	Posible regulador de la captura de Zinc. Actúa como elemento de control global negativo, empleando Zn ²⁺ como cofactor para unirse al operador de los genes reprimidos.
Mer	HspR (Rv0353)	Posible regulador transcripcional del choque térmico HspR (familia MerR). Involucrado en la regulación transcripcional (represión) de las proteínas de choque térmico.
	Rv1828	Función desconocida.
	Rv1830	Función desconocida.
	Rv3334	Posible regulador transcripcional de la familia MerR.

Una vez identificados los genes que codifican las proteínas metaloreguladoras en el genoma de *M. tuberculosis*, se determinó si su ubicación se encontraba en el entorno genómico de genes que codifican ATPasas tipo P_{1B}. En la Figura 6-11 se muestra la arquitectura genómica alrededor del locus de las ATPasas tipo P_{1B} consideradas en este estudio. En el entorno genómico de *ctpG*, *ctpJ* y *ctpV* se encontraron los genes que codifican las proteínas metaloreguladora CmtR, NmtR y CsoR, respectivamente. En el caso específico de *ctpG* y *ctpV* sus posibles reguladores hacen parte del mismo operón.

Figura 6-11: Arquitectura genómica del entorno genómico de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Los genes mostrados en color se predicen ubicados en operones, en tanto que los mostrados en gris corresponden a genes localizados en la vecindad, sin que se ubiquen compartiendo un operón con las ATPasas tipo P_{1B}. Las flechas representan la dirección y el tamaño de los genes. Con estrellas se señalan aquellos genes determinados como importantes para la virulencia mediante estudios de mutagénesis a gran escala [20, 181]. Esta figura fue tomada y adaptada de [68].



- * Esencial para supervivencia de *M. tuberculosis* en macrófagos murinos (Rengarajan 2005)
- * Esencial para crecimiento de *M. tuberculosis* en baso de ratón (Sassetti & Rubin 2003)

Se encontró que la expresión de CtpG puede estar regulada a nivel transcripcional por CmtR (Rv1992c). Se conoce que CmtR es un represor que une los cationes Cd²⁺ y Pb²⁺ y hace parte de la familia ArsR-SmtB [172]. Este represor transcripcional es inducido por la presencia de Cd²⁺ generando la disociación del complejo proteína represora-ADN, iniciando así la transcripción del operón *cmtR-Rv1993c-Rv1992c* mediada por la ARN polimerasa [173]. En el caso de CtpJ, su regulador transcripcional sería NmtR (Rv3744), que también pertenece a la familia ArsR-SmtB y es sensado por Co²⁺ y Ni²⁺ [182]. Finalmente, CtpV sería regulado por CsoR (Rv0967) que hace parte de la familia CsoR-RicR, la que posee sitios de unión a Cu⁺ y hace parte del operón de respuesta a Cu [183]. Al igual que los dos reguladores transcripcionales anteriores, CsoR funciona como un represor que en presencia de Cu⁺ se disocia del complejo CsoR-ADN permitiendo la transcripción del operón *cso* [183].

Para los genes de *ctpA*, *ctpB*, *ctpC* y *ctpD* no se encontró algún gen que codifique una proteína metaloreguladora en su entorno genómico, sugiriendo que pueden tener otro tipo de regulación a nivel transcripcional. Para ellos, otra opción es la existencia de elementos de transcripción cis que puedan ser reconocidos por proteínas metaloreguladoras presentes en el entorno genómico de los genes de estas ATPasas; en este caso, los genes que codifican a los reguladores se ubicarían en otra región genómica dificultando su identificación. Una vez expresado, el posible regulador sería capaz de reconocer secuencias cercanas a los genes de las ATPasas, formando un complejo regulador-ADN que active o reprima la transcripción de la ATPasa. Por lo tanto, al desconocer el tipo de regulación transcripcional que puedan tener CtpA, CtpB, CtpC y CtpD, la búsqueda se amplió a otro tipo de reguladores transcripcionales.

Por lo tanto, en la búsqueda de elementos de regulación transcripcional trans relacionados con la expresión de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, también se utilizó la red de regulación transcripcional reportada por Du y colaboradores [120], dónde se relacionan los reguladores transcripcionales y sus posibles genes diana. Al considerar como genes diana las ATPasas tipo P_{1B} en este modelo, se encontró que *ctpC* podría estar regulado por Rv0324 [184], a su vez regulador del en *rv3269* que hace parte del operón de *ctpC*. Siguiendo este mismo modelo, en el caso de *ctpD* y los genes de su operón (*trxA*, *trxB1* y *echA12*) podrían estar regulados por SigH (Rv3223c) [184]. Por otra parte, Rv1033 podría regular a *ctpJ* y su posible regulador (NmtR) [184]. En este caso no se descarta que *ctpJ*

sea regulado por NmtR, quien no estaría considerado en la red transcripcional de DU y colaboradores [120]. Finalmente, se confirma que *ctpV* está regulado por CsoR, cuyo operón, al que pertenece *ctpV*, es regulado por Rv3334 [185].

De forma adicional en la búsqueda de posibles reguladores, también se utilizó la relación de factores de transcripción y los genes diana que reportan Balazsi y colaboradores [185]. En esta aproximación se encontró que *ctpD* y su operón (rv1470, rv1471 y rv1472) estarían regulados por SigH (Rv3223c); *ctpG* y su operón (rv1993c y rv1994c) estarían regulados por CmtR; *ctpJ* estaría regulado por NmtR; y *ctpV* con SU operón (rv0967, rv0968 y rv0970) estarían regulados por CsoR.

Como resultado de nuestra búsqueda, por ninguna de las aproximaciones consideradas se encontró reguladores transcripcionales para los genes de *ctpA* y *ctpB*. Para superar este inconveniente, también usamos el servidor TB Network Portal [121], que relaciona datos obtenidos por técnicas de ChIP-Seq (Inmunoprecipitación de Cromatina-Secuenciación, siglas en ingles) y TFOE (sobreexpresión de factores de transcripción, siglas en ingles). Estas dos técnicas permiten conocer la región de genómica en la que un regulador transcripcional podría estar interaccionando. ChIP-seq permite identificar la región genómica donde ocurre la interacción ADN-proteína [186]. Al buscar en el entorno genómico de las ATPasas tipo P_{1B} es posible identificar proteínas que podrían interaccionar cerca o dentro del gen. En la Tabla 6-4 se muestra una lista de las proteínas identificadas por esta técnica, encontrando que todas las ATPasas tipo P_{1B} están relacionadas con al menos un regulador transcripcional, a excepción de CtpC.

Tabla 6-4: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} identificados por Chip-seq. Se relacionan los reguladores transcripcionales que están relacionados con las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Se identifica la posición y localización de interacción genómica. Esta identificación se hizo mediante el servidor TB Network Portal [121] basado en los datos obtenidos por la técnica Chip-seq.

ATPasa tipo P _{1B}	Regulador transcripcional	Sitio de interacción	Localización genómica
CtpA	Rv2250c	Dentro del gen	101.096
CtpB	SigC (Rv2069)	Corriente arriba	122.199
	TrcR (Rv1033c)	Corriente arriba	122.199
	KstR (Rv3574)	Corriente arriba	122.199
CtpC	----	----	----

CtpD	WhiB5 (Rv0022c)	Corriente arriba	1.656.924
	MtrA (Rv3246c)	Corriente arriba	1.656.924
CtpG	WhiA (Rv1423)	Dentro del gen	2.236.971
CtpJ	NmtR (Rv3744)	Corriente arriba	4.195.373
	Rv0081	Corriente arriba	4.195.373
	Rv0023	Corriente arriba	4.195.373
	TrcR (Rv1033c)	Corriente arriba	4.195.373
CtpV	Rv1816	Corriente arriba	1.078.545
	Rv0324	Corriente arriba	1.078.545

Por lo tanto, se proponen como posibles reguladores transcripcionales de *ctpA* y *ctpB* a Rv2250c (Regulador de la familia TetR) y SigC (Factor sigma de la ARN polimerasa), respectivamente. En el caso de *ctpB* se identificaron dos reguladores transcripcionales adicionales: TrcR (Sensor del sistema de dos componentes TrcS/TrcR) y KstR (Regulador de la familia TetR). También se identificaron otros elementos trans que podrían estar regulando la expresión de CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV, de todos ellos NmtR (Regulador de CtpJ) coincide con los resultados de las búsquedas anteriores. Esto sugiere que podría haber más de un regulador transcripcional que afectaría la expresión de las ATPasas tipo P_{1B}.

El segundo método de análisis para identificar reguladores transcripcionales con el servidor TB Network Portal [121] es a partir de los datos obtenidos por la metodología de TFOE, la que evalúa el efecto que tiene la sobreexpresión de cada uno de los diferentes reguladores transcripcionales en la transcripción del genoma *M. tuberculosis*, utilizando microarregos. En la Tabla 6-5 se muestran los reguladores que al ser sobreexpresados, serían capaces de cambiar el perfil transcripcional de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*.

Tabla 6-5: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} identificados por TFOE. Se reportan los reguladores transcripcionales que estarían relacionados con las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Esta identificación se hizo mediante el servidor TB Network Portal [121] basando los datos obtenidos por la técnica TFOE. Se relaciona el tipo de efecto que produce la sobreexpresión del regulador transcripcional con la transcripción de los genes de las ATPasas tipo P_{1B}, la relación de la inducción *Relación Log₂ de (Factor de transcripción inducido / Factor de transcripción no inducido) y si afecta a los genes de los operones a los que pertenecen las bombas.

ATPasa tipo P _{1B}	Regulador transcripcional	Efecto	Relación de inducción*	Afecta genes del operón
CtpA	Rv0818	Induce	2,58	N/A

CtpB	SigC (Rv2069)	Induce	2,20	N/A
	Rv0324	Reprime	-1,46	Reprime a <i>rv3269</i>
CtpC	Rv3058c	Induce	1,18	Induce a <i>rv3269</i>
	Rv1358	Induce	1,12	Induce a <i>rv3269</i>
	WhiB2 (Rv3260c)	Induce	1,03	Induce a <i>rv3269</i>
	WhiB3 (Rv3416)	Reprime	-1,96	No
CtpD	WhiB5 (Rv0022c)	Reprime	-1,82	Induce solo a <i>rv1470</i>
	SigH (Rv3223c)	Reprime	-1,77	Induce a <i>rv1470</i> , <i>rv1471</i> y <i>rv1472</i>
	MosR (Rv1049)	Reprime	-1,54	Induce solo a <i>rv1471</i> y <i>rv1472</i>
	Rv1990c	Reprime	-1,27	No
	Rv0324	Reprime	-1,21	No
	SigE (Rv1221)	Reprime	-1,10	Induce solo a <i>rv1471</i>
	Rv0238	Reprime	-1,09	Reprime a <i>rv1470</i> , <i>rv1471</i> y <i>rv1472</i>
	Mce3R (Rv1963)	Reprime	-1,09	Reprime solo a <i>rv1470</i>
	PhoP (Rv0757)	Reprime	-1,08	No
	Hns (Rv3852)	Induce	1,05	No
CtpG	CmtR (Rv1994c)	Reprime	-2,15	Reprime a <i>rv1993c</i> e induce a <i>rv1994c</i>
	Rv0324	Reprime	-1,50	Reprime a <i>rv1993c</i> y <i>rv1994c</i>
	SirR (Rv2788)	Reprime	-1,36	Reprime solo a <i>rv1993c</i>
	Rv0081	Induce	1,26	Induce a <i>rv1993c</i> y <i>rv1994c</i>
	Rv0081	Induce	2,75	No
CtpJ	Rv0023	Induce	2,39	Induce a <i>rv3744</i>
	Rv0324	Induce	1,06	No
	Rv0967	Reprime	-1,99	Reprime a <i>rv0968</i> y <i>rv0970</i> e induce a <i>rv0967</i>
CtpV	SigC (Rv2069)	Induce	1,38	Induce a <i>rv0967</i> , <i>rv0968</i> y <i>rv0970</i>

Se encontró que la expresión de *ctpA* podría ser inducida al sobreexpresar el regulador transcripcional Rv0818. En el caso de *ctpB* se identifica nuevamente a SigC como inductor de la expresión. Para *ctpC* se encuentra nuevamente que el regulador Rv0324 reprime a ambos genes del su operón, y también se encuentran otros tres reguladores que podrían inducir *ctpC*; sin embargo, al comparar los valores de la relación de inducción, existiría una

mayor influencia en CtpC al sobreexpresar Rv0324. En el caso de CtpD, su expresión podría estar regulada por 11 reguladores transcripcionales, solo dos de ellos capaces también de afectar la expresión de los demás genes del operón de CtpD: SigH (un factor sigma de la ARN polimerasa) es capaz de reprimir la transcripción de *ctpD*, pero induce a los genes del operón; y la sobreexpresión de Rv0238 es capaz de reprimir la expresión de todos los genes del operón de *ctpD*.

Para *ctpG* se encontró que CmtR presenta el mayor valor de la relación de inducción. CmtR también es capaz de reprimir la transcripción de los genes que hacen parte del operón de CtpG, en este caso existiría una inducción del gen del regulador, ya que en la metodología del ensayo implícitamente se hace una previa sobreexpresión del regulador. En el caso de *ctpJ* se encontraron tres posibles reguladores transcripcionales, siendo Rv0081 el de mayor relación de inducción. Finalmente, para el caso de *ctpV* se presentaría inducción al sobreexpresar dos reguladores transcripcionales entre ellos se encuentra CsoR, que presenta el mayor valor de la relación de inducción y reprime la transcripción de los genes del operón de CtpV, e induciendo al gen del regulador, tal como se observó para el caso de CmtR (regulador de *ctpG*).

A partir de una integración de todas las búsquedas realizadas de los posibles reguladores transcripcionales, se proponen finalmente como reguladores de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis* los relacionados en la Tabla 6-6. Algunos genes de ATPasas tipo P_{1B} muestran varias opciones de reguladores, pero por practicidad el análisis transcripcional por qPCR bajo las diferentes condiciones de estrés se realizó solo con algunos de ellos. Normalmente se estudió solo con un regulador; sin embargo, en los casos de incertidumbre del posible regulador transcripcional, se probó uno adicional.

En conclusión, los criterios para la selección del regulador transcripcional a probar fueron: primero su ubicación genómica, si se encontraba en la vecindad del gen de la ATPasa tipo P_{1B} (como lo fueron los reguladores de CtpG, CtpJ y CtpV); segundo, si estos reguladores se relacionan con los genes que componen los operones en las ATPasas; tercero, si ellos se repetían en las diferentes estrategias de búsqueda (como los reguladores de CtpB, CtpC, y CtpD—con SigH). En el caso de CtpA se seleccionaron los dos reguladores que arrojó el servidor TB Network Portal [121], porque no existió algún criterio que discrimine entre los reguladores. En el caso específico de CtpD se seleccionó un regulador

transcripcional adicional, Rv0238, que es capaz de afectar los genes que componen al operón de la bomba. Durante la selección de reguladores transcripcionales de la ATPasa tipo P_{1B} no se descarta que las otras proteínas encontradas participen en la regulación transcripcional de las bombas.

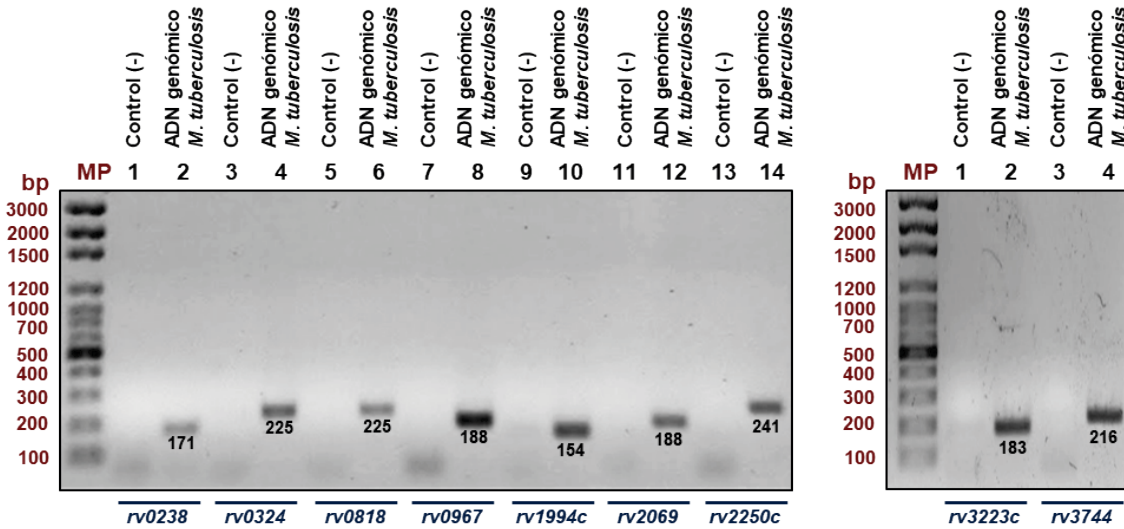
Tabla 6-6: Posibles reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}. Se reportan los reguladores transcripcionales que se seleccionaron para el presente estudio y se relaciona su función que fue obtenida del servidor tuberculist [119].

ATPasa tipo P _{1B}	Regulador transcripcional	Función descrita en el servidor tuberculist [119]
CtpA	Rv0818	Regulador transcripcional
	Rv2250c	Posible regulador transcripcional de la familia TetR
CtpB	SigC (Rv2069)	Factor sigma de la ARN polimerasa de la subfamilia ECF
CtpC	Rv0324	Posible regulador transcripcional de la familia ArsR
CtpD	SigH (Rv3223c)	Factor sigma alternativo involucrado en la respuesta a estrés oxidativo (regulación del reciclaje de tiorredoxina)
	Rv0238	Posible regulador transcripcional de la familia TetR
CtpG	CmtR (Rv1994c)	Represor transcripcional del operador-promotor CMT. Represión susceptible a Cd ²⁺ . Pertenece a la familia ArsR-SmtB
CtpJ	NmtR (Rv3744)	Represor transcripcional del operador-promotor NMTA. Represión susceptible a Ni ²⁺ y Co ²⁺ . Pertenece a la familia ArsR-SmtB
CtpV	CsoR (Rv0967)	Represor transcripcional del operón <i>cso</i> . Represión susceptible a Cu ⁺ . Pertenece a la familia CsoR.

6.2.2 Parámetros para el análisis transcripcional de los posibles reguladores de las ATPasas tipo P_{1B}

Teniendo ya definidos los genes de los reguladores a estudiar, se diseñaron los iniciadores para el análisis transcripcional por qPCR. En la Tabla 5-2 (Numeral 5.2.2) se muestran los iniciadores diseñados con el tamaño del producto esperado. La especificidad de estos iniciadores se comprobó mediante PCR convencional utilizando como molde ADN de *M. tuberculosis* H37Ra. Como se muestra en la Figura 6-12, el tamaño de los diferentes amplímeros obtenidos corresponden a los tamaños de banda esperados.

Figura 6-12: Comprobación por PCR de los iniciadores diseñados para el análisis transcripcional de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}. Productos de amplificación usando los iniciadores de los reguladores transcripcionales que fueron diseñados, y ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra como molde. Se muestran los tamaños de los amplímeros y en la parte inferior se relacionan los genes probados.



Una vez confirmado que los iniciadores amplificaran el producto esperado, se procedió a obtener las curvas de eficiencia para cada pareja de iniciadores y así asegurar que pueden ser empleados para el análisis por qPCR. Estas curvas fueron obtenidas a partir de diferentes cantidades de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra, estandarizando condiciones como la temperatura de anillaje, buscando obtener eficiencias cercanas a 2, y curvas de fusión que demuestran la especificidad la amplificación. La Tabla 6-7 muestra las condiciones de reacción de la qPCR, la temperatura de anillaje de cada juego de iniciadores y las eficiencias de reacción conseguidas. Las curvas de eficiencia obtenidas para cada juego de iniciadores fueron apropiadas para hacer el análisis transcripcional de los reguladores, información necesaria para conocer el comportamiento de ATPasas tipo P_{1B} bajo condiciones de estrés.

Tabla 6-7: Curvas de eficiencia de las parejas de iniciadores utilizados en el análisis por qPCR de los genes de los reguladores de las ATPasas tipo P_{1B}. Se reportan los iniciadores que fueron diseñados para el análisis transcripcional de los reguladores de las ATPasas tipo P_{1B}, mostrando los tamaños de los amplímeros esperados para cada uno de los juegos de iniciadores.

Gen	Iniciadores	T _{anillaje} (°C)	Eficiencia	R ²	Threshold
<i>rv0818</i>	RT-Rv0818-dir-2/RT-Rv0818-rev-2	60,0	1,94	0,991	5,657
<i>rv2250c</i>	RT-Rv2250c-dir/RT-Rv2250c-rev	59,0	2,00	0,992	8,782
<i>rv2069 (sigC)</i>	RT-Rv2069-dir/RT-Rv2069-rev	58,7	1,87	0,995	18,243
<i>rv0324</i>	RT-Rv0324-dir/RT-Rv0324-rev	58,9	1,92	0,991	14,606
<i>rv0238</i>	RT-Rv0238-dir-2/RT-Rv0238-rev-2	59,3	1,86	0,998	6,116
<i>rv3223c (sigH)</i>	RT-Rv3223c-dir/RT-Rv3223c-rev	58,2	1,97	0,992	16,722
<i>rv1994c (cmtR)</i>	RT-Rv1994c-dir/RT-Rv1994c-rev	58,0	1,81	0,990	10,637

<i>rv3744 (NmtR)</i>	RT-Rv3744-dir/RT-Rv3744-rev	58,9	1,92	0,991	4,485
<i>rv0967 (CsoR)</i>	RT-Rv0967-dir/RT-Rv0967-rev	58,2	1,89	0,981	6,237

6.2.3 Respuesta transcripcional de los reguladores transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B}

El comportamiento transcripcional de los posibles reguladores de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, se determinó bajo las mismas condiciones que produjeron cambios en la transcripción relativa de los genes de las ATPasas tipo P_{1B} posiblemente reguladas por ellos. Esta aproximación tenía como objeto de asegurar que si existe un cambio a nivel transcripcional del regulador, también se vea reflejado un cambio en la transcripción de la ATPasa posiblemente regulada por el regulador.

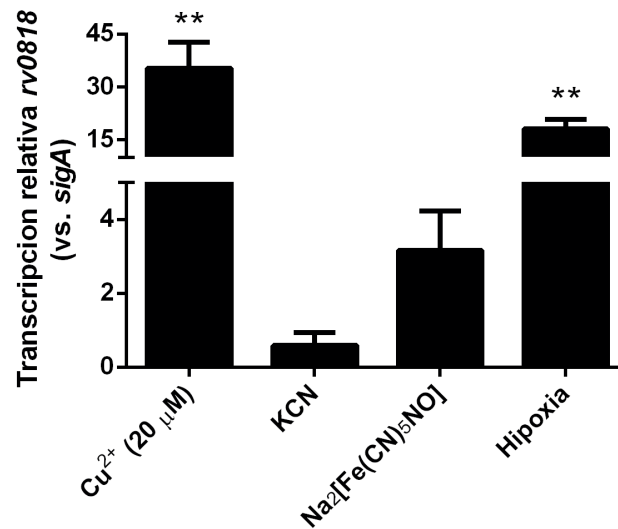
6.2.3.1 Rv0818 y Rv2250c: Reguladores transcripcionales de CtpA

Rv0818 y Rv2250c fueron los reguladores transcripcionales seleccionados a estudiar para CtpA. En la Figura 6-13 se muestra el análisis transcripcional para el gen *rv0818*. Se encontró un aumento en la transcripción del gen al someter las bacterias a condiciones de hipoxia y en la presencia de Cu²⁺ 20 µM y nitroprusiato de sodio, condiciones que también activaron un aumento de números de transcritos de *ctpA*. Esta relación entre Rv0818 y CtpA también se pudo evidenciar en los ensayos de TFOE, en los que al sobreexpresar *in vitro* a Rv0818 se induce 2,58 veces la transcripción de *ctpA* [121]. Por lo tanto, se puede concluir que existe una activación de la transcripción de *rv0818* bajo las condiciones de hipoxia y presencia de Cu, donde también se obtuvo un aumento en la transcripción de *ctpA* bajo las mismas condiciones.

El regulador Rv0818 es homólogo al regulador GlnR de *Streptomyces coelicolor*, y se ha relacionado en la respuesta a nitrógeno. En *M. tuberculosis* Rv0818 controla genes involucrados en la desintoxicación de óxido nítrico y genes relacionados con la supervivencia intracelular, razón por la que este gen se induce en presencia de nitroprusiato de sodio que es un donador de óxido nítrico. El motivo consenso de unión de GlnR [187] coincide con secuencias ubicadas en el entorno genómico de CtpA, específicamente en la posición -166 del gen (corriente arriba de *ctpA*) en la hebra antisentido (GAACGCGGGCCGAA; en rojo se resaltan nucleótidos de Rv0818 diferentes al consenso de GlnR). Esta secuencia indica que habría un potencial motivo de unión por

de Rv0818 en el entorno genético de *ctpA*, que además podría estar regulando su expresión.

Figura 6-13: Respuesta transcripcional de *rv0818* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *rv0818* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de Cu²⁺ 20 μM, KCN 1mM y nitroprusiato de sodio 1mM e hipoxia. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (***p*<0,01) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.

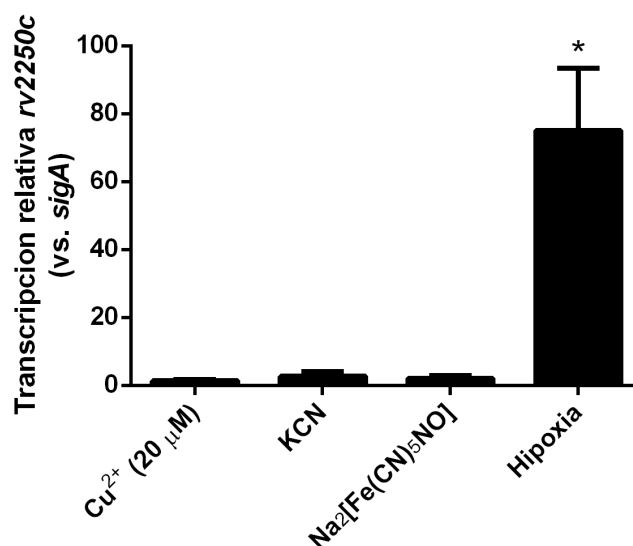


Por otro lado, el regulador transcripcional Rv2250c presentó una inducción de su transcripción bajo condición de hipoxia (Figura 6-14), sugiriendo que Rv2250c podría estar regulando la expresión de *ctpA* bajo esta condición. Según análisis por Chip-Seq, Rv2250c tiene un sitio de unión dentro del gen *ctpA* [121], localizado cerca al nucleótido 513. Actualmente se desconoce la secuencia consenso de reconocimiento de Rv2250c, sin embargo, es posible que la secuencia de reconocimiento en el gen *ctpA* sea CGGTCGG_IATCACGG (se subraya el nucleótido que coincide con la localización genómica de 101.096, región donde se une el regulador).

Se conoce que Rv2250c hace parte de la familia de reguladores TetR, caracterizados por reprimir en ausencia del agente inductor, que en el caso de Rv2250c se desconoce. Esta familia de reguladores es capaz de unirse al ADN por su región N-terminal, dejando al dominio C-terminal para interactuar con uno o más ligandos. Este tipo de reguladores también son capaces de interactuar con excepcional diversidad de moléculas que incluyen

antibióticos, metabolitos, y moléculas de señalización célula a célula [188]. Por tanto, el hecho de que Rv2250c de *M. tuberculosis* se active en hipoxia, sugiere que posiblemente este regulador sea capaz de reconocer metabolitos relacionados con la adaptación a un ambiente de baja contenido de oxígeno. A diferencia del regulador Rv0818, que se indujo bajo las mismas condiciones que CtpA, el regulador Rv2250c solo presentó una activación bajo condiciones de hipoxia; posiblemente ambos reguladores estén involucrados en la regulación transcripcional del gen *ctpA*, pero en el caso de Rv2250c este solo estaría regulando en condiciones donde la bacteria se enfrenta a un bajo contenido de oxígeno.

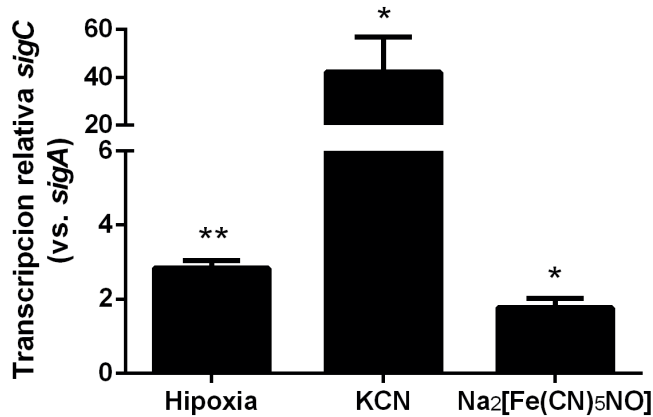
Figura 6-14: Respuesta transcripcional de *rv2250c* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *rv2250c* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Cu^{2+} 20 μM , KCN 1mM y nitroprusiato de sodio 1mM e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



6.2.3.2 SigC: Regulador transcripcional de CtpB

El factor sigma SigC que estaría regulando a nivel transcripcional a *ctpB*, fue analizado bajo las condiciones de hipoxia y la presencia de los agentes de estrés redox KCN y nitroprusiato de sodio. La Figura 6-15 muestra el resultado obtenido, encontrando efectivamente que *sigC* al igual que *ctpB* es inducido bajo las condiciones consideradas.

Figura 6-15: Respuesta transcripcional de *sigC* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *sigC* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de KCN 1mM y nitroprusiato de sodio 1mM e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$ y $**p < 0,01$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



El resultado anterior indica que al estar la bacteria bajo estas condiciones de estrés, el factor sigma SigC se sobreexpresa y facilita su unión en la región promotora de *ctpB* aumentando su transcripción. La secuencia de reconocimiento de SigC de *M. tuberculosis* es GGGAAC – (17pb) – CGACT [189], también se encuentra corriente arriba del gen *ctpB* en la posición -41, junto a la secuencia GGGAACCGATTACCGCCTGCTTACGACT. Otra evidencia de que este factor podría estar regulando la expresión de CtpB, son los resultados de TFOE donde la sobreexpresión *in vitro* de SigC induce 2,20 veces la transcripción de *ctpB* [121]. Este análisis se puede comparar con la inducción transcripcional de *sigC* bajo las condiciones de hipoxia y presencia de KCN y nitroprusiato de sodio, estas condiciones también activaron la transcripción de *ctpB*.

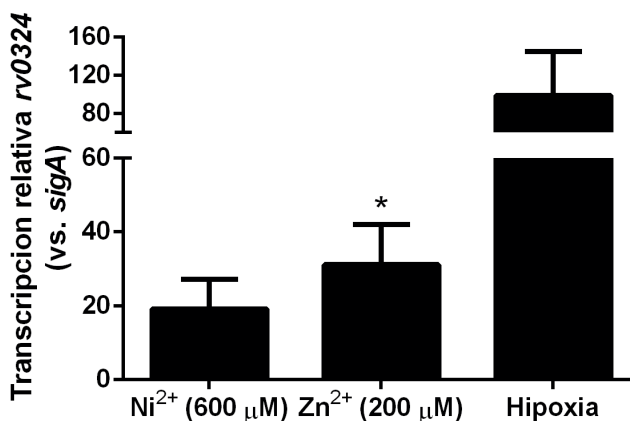
6.2.3.3 Rv0324: Regulador transcripcional de CtpC

En el caso de Rv0324 que posiblemente regula la transcripción del gen *ctpC*, su transcripción relativa es inducida en presencia de Ni²⁺, y Zn²⁺ en un mayor grado (Figura 6-16). Además, se observó un aumento significativo en la transcripción de *rv0324* bajo condiciones de hipoxia. En este caso las condiciones de activación de *rv0324* coinciden con las condiciones de activación de la transcripción del gen *ctpC*. En este orden de ideas, estas tres condiciones de estrés podrían ser agentes inductores.

Al ser Rv0324 un regulador que pertenece a la familia de proteínas metaloregulatorias ArsR, se trata entonces de represores que en ausencia del agente inductor están unidos al ADN, inhibiendo la expresión de genes [180]. La presencia del inductor se produce una derepresión permitiendo la transcripción de genes. Además, esta familia de reguladores es capaz de controlar su propia expresión funcionando como autorepresor.

La familia de reguladores ArsR se han asociado la desintoxicación de diferentes metales, al sensar la concentración del metal y regulando la transcripción de genes relacionados con la desintoxicación [106]. También, se han encontrado reguladores ArsR que relacionados con procesos de regulación en producción de pigmentos, toxinas, esporulación y formación de biopelículas [190].

Figura 6-16: Respuesta transcripcional de *rv0324* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *sigC* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Ni^{2+} 600 μM , Zn^{2+} 200 μM e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.

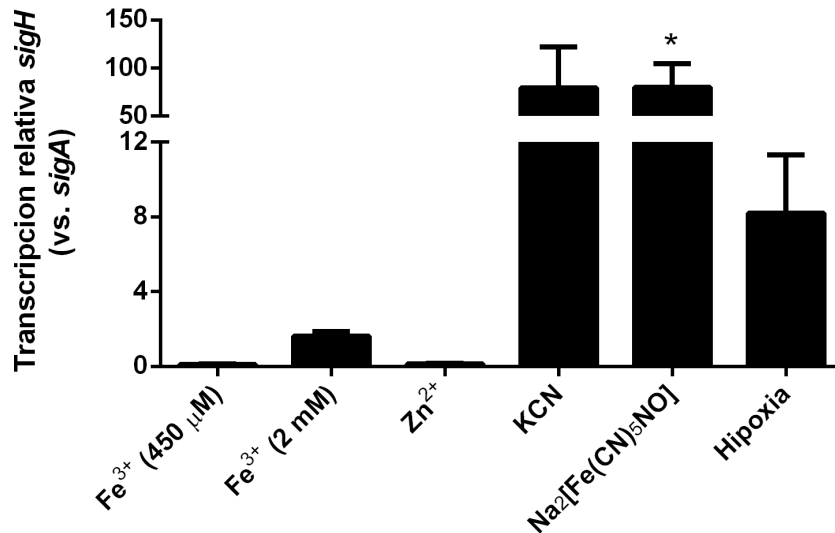


En este orden de ideas, los resultados obtenidos podrían sugerir que posiblemente la proteína Rv0324 esté regulando la expresión de CtpC y también su propia expresión, para lo que necesitaría entonces diferentes sitios de unión en el genoma. La inducción de Rv0324 en hipoxia, también sugeriría que este regulador podría responder a condiciones diferentes a la presencia de cationes de metales pesados, funcionando como un regulador ArsR no canónico. La respuesta de Rv0324 a la hipoxia, se había reportado previamente [191].

6.2.3.4 SigH y Rv0238: Reguladores transcripcionales de CtpD

En el caso de *sigH* (Rv3223c), el posible regulador transcripcional de CtpD, su transcripción se activó bajo condiciones de estrés redox, por la presencia de KCN y nitroprusiato de sodio, y en menor medida bajo condiciones de hipoxia (Figura 6-17). Estas condiciones también activaron el gen *ctpD*. Se debe destacar que no se encontró una inducción de la transcripción de *sigH* en presencia de Fe³⁺.

Figura 6-17: Respuesta transcripcional de *sigH* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *sigH* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Fe, Zn, KCN, nitroprusiato de sodio e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



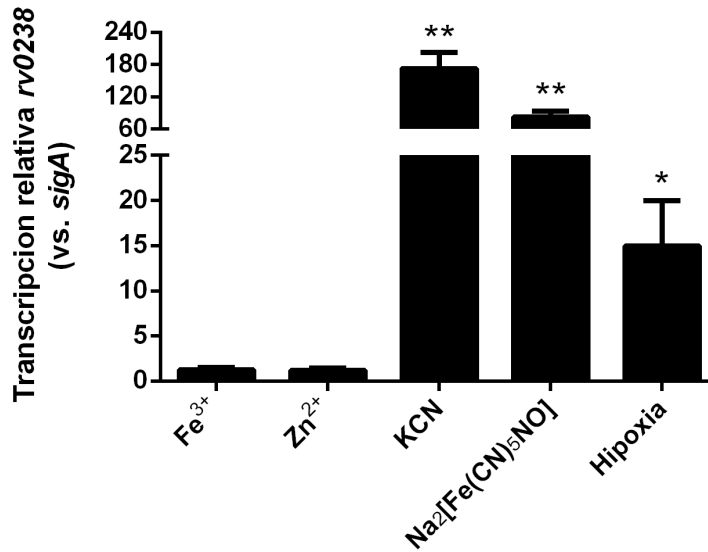
El factor sigma SigH de *M. tuberculosis* es inducido por estrés oxidativo de tioles, choque térmico y fagocitosis [192, 193]. Esto confirma el resultado obtenido en nuestro análisis donde se observó un aumento de la transcripción de *sigH* en presencia de agentes de estrés redox. Entonces, si las mismas condiciones activan la transcripción de los genes *sigH* y *ctpD*, permite suponer que SigH podría estar controlando la transcripción de *ctpD* y los genes de su operón. En estudios previos se ha encontrado que SigH afecta la expresión de *trxB1*, una tiorredoxina que hace parte del operón donde se ubica CtpD [192], lo que permite pensar que SigH también regularía a CtpD. La secuencia de reconocimiento de SigH [189, 194], que mejor se acomodó en la región promotora de CtpD es

GGTCGTCTGGGCCGCCGCGGCCGAGTTG, ubicada en la -324 de gen *ctpD*; comprobando la posible regulación de CtpD por SigH.

También se consideró el regulador transcripcional Rv0238, en el control transcripcional del gen *ctpD*. El análisis transcripcional del gen *rv0238* mostró una activación en presencia de KCN, nitroprusiato de sodio e hipoxia, en menor media (Figura 6-18), las mismas condiciones en que se activó *ctpD*. Durante la selección del regulador de CtpD, se tomó como criterio que el regulador afecte a los genes de su operón y reportados por TFOE [121]. Los reguladores SigH y Rv0238 cumplían esta condición; sin embargo, por lo reportado por TFOE la sobreexpresión *in vitro* de Rv0238 reprime la expresión de los genes del operón *ctpD*. Por el contrario, nuestro análisis indica que tanto el gen *ctpD* y *rv0239* tienen un aumento en la transcripción bajo las mismas condiciones. Aunque los resultados obtenidos por ambas metodologías son contradictorias (como en los casos de CtpA-Rv0818 y CtpB-SigC), al mismo tiempo podrían ser complementarias, toda vez que mientras en TFOE se sobreexpresa *in vitro* el regulador para determinar su efecto en la transcripción de otros genes, en nuestro análisis las bacterias se someten a una condición que hace que se expresen proteínas de respuesta y no solo el regulador transcripcional.

Actualmente se desconoce la secuencia reconocida por Rv0238, al igual que el locus donde se une, lo que no permite saber si el regulador interactuaría en la cercanía del gen *ctpD*. Se conoce que Rv0238 hace parte a la familia de reguladores transcripcionales TetR, funcionando como represor en ausencia del agente efector [188]. Por tanto, con los resultados obtenidos en el análisis transcripcional del presente trabajo se podría sugerir que Rv0238 está involucrado con una respuesta a estrés redox e hipoxia, posiblemente siendo sensado por metabolitos relacionados con la adaptación a estas condiciones de estrés.

Figura 6-18: Respuesta transcripcional de *rv0238* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *rv0238* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Fe³⁺, Zn²⁺, KCN, nitroprusiato de sodio e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas (* $p < 0,05$ y ** $p < 0,01$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.

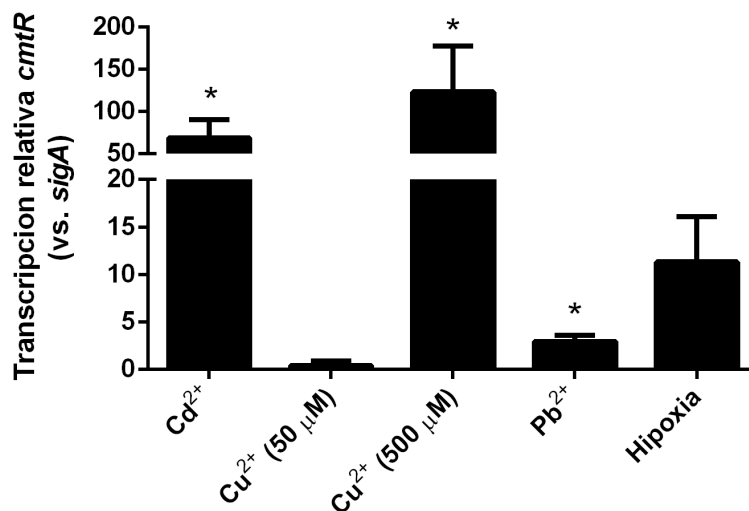


6.2.3.5 CmtR: Regulador transcripcional de CtpG

CmtR presentó un aumento en la transcripción de su gen en presencia de Cd²⁺ y Cu²⁺; también se observó en menor medida una inducción con Pb²⁺ e hipoxia (Figura 6-19), condiciones que también indujeron a *ctpG*. Al pertenecer ambos genes al operón *cmtR-Rv1993c-ctpG* [173], es de esperar que los genes que lo componen se expresen como un único transcrito, por tanto la inducción de la transcripción de alguno de estos genes afecta en la misma medida a los demás genes; explicando el mismo comportamiento transcripcional de CmtR y CtpG.

CmtR pertenece a la familia ArsR y hace parte del grupo de reguladores que sensan Cd²⁺ y Pb²⁺ [172], y controla la expresión del operón *cmtR-Rv1993c-ctpG* [173], por lo que es capaz autoregular su expresión. Mediante ensayos de movilidad electroforética se ha encontrado que CmtR se disocia parcialmente del ADN en presencia de Cd²⁺ 10 μM, y no reacciona en presencia de Pb²⁺ [173]. Previamente no se había relacionado a CmtR con el Cu²⁺, pero nuestros resultados arrojan que bajo concentraciones tóxicas de Cu²⁺ (500 μM) existe una activación de la transcripción de CmtR. Sin embargo, Ward y colaboradores [11] observaron un aumento en la transcripción del gen *ctpG* al intoxicar *M. tuberculosis* con 500 μM de Cu²⁺. También se había reportado por experimentos de microarreglos que CmtR se induce en hipoxia [97].

Figura 6-19: Respuesta transcripcional de *cmtR* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *cmtR* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Cd^{2+} , Cu^{2+} , e hipoxia. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



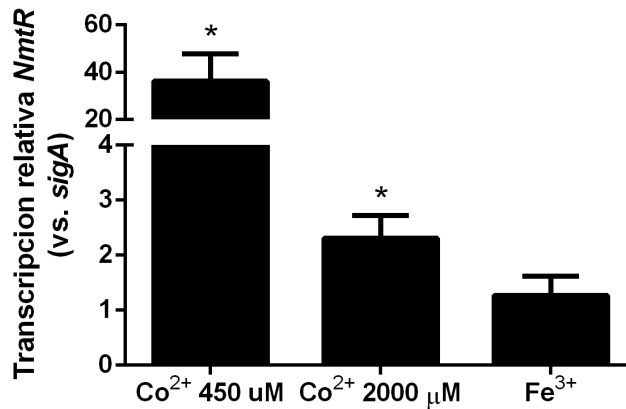
Se conoce que el regulador CmtR hace parte de la familia ArsR y presenta sitios de unión a Cd^{2+} y Pb^{2+} . Por tanto, con los resultados obtenidos del análisis transcripcional del presente trabajo podrían sugerir que CmtR está involucrado con una respuesta a estrés redox e hipoxia, posiblemente siendo sentido por metabolitos relacionados con la adaptación a estas condiciones de estrés.

6.2.3.6 NmtR: Regulador transcripcional de CtpJ

La transcripción de NmtR se induce en presencia de Co^{2+} y no en presencia de Fe^{3+} (Figura 6-20). Este resultado corrobora que el regulador es sensible a Co^{2+} y no a Fe^{2+} [106], y está regulando su propia expresión. Es posible pensar que NmtR induce la transcripción de *ctpJ* EN presencia de Co^{2+} . Aunque ellos no hagan parte de un mismo operón se encuentran cercanos en el genoma y comparten la misma región promotora. En nuestro caso Co^{2+} se uniría a NmtR separándolo del ADN y permitiendo la transcripción de *ctpJ* y *nmtR*.

Figura 6-20: Respuesta transcripcional de *nmtR* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *nmtR* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: Presencia de Co^{2+} 450 μM , 2000 μM y Fe^{3+} . Los datos

se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



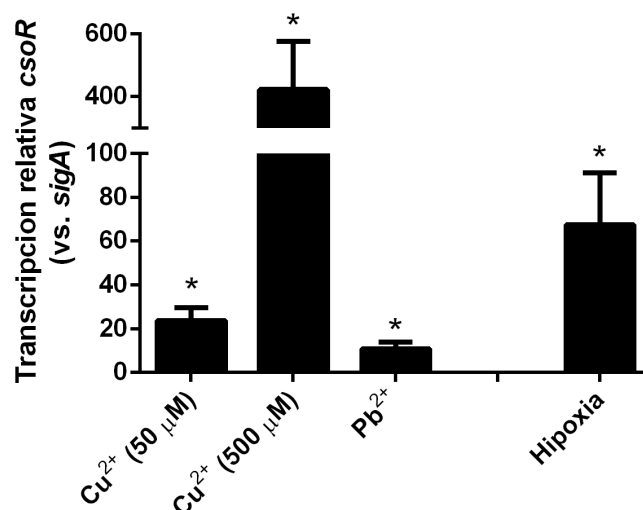
6.2.3.7 CsoR: Regulador transcripcional de CtpV

La expresión del regulador CsoR es dosis dependiente del Cu²⁺ (Figura 6-21). De manera similar la transcripción del gen *ctpV* es activada por Cu, coincidiendo con los resultados previamente obtenidos por Ward y colaboradores [11]. La transcripción de CsoR también se indujo en presencia de Pb, lo también observado para CtpV en el presente estudio. En hipoxia se encontró que hay una inducción en la transcripción del gen *csoR* sugiriendo que la expresión del regulador y por ende de la ATPasa son dependientes de estas tres condiciones: la concentración de Cu, Pb e hipoxia. Al pertenecer al mismo operón, la respuesta transcripcional del regulador y el gen podría ser la misma.

Mediante nuestro análisis se encontraron resultados contrarios a TFOE, donde al sobreexpresar *in vitro* a CsoR se obtiene hay una represión de -1,99 para el gen *ctpV* y los genes del operón *cso* [121]. Esta divergencia podría ser parcialmente explicada porque al sobreexpresar CsoR como una proteína recombinante se está produciendo el regulador sin el Cu⁺, por tanto, va unirse al ADN y reprimir los genes del operón. Mientras que en presencia de Cu⁺ el regulador se une al metal y se separa del ADN permitiendo la transcripción del operón *cso*, en el que se encuentran los genes *csoR* y *ctpV* [183]. Esto explicaría porque la presencia de Cu²⁺ resulta en una inducción de ambos genes.

Figura 6-21: Respuesta transcripcional de *csoR* a condiciones de estrés. Se relacionan la transcripción relativa de *csoR* usando como normalizador *sigA*. Se analizaron diferentes condiciones de estrés: presencia de Co²⁺ 450 μ M, 2000 μ M y Fe³⁺. Los datos se

grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se hicieron comparando los valores en presencia de la condición de estrés y el control de ausencia.



6.3 Análisis funcional de las ATPasas tipo P_{1B-1} de *M. tuberculosis*

Con el fin de indagar la posible función de las tres ATPasas tipo P_{1B-1}, o Cu⁺ ATPasas y su papel en la respuesta a las condiciones de estrés que la micobacteria se enfrenta durante la infección, se hizo un estudio funcional de las tres enzimas para evaluar el comportamiento de su actividad enzimática. Este análisis se hizo mediante un estudio bioinformático de CtpA, CtpB y CtpV, acompañado de una caracterización funcional mediante ensayos de viabilidad, actividad ATPasa y transporte de Cu⁺.

6.3.1 Análisis bioinformático de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*: CtpA, CtpB y CtpV

En el genoma de *M. tuberculosis* se codifican tres ATPasas tipo P posibles transportadoras de Cu⁺: *ctpA*, *ctpB* y *ctpV*. Estos tres genes tienen una longitud aproximada de 2300 pb y poseen unidades transcripcionales y localización genómica diferente (Tabla 6-8). El gen *ctpV* pertenece al operón policistrónico *cso* “*copper-sensitive operon*”, que incluye los genes *csoR*, *rv0968*, *ctpV* y *rv0970* [195]. Este operón, está bajo el control del regulador transcripcional CsoR, de respuesta a Cu⁺ [195]. Las proteínas codificadas por *rv0968* y *rv0970* son de función desconocida, la primera siendo una metalo-chaperona putativa y la

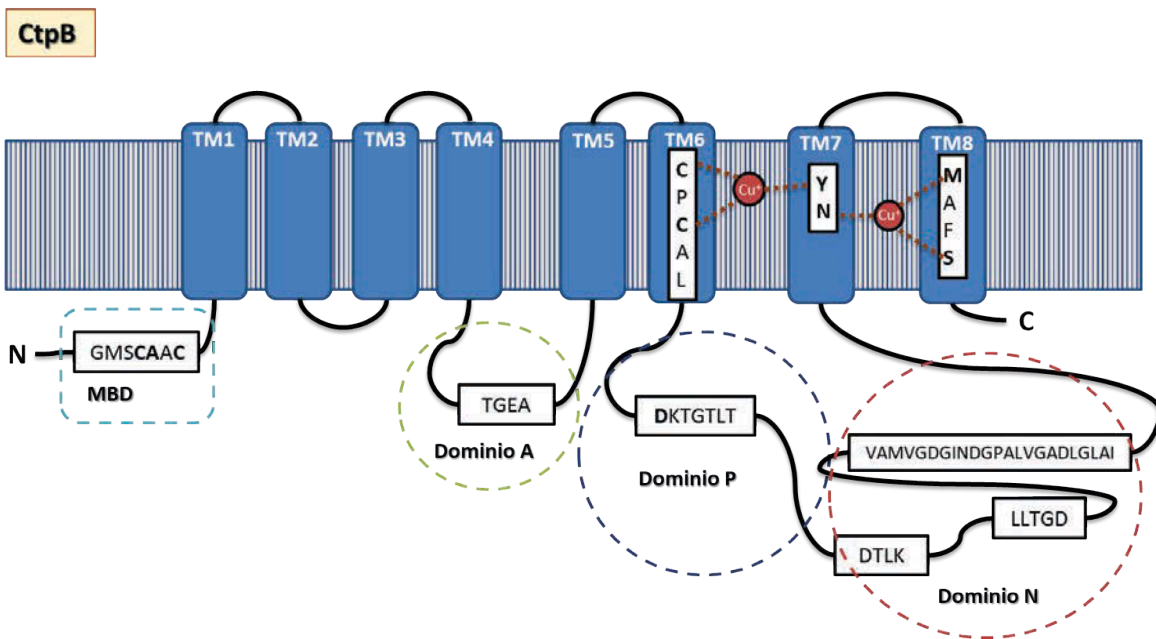
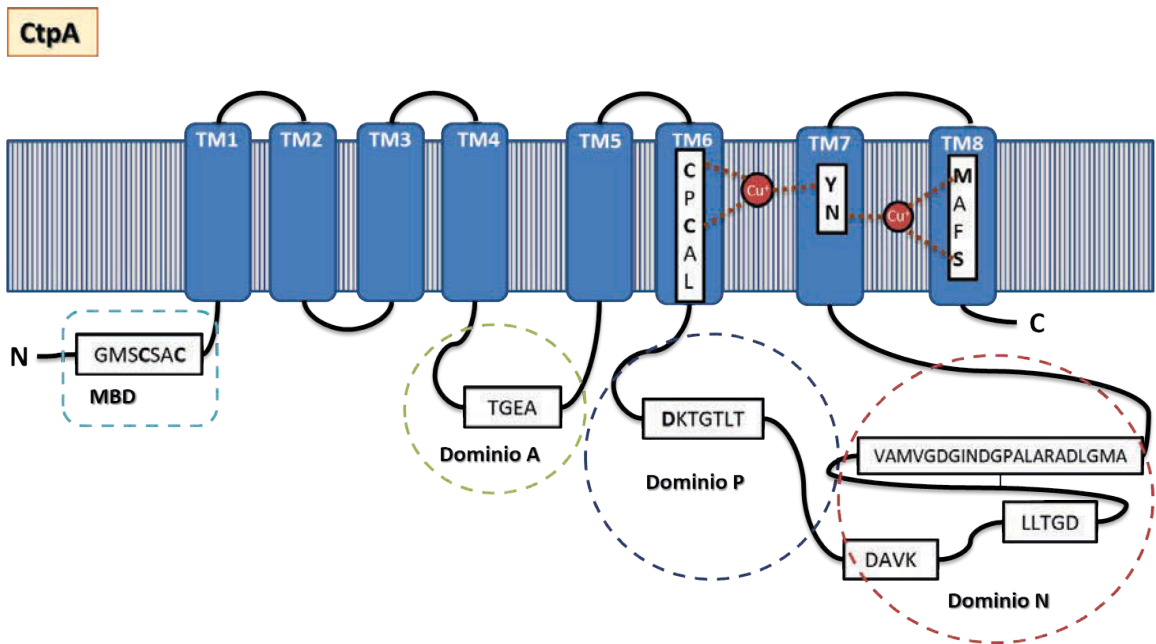
segunda anotada como una posible proteína de membrana. De manera interesante, *csoR* hace parte del regulón de PhoP, un regulador transcripcional fundamental para la virulencia de *M. tuberculosis* [196].

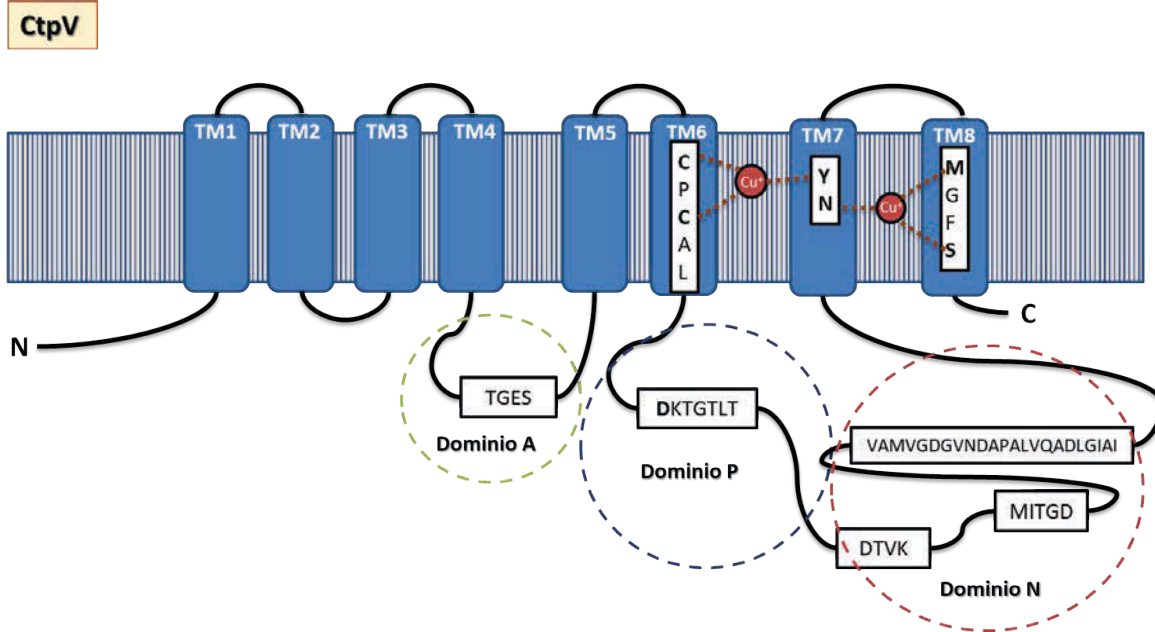
Tabla 6-8: Características a nivel de gen y proteína de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* [119].

Proteína	Gen	Localización genómica	Tamaño del gen (pb)	Longitud de proteína (# aa)	Peso molecular (Da)
CtpA	<i>ctpA</i> (<i>rv0092</i>)	100.583	2286	761	78850,7
CtpB	<i>ctpB</i> (<i>rv0103c</i>)	119.915	2259	752	77477,4
CtpV	<i>ctpV</i> (<i>rv0969</i>)	1.078.740	2313	770	80102,5

Las proteínas codificadas por *ctpA*, *ctpB* y *ctpV* tienen una longitud cercana a 760 aa y un peso molecular aproximado de 78 kDa (Tabla 6-8). Estas proteínas pertenecen a la familia de las ATPasas tipo P clasificadas como hidrolasas de anhídridos ácidos (EC 3.6.3.-) ubicadas en la membrana plasmática. Está reportado que CtpV se encarga del transporte de Cu⁺. Las tres proteínas exhiben todos los dominios funcionales de las ATPasas tipo P, con un arreglo de 8 segmentos transmembranales (TM) organizados en una topología tipo I, característica de enzimas tipo P_{1B} (Figura 6-22) [55]. Entre los segmentos TM4-5 y TM6-7 se ubican bucles donde se localizan los tres dominios citoplasmáticos característicos de ATPasas tipo P (A: actuador, P: fosforilación y N: unión a nucleótido) que incluyen los motivos conservados para esta familia de proteínas (Figura 6-22) [18]. Como “*bucle*” se hace referencia a secciones de la proteína que interconectan las hélices TM.

Figura 6-22: Topología, motivos funcionales y dominios de las Cu⁺ ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*. La topología predicha de las proteínas CtpA, CtpB y CtpV muestra la existencia de 8 hélices TM (1 a 8), con los extremos N- y C-terminales localizados en la cara citoplasmática de la bicapa lipídica. Se muestran los motivos funcionales característicos de las ATPasas tipo P_{1B}. En el caso de los motivos localizados en las regiones TM 6, 7 y 8 se señalan los residuos encargados de la coordinación del catión. Los dominios citoplasmáticos son señalados por líneas puntadas con su respectivo nombre. En el caso de CtpA y CtpB se encuentra un dominio citoplasmático adicional conocido como MBD que puede unir Cu⁺ a través de los residuos de Cys.



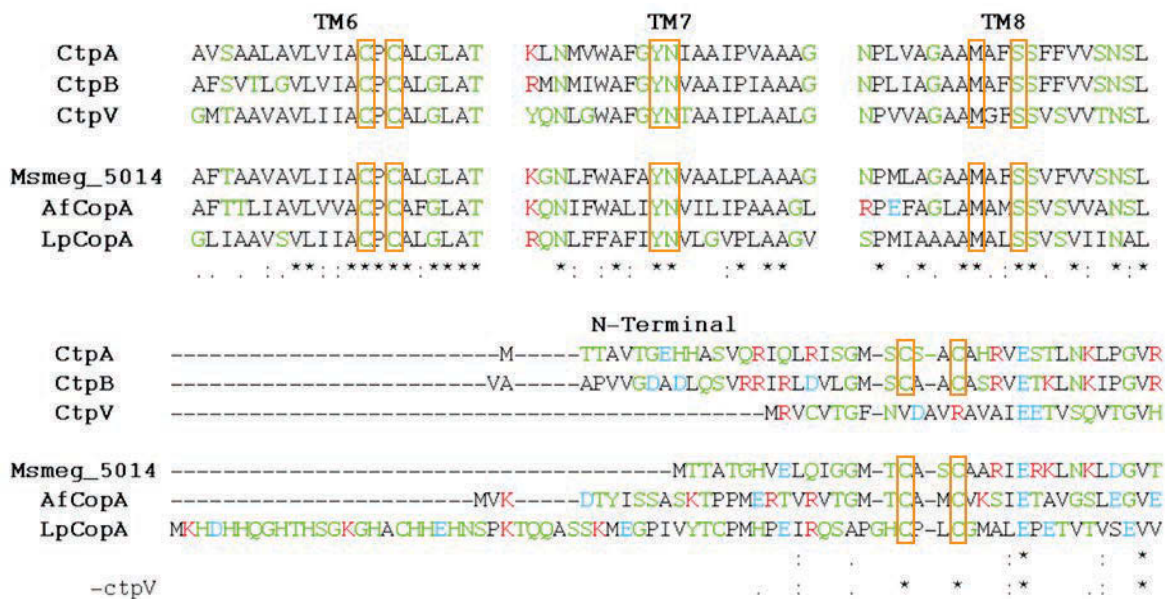


El análisis de motivos funcionales utilizando el servidor *InterProScan* [123] mostró que se trata de ATPasas tipo P, posibles transportadoras de metales pesados, y muy probablemente Cu. Este programa no confirma la especificidad del ion, ni la existencia de los 9 motivos característicos de esta familia de enzimas [55]. En nuestro grupo de investigación, “*Bioquímica y biología Molecular de las Micobacterias de la Universidad Nacional de Colombia*”, previamente se realizó la búsqueda de estos motivos, permitiendo su localización. En algunos casos encontramos diferencias sutiles respecto a la secuencia consenso reportada por Thever y Saier [124]. La Figura 6-22 muestra los motivos encontrados para CtpA, CtpB y CtpV, los que incluyen: TGES asociado con la actividad fosfatasa; CPCAL localizado en el segmento TM6 aportando los residuos de Cys necesarios para coordinar al catión [33]; DKTGTLT que aporta el sitio de fosforilación y se ubica en el bucle mayor citoplasmático entre los TM4 y TM5; los motivos DTVK y LLTGD que catalizan la transferencia del grupo fosfato a la enzima; finalmente el motivo conocido como Bisagra (VAMVGDGINDGPALVRADLGMAI) que provee la flexibilidad necesaria para los cambios conformacionales que acompañan el ciclo catalítico de la enzima [18].

La función de las enzimas se puede predecir por la ubicación y propiedades de los aminoácidos en su secuencia [197]. En el caso de las ATPasas tipo P, los aminoácidos que se encargan en discriminar el catión a ser transportado deben poseer un bolsillo de unión con el espacio adecuado para unir el ion con la geometría, tamaño y carga, características de la esfera de coordinación del metal. Estos residuos que se encargan de

coordinar el metal se localizan cerca del centro de la bicapa lipídica en los TM que hace parte del dominio de transporte (TM6, 7 y 8) [17]. Particularmente, las ATPasas transportadoras de cationes de metales pesados unen los cationes mediante átomos de oxígeno y azufre, de grupos hidroxilo, carboxilo o sulfihídrido de cadenas laterales [33]. Teniendo en cuenta lo anterior, en este trabajo se realizó un alineamiento entre las hélices TM6-8 y la región N-terminal de las Cu⁺ ATPasas putativas de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, con las Cu⁺ ATPasas caracterizadas con estructura tridimensional conocida: CopA de *A. fulgidus* (Af) y *L. pneumophila* (Lp) (Figura 6-23) (Se seleccionaron estas ATPasas porque se conoce su estructura tridimensional y los residuos encargados de la coordinación con el Cu⁺). Todas las secuencias poseen los tres motivos característicos de las Cu⁺ ATPasas: CPC, YN y MXXS ubicados en las TM6, 7 y 8, respectivamente. En estos motivos se encuentran los seis aminoácidos encargados de la coordinación del Cu⁺ [198].

Figura 6-23: Alineamiento múltiple de hélices TM6, TM7 y TM8 y región N-terminal de las Cu⁺ ATPasas. Predicción de las hélices TM usando la herramienta TOPCONS [122]. El alineamiento múltiple de TM6, TM7 y TM8 de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* con sus contrapartes en otras bacterias caracterizadas a nivel de proteína, se construyó en base a los resultados del programa Clustal OMEGA [125]. Los aminoácidos involucrados en la coordinación de Cu⁺ se resaltan con recuadros naranja.



En la Cu⁺ ATPasa tipo P de *L. pneumophila* (LpCopA), el sitio I de unión al catión es formado por Cys³⁸², Cys³⁸⁴, y Tyr⁶⁸⁸ y el sitio II por Asn⁶⁸⁹, Met⁷¹⁷ y Ser⁷²¹ [199]. De forma interesante, CtpA, CtpB y CtpV exhiben todos los residuos involucrados en la coordinación de Cu⁺ presentes en LpCopA (Figura 6-23). La coordinación del Cu⁺ en sistemas proteicos

la hacen por lo menos tres enlaces de coordinación [33], lo que significa que estas ATPasas al tener 6 residuos que aportan un enlace de coordinación con el Cu⁺, son capaces de coordinar y transportar dos iones durante cada ciclo catalítico.

Adicional a los sitios de unión del catión en las hélices TM, algunas ATPasas tipo P_{1B} contienen dominios citoplasmáticos de unión al metal (MBD, siglas en inglés) en el extremo N-terminal [91]. Particularmente en *M. tuberculosis*, se observó que CtpA y CtpB tienen el motivo característico GMSC(S/A)AC de este dominio, donde las Cys son las encargadas de coordinar el Cu⁺.

La función del dominio MBD en las bombas de CtpA y CtpB es desconocida. Sin embargo, se presume que en procariotas este dominio presenta una de estas funciones: inhibir la actividad enzimática cuando el metal se encuentra ausente, o transferir el catión a los sitios de unión de metal localizados en las hélices TM (función análoga a las metalochaperonas) [91]. En el caso de las chaperonas de Cu⁺, como CopZ de *A. fulgidus*, se conoce que ellas son capaces de interactuar con las ATPasas tipo P_{1B} por medio de la región conocida como plataforma electrostática, la interacción entre las proteínas se da porque la segunda hélice de la chaperona tiene una densidad de carga negativa [147]. Esta característica de las chaperonas permite hacer una aproximación para conocer si los MBD de la Cu⁺ ATPasas presentan esta función chaperona, evaluando la densidad de carga en la región que interactúa con esta plataforma; tal como lo sugerido en sus estudios Drees y colaboradores [91]. Para este efecto, en este trabajo construimos los modelos de estructura terciaria por homología de los MBD de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *E. coli* (Tabla 6-9).

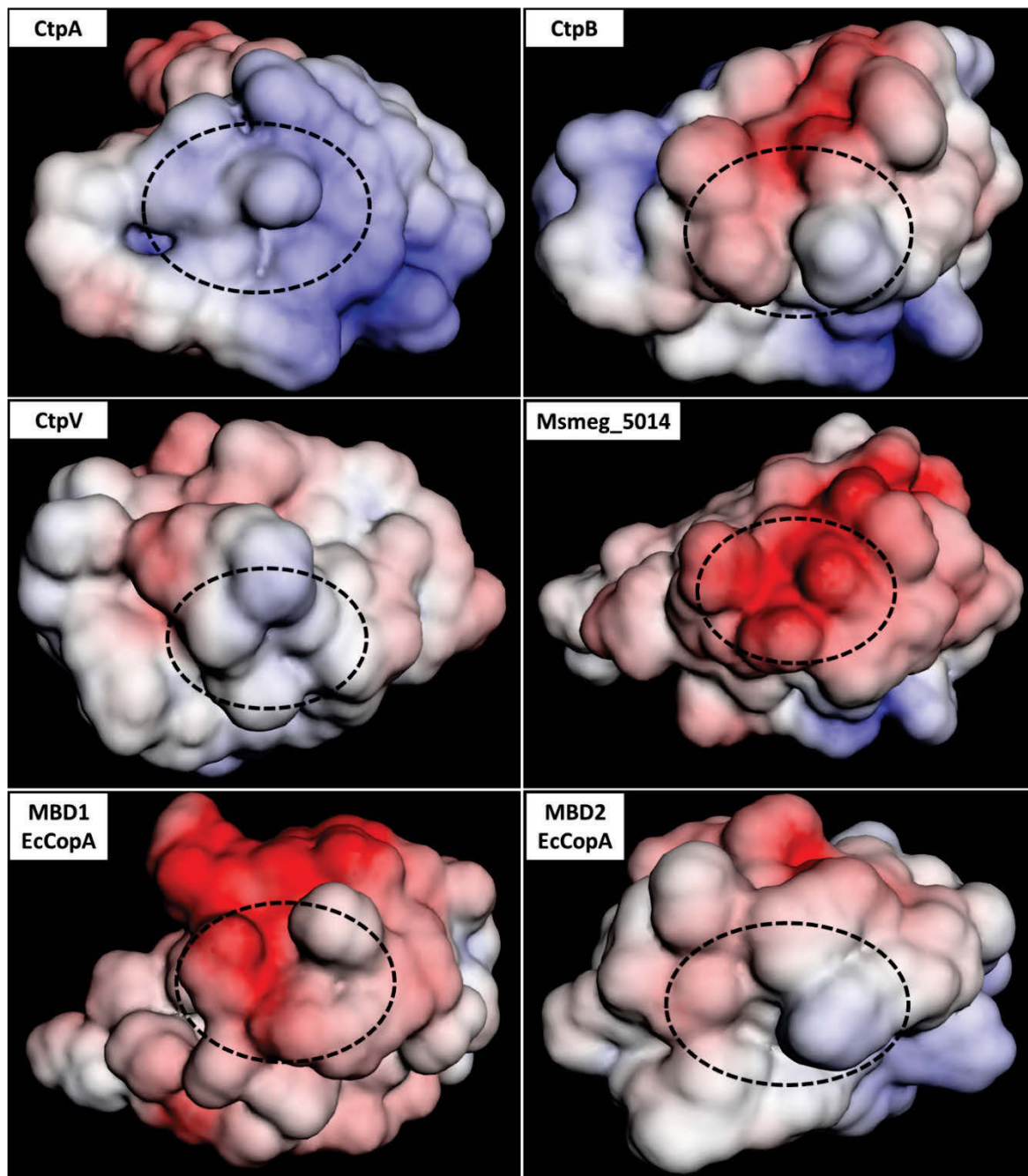
La Figura 6-24 muestra los mapas de potencial electrostático calculados al usar el portal web PDB2PQR [134] para cada uno de los MBD de CtpA, CtpB, CtpV, Msmeg_5014, MBD1 y MBD2 *EcCopA* (*CopA* de *E. coli*).

Tabla 6-9: Parámetros del modelamiento de estructura terciaria por homología de los MBD de las Cu⁺ ATPasas. Moldes usados para la construcción del modelo de cada MBD, identificando la proteína molde y su código PBD. Los resultados de porcentaje de identidad y calidad del modelo usando el Global score del programa ProQ2, también son registrados para cada modelo construido.

MBD	Molde	PDB ID	% Identidad	Global score
CtpA	MBD N-terminal de PacS de <i>Synechocystis</i> sp. PCC6803 (Cadena A)	2GCF	37	0,548
CtpB	MBD-1 N-terminal de CopA de <i>Bacillus subtilis</i> (Cadena A)	1P6T	42	0,608
CtpV			28	0,574
Msmeg_5014			41	0,740
MBD1-EcCopA	MBD-4 N-terminal de ATP7A de <i>Homo sapiens</i> (Cadena A)	2AW0	30	0,779
MBD2-EcCopA	MBD-4 de TTHA1718 de <i>Thermus thermophilus</i> HB8 (Cadena A)	2ROG	48	0,577

La interacción entre la plataforma electrostática de las ATPasas tipo P_{1B} y las chaperonas de Cu⁺, está dada por la segunda hélice del motivo ferredoxina [147]. En el caso de los MBD que se comportan como chaperonas, esta segunda hélice sería la encargada de esta interacción, la que se caracteriza por presentar una densidad de carga negativa sobre un residuo de Glu, que en un mapa de potencial electrostático se representa con color rojo [91]. Al analizar los mapas de potencial electrostáticos de los MBD considerados (Figura 6-24) se encuentra que los dominios de Msmeg_5014 y MBD1-EcCopA tienen un comportamiento de chaperona, por presentar una densidad de carga negativa en la región del residuo de Glu. Por su parte, los MBD de CtpA, CtpB, CtpV y MBD2-EcCopA tienen una densidad de carga positiva (color azul) en la cercanía del residuo de Glu, indicando que estos dominios se comportan como un MBD que regula la actividad catalítica de la proteína. Estos resultados concuerdan con los mapas obtenidos para los MBD de EcCopA, y son comparables con lo publicado por Drees y colaboradores, en donde el MBD1 tiene función de chaperona y MBD2 función regulatoria [91]. Por lo tanto, esta aproximación bioinformática sugiere que los MBD de CtpA y CtpB tienen función regulatoria y el MBD de Msmeg_5014 función de chaperona. Sin embargo, para poder comprobar esta función se hace necesario hacer ensayos bioquímicos que corroboren la predicción bioinformática. En contraste, no es posible afirmar que el MBD de CtpV tenga una función regulatoria, ya que no muestra los motivos característicos de unión de Cu⁺.

Figura 6-24: Mapa de potencial electrostático de los MBD de las Cu⁺ ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* y *E. coli*. El mapa de potencial electrostático de los MBD señala la región cercana al Glu de la segunda hélice (señalado en líneas punteadas negras). La superficie de color rojo indica carga negativa, gris corresponde a áreas neutras y azul a cargas positivas.



Por otra parte, la estructura terciaria de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis* se modelaron por homología usando el servidor Phyre² [127]. En la Tabla 6-10 se muestran los moldes usados y los resultados de los modelos construidos. Para las tres proteínas se utilizó como molde CopA, la Cu⁺ ATPasa tipo P de *A. fulgidus* (PDB ID 3J09 cadena A, estructura

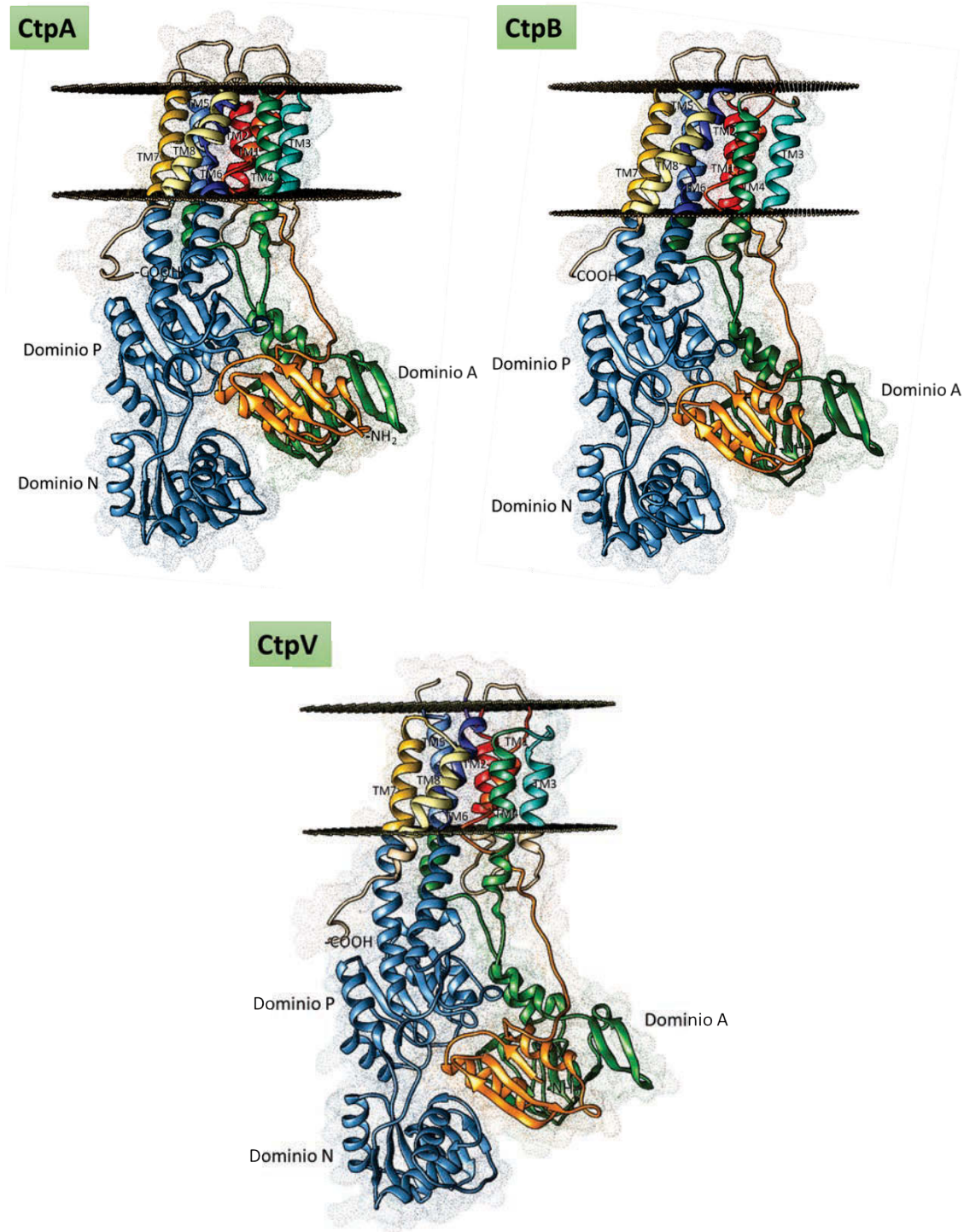
determinada por microscopía crio-electrónica con una resolución de 10,00 Å [128]), con porcentajes de identidad entre 36 y 45%, y coberturas de secuencia modelada cercanas al 93 %. Las validaciones de los modelos arrojan valores de Z-score entre -3,197 y -3,126, sugiriendo una buena calidad para una proteína de membrana [129, 130]. La calidad de los modelos se corroboró usando el servidor ProQ2, obteniendo valores de Global score cercanos a 1 que indican que los modelos son de una buena calidad [131].

Tabla 6-10: Parámetros del modelamiento de estructura terciaria por homología de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*. Se reportan los moldes usados para la construcción de los modelos de las ATPasas tipo P_{1B}, identificando la proteína molde con su código PDB. Los resultados de porcentaje de identidad, porcentaje de cobertura, número de residuos alineados y calidad del modelo usando los parámetros Z-score y Global score del programa ProQ2.

Proteína	Molde	% Identidad	% cobertura	# residuos alineados	Z-score	Global Score
CtpA	3j09	36	92,77	702	-3,173	0,590
CtpB	3j09	38	92,95	699	-3,197	0,573
CtpV	3j09	45	91,56	705	-3,126	0,582

La Figura 6-25 muestra los modelos construidos para CtpA, CtpB y CtpV. En todos ellos se pudo observar todos los dominios característicos de las ATPasas tipo P, incluyendo los dominios citoplasmáticos A, N y P que se representan en colores verde y azul, y los dominios T y S, que se ubican dentro de una bicapa lipídica. La organización de los TM del dominio de transporte fue la esperada, ya que las hélices TM que contienen los residuos encargados de coordinar al Cu⁺ (TM5 al 8) se encuentran juntos formando el canal de transporte.

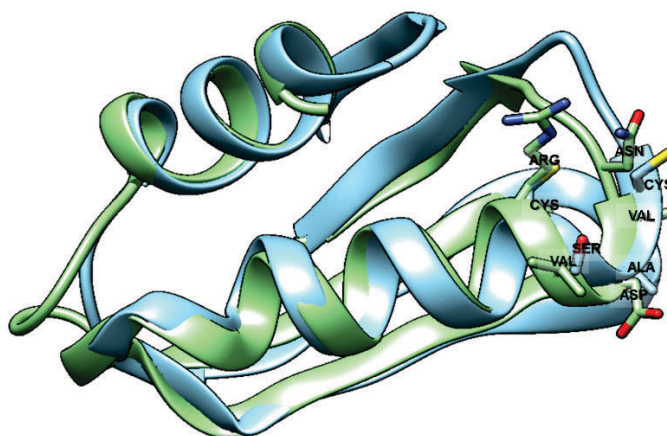
Figura 6-25: Modelos de la estructura terciaria de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*. Los modelos de CtpA, CtpB y CtpV se hicieron por homología usando como molde CopA, una Cu⁺ ATPasa tipo P de *A. fulgidus* (PDB ID 3j09B, estructura determinada por microscopía crio-electrónica con una resolución de 10,00 Å [128]). Los dominios citoplasmáticos A, N y P se representan en verde y azul; el dominio MBD en naranja; los dominios T y S se ubican en la bicapa lipídica representada por los dummies o puntos cafés, y las hélices TM que componen estos dominios son numerados del 1 al 8.



Adicional a los dominios citoplasmáticos descritos anteriormente, todos los modelos incluyen un dominio MBD, representado en color naranja. Estos MBD se ubican cerca al dominio A, sugiriendo un papel regulatorio que interactúa con el dominio de unión de ATP y no con los dominios de unión a metal de la transmembrana [103]. Esto concuerda con el

papel regulatorio sugerido al analizar los mapas de potencial electrostático de los MBD de CtpA, CtpB y CtpV. Aunque los tres MBD, de CtpA, CtpB, y CtpV exhiben plegamiento tipo ferredoxina (Figura 6-25), el MBD de CtpV carece del motivo funcional encargado de la coordinación con catión. Al hacer un alineamiento de la estructura terciaria entre el MBD de CtpV y el MBD2 de *EcCopA* (Figura 6-26), se observa que en CtpV las dos Cys de unión de Cu^+ han sido sustituidas por Asn y Arg. Por ello, se desconoce la función que pueda tener este segmento en la proteína.

Figura 6-26: Alineamiento de estructura terciaria entre el MBD de CtpV y el MBD2 de *EcCopA*. El modelo de MBD de CtpV es representado en verde y es alineado con el MBD2 de *EcCopA* en azul. Se muestran los residuos que hacen parte del motivo involucrado en la coordinación de Cu^+ .



6.3.2 Caracterización funcional de CtpA

Como parte del análisis de la respuesta de las Cu^+ ATPasas de *M. tuberculosis* frente a condiciones de estrés, en el presente trabajo se planteó su estudio funcional con el objetivo de conocer su posible actividad enzimática y su papel en los procesos de respuesta a estas condiciones. A continuación, se mostrarán los resultados de la estrategia experimental propuesta para indagar la posible función de CtpA, CtpB y CtpV.

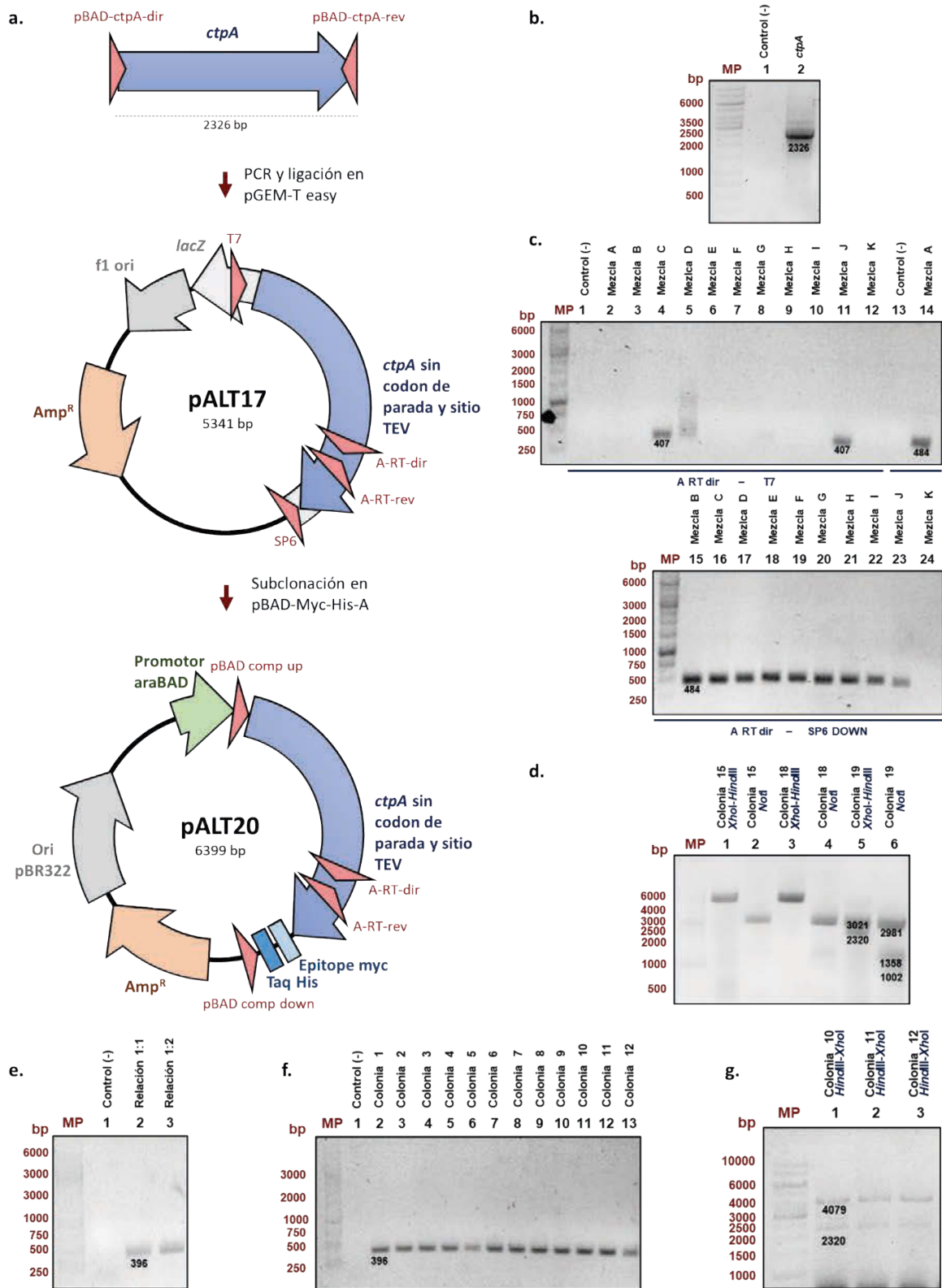
Para la caracterización funcional de CtpA se usaron sistemas de expresión de la enzima en *E. coli* y micobacteria con diferentes propósitos. La expresión de CtpA en *E. coli* se realizó con el fin de purificar la proteína y hacer ensayos funcionales sobre ella, además de ensayos de transporte en vesículas de membrana de *E. coli* ΔcopA (mutante de la Cu^+ ATPasa endógena). En el caso de la expresión en *M. smegmatis* se hizo con el fin de

determinar los parámetros cinéticos de la enzima usando membranas enriquecidas con CtpA, semejando el ambiente lipídico que tiene CtpA en *M. tuberculosis*.

6.3.2.1 Obtención de recombinantes de sobreexpresión de CtpA

El gen *ctpA* de *M. tuberculosis* (rv0092) se clonó en el vector pBAD-Myc-His-A (Thermo Scientific), generando el plásmido recombinante pALT20 que permite la sobreexpresión de CtpA en *E. coli* y su posterior purificación por cromatografía de afinidad. Durante la construcción del plásmido pALT20 (Figura 6-27a), al gen *ctpA* se le añadió una secuencia que codifica el sitio de reconocimiento de la proteasa del virus del tabaco (TEV), que permite remover la etiqueta de His fusionada de la proteína recombinante (Figura 6-27b). Inicialmente, el producto de amplificación de CtpA por PCR se clonó en el vector pGEM-T easy® para generar el plásmido pALT17 (Figura 6-27c y d), luego subclonar el gen entre los sitios *Hind*III y *Xho*I del plásmido pBAD-Myc-His-A, y así generar pALT20 (Figura 6-27e-f). Los plásmidos construidos fueron verificados por PCR y mapeo de restricción. Finalmente, la integridad de todos los plásmidos construidos se corroboró por secuenciación; en el caso de pALT20 se confirmó especialmente que el gen estuviese clonado en el marco de lectura correcto.

Figura 6-27: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpA en *E. coli*. **a.** Esquema de clonación del gen *ctpA* en el plásmido pBAD-Myc-His-A. **b.** Amplificación por PCR del gen *ctpA* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores pBAD-ctpA-dir/pBAD-ctpA-rev. **c.** PCR de colonia para confirmación del plásmido pALT17; como se pueden obtener dos orientaciones durante la ligación del amplímero de *ctpA* en pGEM-T easy, la direccionalidad del inserto después de la ligación se analizó utilizando dos juegos de iniciadores, quienes indicarán la direccionalidad del inserto, indicado por el tamaño del producto esperado en cada caso. Iniciadores: T7/A-RT-dir (407 pb) y SP6 DOWN/A-RT-dir (484 pb). En el esquema del plásmido pALT17 se muestra la inserción del plásmido final que da como la direccionalidad con el juego de iniciadores SP6 DOWN/A-RT-dir, no se muestra la otra direccionalidad que sería positiva para el juego de iniciadores T7/A-RT-dir. **d.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT17, se espera que al usar las enzimas *Xho*I-*Hind*III se produzcan dos bandas de 3021 y 2320 pb, y la digestión con *Not*I se generen tres bandas de 2981, 1358 y 1002 pb. En este caso la colonia 19 es positiva. **e.** PCR de confirmación del producto de ligación para generar el plásmido pALT20 (iniciadores: pBAD comp down/A-RT-dir), obteniendo el producto esperado de 396 pb. **f.** PCR de colonia para confirmación del plásmido pALT20 (iniciadores: pBAD comp down/A-RT-dir), obteniendo el amplímero esperado de 396 pb. **g.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT20, con las enzimas *Xho*I-*Hind*III que produce dos bandas de 4076 y 2320 pb, siendo las tres colonias positivas.



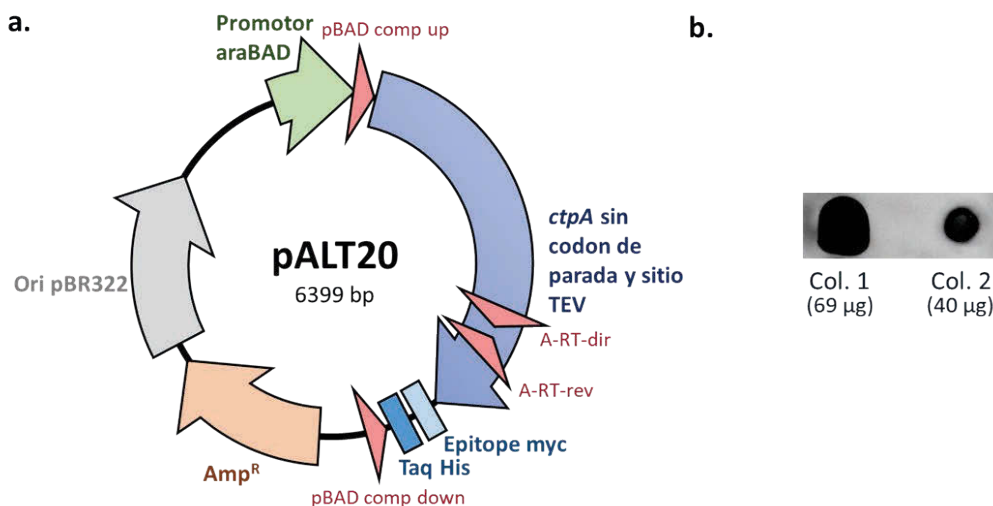
Además de pALT20 que permite la expresión de CtpA en *E. coli*, también se cuenta con el plásmido recombinante pALT4 que permite la sobreexpresión de CtpA en micobacterias. Este constructo se realizó durante la tesis de maestría [150], donde el gen *ctpA* se clonó en el vector lanzadera *E. coli/Mycobacterium*, pMV261.

6.3.2.2 Sobreexpresión y purificación de CtpA en *E. coli*

La proteína recombinante CtpA se obtuvo a partir de *E. coli* LMG194 transformado con el plásmido pALT20. La expresión de la proteína se verificó por inmunodetección usando anticuerpos dirigidos contra la etiqueta de His, localizada en el extremo C-terminal de la proteína. A partir de dos colonias se hizo un análisis preliminar de expresión de CtpA por Dot-Blot (Figura 6-28b). En la inducción de la proteína se usaron las siguientes condiciones: medio LB suplementado con 0,05% de L-arabinosa, 37 °C, 180 rpm de agitación y 3 horas de incubación, posteriormente se analizó el lisado celular obtenido por sonicación (Colonia 1 y 2, utilizando 69 y 40 µg de proteína total, respectivamente). Como se observa en la Figura 6-28b, CtpA se expresó en niveles suficientes para continuar con el proceso de caracterización.

Para la purificación de CtpA recombinante, la expresión de la proteína se hizo primero usando el medio *A1* que permite una inducción controlada de la proteína. Este sistema usa L-arabinosa al 0,05 % como agente inductor [144]. También se incluyó glucosa como represor de la expresión de la proteína y evitar que formen cuerpos de inclusión, situación frecuente al sobreexpresar proteínas de membrana [23]. El medio *A1* contiene sales que favorecen el crecimiento de *E. coli* y usa un buffer de fosfato que ayuda a obtener una mayor biomasa [144]. Este sistema de expresión permitió una expresión favorable de CtpA, utilizando las siguientes condiciones de cultivo e inducción: 20 °C, 180 rpm y 18 h (Figura 6-29c y d). CtpA se expresó y purificó a partir de medio litro de cultivo bacteriano crecido hasta un OD₆₀₀ de 4,7. Una vez verificada la expresión de la proteína por Dot-Blot (dato no mostrado), las bacterias fueron lisadas usando una prensa francesa. Se aisló la membrana plasmática del lisado celular mediante un esquema de centrifugación diferencial, ya que en esta fracción celular se encuentra ubicada la proteína recombinante expresada. Antes de proceder a la purificación por cromatografía de afinidad, los lípidos de la bicapa se removieron usando n-dodecil β-D-maltosido (DDM) al 1%, un detergente “suave” que permite aislar los lípidos sin afectar considerablemente la actividad de la enzima [200].

Figura 6-28: Sobreexpresión de CtpA en *E. coli*. **a.** Mapa del plásmido recombinante pALT20 que permite la sobreexpresión de CtpA en *E. coli*. **b.** Sobreexpresión de CtpA en *E. coli* cepa LMG194 verificada mediante ensayos de Dot-Blot usando anticuerpo 1^o dirigido contra el His-tag (*6x-His Epitope Tag Antibody Rabbit*, Thermo Scientific) y secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate*, Thermo Scientific).

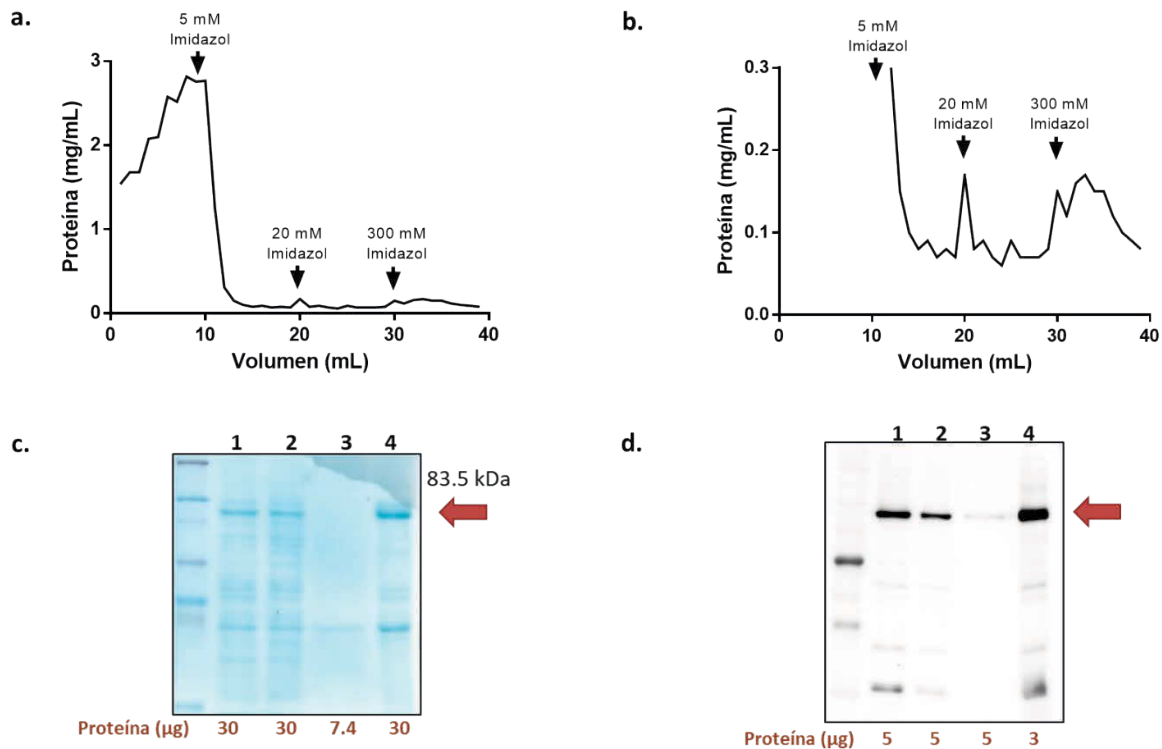


La purificación de CtpA se logró mediante cromatografía de afinidad entre la etiqueta de His fusionada a CtpA recombinante y el catión unido a una columna Níquel-ácido nitrilotriacético, Ni-NTA (Roche). En el perfil de elución de la columna (Figura 6-29a y b), la proteína de interés se observó mayoritariamente al aumentar la concentración de imidazol a 300 mM (Figura 6-29b). La proteína obtenida por la cromatografía de afinidad se concentró usando un Centricon de corte 50 kDa (Millipore), que a su vez permitió hacer un intercambio de buffer para disminuir la concentración de imidazol por debajo de 1 mM. El extracto de CtpA purificado fue analizado por SDS-PAGE y Western-Blot (Figura 6-29c y d), donde se observó una banda mayoritaria de 83,5 kDa (Figura 6-29b y c). La purificación permitió recuperar 3,3 mg de proteína, con un rendimiento del proceso de 6,5 mg/L de cultivo bacteriano, siendo un rendimiento comparable con lo reportado en la literatura [200].

Para evitar pérdidas por degradación y desnaturalización de la proteína, todo el proceso se realizó a 4°C y en presencia del inhibidor de proteasas PMSF (fluoruro de fenilmetilsulfonilo). Además, luego de la solubilización con DDM para separar la proteína de los lípidos de la bicapa, en todos los buffers se añadió DDM 0,01% y asolectina al 0,01%. Estos últimos con el fin de mantener al máximo la estructura las regiones

transmembranales en su forma nativa, evitando la agregación de las zonas hidrofóbicas de la proteína, y así impedir la precipitación de la misma.

Figura 6-29: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpA. **a.** Perfil de elución de la cromatografía afinidad. El seguimiento se realizó cuantificando el contenido de proteínas en las fracciones usando el método de Bradford. **b.** Amplificación de la escala del eje Y (concentración de proteína) de la Figura A, con el fin de ver el perfil de elución de las proteínas de interés al aumentar el gradiente de imidazol. **c.** SDS-PAGE de la purificación de CtpA. Carril 1. Fracción total de membrana. 2. Proteínas no retenidas. 3. Lavado con imidazol 20 mM. 4. Extracto de CtpA purificado (Elución con imidazol 300 mM). **d.** Western-Blot de la purificación de CtpA. Carril 1. Fracción de membrana. 2. Proteínas no retenidas. 3. Lavado con imidazol 20 mM. 4. Extracto de CtpA purificado (Elución con imidazol 300 mM).



El proceso de purificación de CtpA partiendo de la membrana plasmática de *E. coli* sobreexpresando la proteína fue adecuado; se observó una banda mayoritaria a la altura de 83,5 kDa en el extracto purificado, tamaño esperado de CtpA (Figura 6-29b y c). Aunque en el SDS-PAGE se observen bandas adicionales que sugieren degradación y co-elución con otras proteínas, el extracto se consideró apropiado para hacer ensayos de actividad enzimática. De esta manera, si la enzima es funcional, la actividad enzimática va a deberse

principalmente a la presencia de CtpA recombinante, por lo que la presencia minoritaria de otras proteínas interferiría en menor medida con los ensayos.

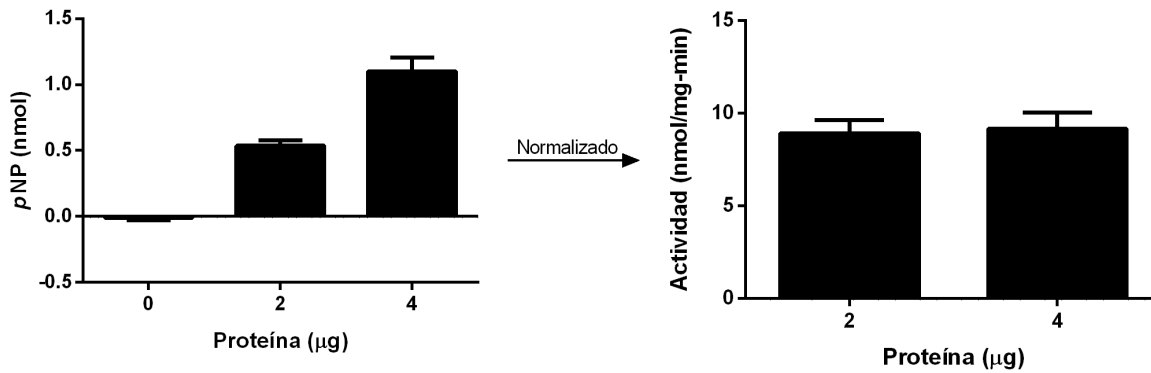
6.3.2.3 El extracto de CtpA purificado presenta actividad *p*NPPasa y Cu⁺ ATPasa

Para verificar si CtpA purificada es funcional, se determinó su actividad ATPasa no específica. Las ATPasas tipo P, muestran diferentes dominios con actividades enzimáticas específicas, y aunque en conjunto su función principal sea el transporte de cationes, ellas siempre tienen actividad proteín-quinasa en su dominio N y actividad fosfatasa en el dominio A, el que se encarga de defosforilar la enzima al final en cada ciclo catalítico [17]. En general la actividad fosfatasa, es una actividad promiscua que puede catalizar la hidrólisis de monoésteres de fosfato [145]. De esta forma, fue posible verificar la integridad del extracto de proteína mediante ensayos de hidrólisis de *p*-nitrofenil fosfato (*p*NPP). Esta actividad es conocida como *p*-nitrofenil fosfatasa (*p*NPPasa por las siglas en inglés del sustrato), un ensayo catión-independiente. La hidrólisis enzimática del sustrato incoloro *p*NPP produce un compuesto amarillo *p*-nitrofenol (*p*NP) cuyo máximo de absorción ocurre en 410 nm con un coeficiente de extinción molar ϵ de 17000 M⁻¹.cm⁻¹. La actividad se reporta como nmol de *p*NPP hidrolizado por mg de proteína, por minuto de reacción (nmol *p*NPP/mg.min) [146]. En este caso en particular, el ATP fue excluido de las reacciones enzimáticas por ser un sustrato que compite con el *p*NPP.

Para diferenciar la hidrólisis enzimática y no enzimática del *p*NPP, se hizo una comparación de la producción de *p*NP en presencia y ausencia de proteína (control negativo) en reacciones paralelas bajo las mismas condiciones. En la Figura 6-30 se evidencian los dos tipos de hidrólisis; en la hidrólisis enzimática con proteína se varió la cantidad de CtpA. Los resultados obtenidos mostraron que la máxima actividad se obtenía al utilizar 4 μ g del extracto purificado de CtpA en la reacción, ya que la actividad específica (normalizada) a partir de esta cantidad de proteína dejaba de variar. Los resultados por lo tanto demuestran que el proceso de purificación permitió obtener la enzima CtpA de forma funcional, con una actividad *p*NPPasa de 9,17 \pm 0,87 nmol *p*NPP/mg-min, un valor comparable con lo reportado en la literatura para la Ca²⁺ ATPasa SERCA (12,1 \pm 0,4 nmol *p*NPP/mg-min) [201] pero alejado del reportado para la Cu⁺ ATPasa CopA de *A. fulgidus* (1,77 \pm 0,05 μ mol/mg-min) [146]. Posiblemente la mayor actividad DE CopA se deba a la

alta temperatura óptima de la reacción enzimática (70 °C) [202], facilitando la hidrólisis de pNPP.

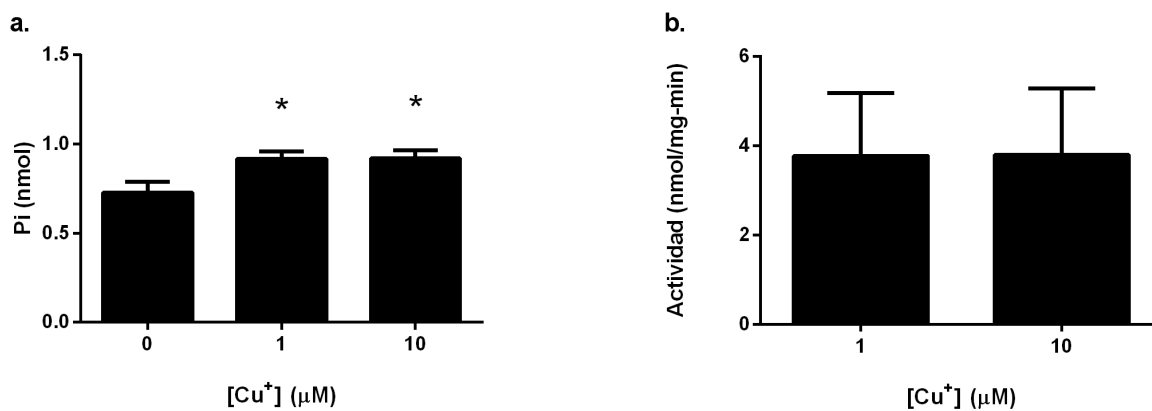
Figura 6-30: Actividad p-nitrofenil fosfatasa (pNPPasa) a partir del extracto purificado de CtpA. a. Variación de la cantidad de proteína adicionada a cada reacción enzimática. En el gráfico sin normalizar (izquierda) hay mayor cantidad de producto a mayor cantidad de enzima. Cuando la actividad se normaliza en relación con la cantidad de proteína (derecha), la actividad empieza a ser constante. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicos.



Una vez confirmada la funcionalidad de la enzima, se procedió a hacer ensayos de actividad específica ATPasa de CtpA. En este ensayo se utilizan como sustratos ATP y el posible catión transportado por la enzima, para así determinar la tasa de hidrólisis de ATP cuantificando el fosfato liberado en cada reacción. Los diferentes ensayos mostraron que el extracto de CtpA purificado presenta actividad ATPasa estimulada por Cu⁺. En la Figura 6-31a se muestra la cantidad de fosfato inorgánico (Pi) producido en las reacciones enzimáticas al usar dos concentraciones diferentes de Cu⁺ en la reacción (1 y 10 µM); la diferencia del Pi liberado comparando las reacciones en presencia y ausencia del catión no es muy grande, pero estadísticamente significativa. En el caso de la actividad sin catión hay una producción de Pi considerable, valor que muy probablemente es producido por la hidrólisis del ATP a partir de otras fosfatasas presentes en el extracto purificado y no por la hidrólisis espontánea del sustrato. Los cálculos de actividad Cu⁺ ATPasa específica se hicieron estimando la diferencia entre los valores de fosfato liberado a partir de reacciones suplementadas con y sin catión respectivamente (Figura 6-31b). Se obtuvieron actividades de $3,77 \pm 1,40$ nmol/mg-min y $3,80 \pm 1,48$ nmol/mg-min al adicionar 1 y 10 µM de Cu⁺, respectivamente. El obtener valores similares al usar las dos concentraciones de Cu⁺ nos permite sugerir que la actividad de la enzima es cercana a la V_{max} cuando la reacción se suplementa con 10 µM de catión. Con esta suposición la V_{max} se puede comparar con la

reportada para la Cu^+ ATPasa de *E. coli* (*EcCopA*) de $27,3 \pm 4,5$ nmol/mg-min [102]. Aunque el valor obtenido para CtpA es menor, son cercanos entre ellos, e indicaría que CtpA tiene una menor capacidad de transporte de Cu^+ .

Figura 6-31: Estimulación por Cu^+ de la actividad ATPasa del extracto purificado de CtpA. **a.** Cantidad de Pi liberado en la reacción enzimática en ausencia y presencia de Cu^+ (1 y 10 μM). La reacción enzimática se hizo con 2,5 μg de proteína pura, pH 7,4, 37 °C y 20 minutos. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se hicieron comparando los valores de Pi en presencia y ausencia de catión. **b.** Actividad Cu^+ ATPasa utilizando 1 y 10 μM de catión. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas.



El hecho de obtener diferencias bajas de Pi liberado entre las reacciones en presencia y ausencia del catión, motivó a realizar ensayos para obtener mayores valores de actividad utilizando enzima purificada, variando diferentes condiciones como: tiempo de reacción, cantidad de enzima, pH y cantidad de cisteína. Sin embargo, al poco tiempo (menos de 1 hora), la enzima perdió su actividad. Esto nos obligó a pensar que el trabajar con proteínas de membrana fuera de su ambiente lipídico nativo y dejarlas como micelas, su conformación nativa se pierde muy fácilmente, lo que los TM que hacen parte del ciclo catalítico posiblemente pierdan su estructura y actividad enzimática [200]. Este mismo comportamiento también se observó al realizar los ensayos de actividad $p\text{NNPasa}$, toda vez que la enzima al remover los lípidos de la bicapa perdió su actividad en cuestión de minutos. Se hicieron intentos de nuevas purificaciones y variación de diferentes condiciones de purificación y almacenamiento, pero no fue posible encontrar un extracto que fuese activo durante el tiempo suficiente para determinar los parámetros cinéticos de la enzima.

En un trabajo anterior se determinaron los parámetros cinéticos de CtpA, lo que fue parte de la tesis de maestría titulada: “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*” [150]. En ese trabajo la actividad de la enzima se determinó a partir de preparaciones de membrana de *M. smegmatis* mc²155, estableciendo la diferencia de actividad entre las membranas sobreexpresando la proteína CtpA y membranas aisladas de la bacteria transformadas con el vector pMV261 vacío. Los resultados de la actividad Cu⁺ ATPasa de CtpA que fueron obtenidos durante la tesis de maestría se resumen en la Tabla 6-11. De manera complementaria, en este trabajo se determinó el efecto de la Cys en la actividad Cu⁺ ATPasa de CtpA.

Tabla 6-11: Cinética enzimática de CtpA. Parámetros cinéticos y condiciones óptimas de la actividad Cu⁺ ATPasa de CtpA [174].

Tipo de cinética	Parámetros cinéticos			Condiciones óptimas		
	$K_{1/2}$ (μM)	V_{max} (nmol Pi/mg-min)	h	pH	T (° C)	[Cys] (mM)
Enzima Alostérica (modelo de Hill)	$4,68 \times 10^{-2}$	10,3	1,91	7,5	37	0,3

Se encontró que CtpA sigue la cinética de una enzima alostérica en su actividad Cu⁺ ATPasa, este tipo de cinéticas se ajustan al modelo de Hill y cumplen la siguiente ecuación:

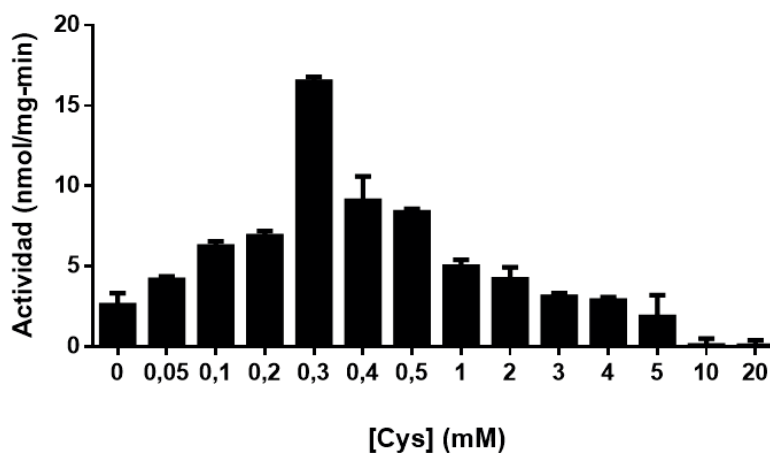
$$v = \frac{V_{max} [S]^h}{K_{1/2} + [S]^h}$$

Donde, V es la velocidad de reacción enzimática, V_{max} la velocidad máxima, $[S]$ la 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 [203].

Lo anterior sugiere que el Cu⁺ modula alostéricamente la reacción enzimática. Esta modulación se puede presentar por la unión del metal en otro sitio diferente, como podría ser el MBD ubicado en el N-terminal de CtpA. El coeficiente de Hill obtenido para CtpA sugiere un efecto cooperativo positivo entre el Cu⁺ y CtpA. Además, este valor al ser cercano a 2 indica que la enzima tiene mínimo dos sitios de unión al Cu⁺, este segundo sitio podría ser el MBD favoreciendo alostéricamente la cinética enzimática.

Los parámetros cinéticos de CtpA (V_{max} de 10,3 nmol Pi/mg-min y $K_{1/2}$ de $4,68 \times 10^{-2} \mu\text{M}$) son comparables con la ATPasa tipo P_{1B}, CtpD, de *M. smegmatis*, cuya V_{max} en presencia de Co^{2+} es de $10,3 \pm 0,5 \mu\text{mol Pi/mg-h}$, y $K_{1/2}$ de $4,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$ [204], siendo este último mayor al observado para CtpA. Comparado con las constantes cinéticas reportadas para otras Cu^+ ATPasas, CtpA exhibe una V_{max} similar a la de CopA de *E.coli* (*EcCopA*, $27,3 \pm 4,5 \mu\text{mol/mg-h}$) [102]. La menor V_{max} observada para CtpA se podría explicar a que la actividad enzimática se determinó a partir de enzima embebida en la membrana y no purificada. EL $K_{1/2}$ obtenida de CtpA podría ser comparada con la Cu^+ ATPasa ATP7A de humano ($0,6 \pm 0,04 \mu\text{M}$) [205]. Otras Cu^+ ATPasas caracterizadas, exhiben valores de $K_{1/2}$ mayores, por lo que la mayor afinidad de CtpA por el Cu^+ indicaría que la enzima une Cu^+ a bajas concentraciones intracelulares del metal.

Figura 6-32: Efecto de la cisteína en la actividad Cu^+ ATPasa de CtpA sobreexpresada en la membrana de *M. smegmatis* mc²155. La actividad Cu^+ ATPasa se midió en membrana de *M. smegmatis* mc²155 enriquecidas con CtpA, variando la concentración de cisteína. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas.



La Cys es un aminoácido capaz de quelar el Cu^+ , además de ser el residuo que une al catión en las cuprochaperonas [33]. En ese sentido, se evaluó el efecto de la concentración de Cys en la actividad ATPasa de CtpA (Figura 6-32). Se encontró un máximo de actividad en presencia de 0,3 mM de Cys, seis veces mayor a la actividad en ausencia de Cys. Esto indica, que la enzima recibe preferencialmente Cu^+ quelado y no libre, lo que coincide con

lo conocido del interior celular, donde proteínas con grupos tiol secuestran el Cu para limitar su toxicidad [206].

6.3.2.4 CtpA embebido en membrana de *E. coli* $\Delta copA$ es asociado al transporte de Cu⁺

Al tener dificultades para obtener un extracto puro y activo de CtpA, se optó ensayar el transporte de Cu⁺ usando vesículas evertidas de membrana de *E. coli* enriquecidas con CtpA. Para estos ensayos se empleó una cepa mutante de *E. coli* deficiente en la Cu⁺ ATPasa endógena CopA ($\Delta copA$). La metodología que se siguió fue adaptada de González-Guerrero y colaboradores, en donde midieron la acumulación de ⁶⁴Cu radioactivo en vesículas de membrana evertidas de *E. coli* $\Delta copA$ que sobreexpresan Cu⁺ ATPasas tipo P de *P. aureginosa* [151]. A diferencia en este trabajo, la detección de Cu⁺ dentro de las vesículas se hizo por espectroscopia de absorción atómica usando atomización con horno de grafito (AAS-GF, por sus siglas en ingles). Otra de las modificaciones hechas fue el uso de ácido ascórbico como agente reductor en lugar de DTT, ya que este último formaba un precipitado que interfería con las medidas.

Al trabajar con vesículas de membrana plasmática, el contenido de proteína recombinante etiquetada con His se estimó para determinar con mayor precisión la actividad enzimática asociada al transporte de Cu⁺, mediada por CtpA. La proteína en las vesículas fue cuantificada por inmunofluorescencia (Dot-Blot) usando anticuerpos que reconocen la etiqueta de His fusionada a la proteína recombinante; para lograr este objetivo, se construyó una curva de calibración con diferentes concentraciones de proteína TEV pura (fusionada a una etiqueta de His) para compararla con las muestras de las vesículas recombinantes. La intensidad de cada punto se midió por densitometría usando el programa ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/index.html>). La curva de calibración se construyó tomando la intensidad de fluorescencia en función de la concentración de proteína, donde se interpoló la fluorescencia emitida por las muestras. Los valores de concentración estimados para los diferentes extractos de membrana extraídas durante el presente trabajo se muestran en la Tabla 6-12.

Tabla 6-12: Cuantificación de las Cu⁺ ATPasas en los extractos de vesículas evertidas de membrana. Se muestran los resultados obtenidos de la cuantificación de Cu⁺ ATPasas recombinantes que fueron expresadas en las vesículas evertidas de

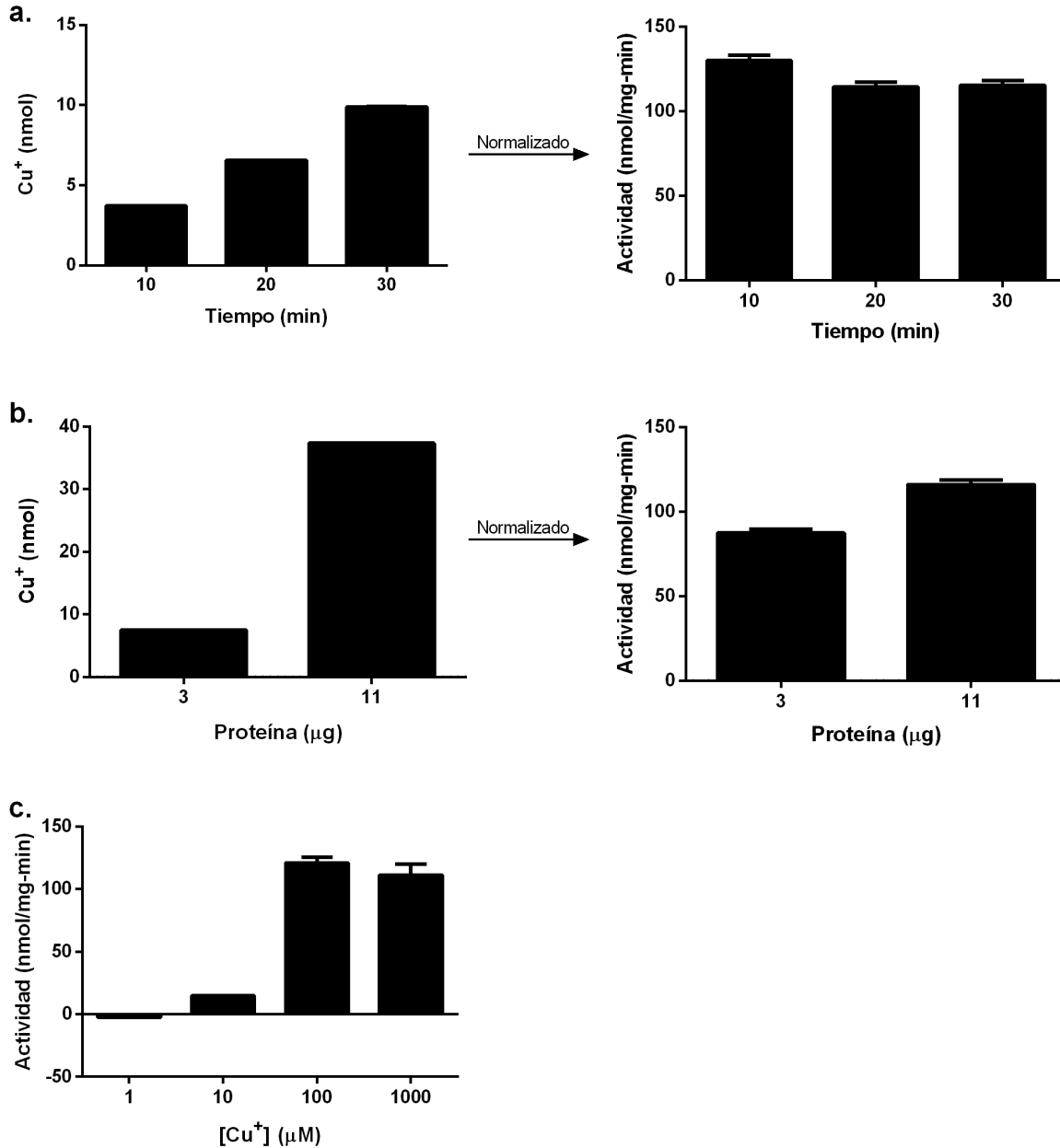
membrana de *E. coli* $\Delta copA$ para ser usadas en ensayos de transporte de Cu^+ . La cuantificación fue hecha por inmunofluorescencia mediante Dot-Blot usando como patrón TEV puro fusionado a una etiqueta de histidinas.

Cu^+ ATPasa	Concentración de proteína ($\mu g/mL$)
CtpA	$84,78 \pm 2,57$
CtpB	$152,08 \pm 7,50$
CtpV	$110,41 \pm 7,81$
<i>EcCopA</i>	$240,41 \pm 5,87$

Una vez cuantificada la fracción correspondiente a la Cu^+ ATPasa presente en las vesículas evertidas, se hizo necesario conocer si el método seleccionado y adaptaciones son apropiados para hacer las medidas de transporte de Cu^+ . A manera de comparación, de forma paralela se hicieron ensayos empleando vesículas que contenían CopA de *E. coli* ó *EcCopA*, una cepa previamente trabajada en ensayos de transporte de Cu^+ usando el mismo sistema de sobreexpresión [151]. El objetivo era conocer si las adaptaciones incluidas en este trabajo al sistema producían medidas comparables con los resultados de transporte previamente reportados para ese mismo sistema. En la Figura 6-33a se muestran los resultados obtenidos del Cu^+ al interior de las vesículas variando el tiempo de reacción. Se encontró que la captura de Cu^+ aumentaba en función del tiempo. Al normalizar los valores se encuentra una actividad constante (115 nmol/mg-min), comportamiento esperado para la actividad enzimática en presencia de exceso de sustrato. Como era de esperarse, al aumentar la cantidad de proteína, hubo una mayor acumulación de Cu^+ (Figura 6-33b). Las dos cantidades de proteína ensayadas produjeron valores adecuados de actividad mediada por Cu^+ , razón por la que se decide trabajar con 3 μg de enzima. Finalmente se hizo un análisis de la variación del catión en el medio de reacción en un rango entre 1 Y 1000 μM , encontrando que la tasa de transporte de Cu^+ se vuelve constante al suplementar con 100 mM, siguiendo la misma tendencia obtenida por González-Guerrero y colaboradores [151]. El valor de actividad obtenido a 100 μM de $121,1 \pm 4,7$ nmol/mg-min, con el de V_{max} de $86,3 \pm 8,4$ nmol/mg-min y el reportado por González-Guerrero y colaboradores, son similares [151].

Figura 6-33: Transporte de Cu^+ mediado por *EcCopA* en vesículas evertidas de membrana. a. Efecto del tiempo de reacción con la acumulación de Cu^+ en las vesículas. La gráfica de la izquierda muestra el contenido de Cu^+ dentro de las vesículas y en la derecha se normalizan estos valores para determinar la actividad de transporte. **b.** Efecto de la variación de la proteína con la acumulación de Cu^+ en las vesículas. La gráfica de la

izquierda muestra el contenido de Cu⁺ dentro de las vesículas y en la derecha se normalizan estos valores para determinar la actividad de transporte. **c.** Variación de la concentración de Cu⁺ en el medio de la reacción. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas técnicas.



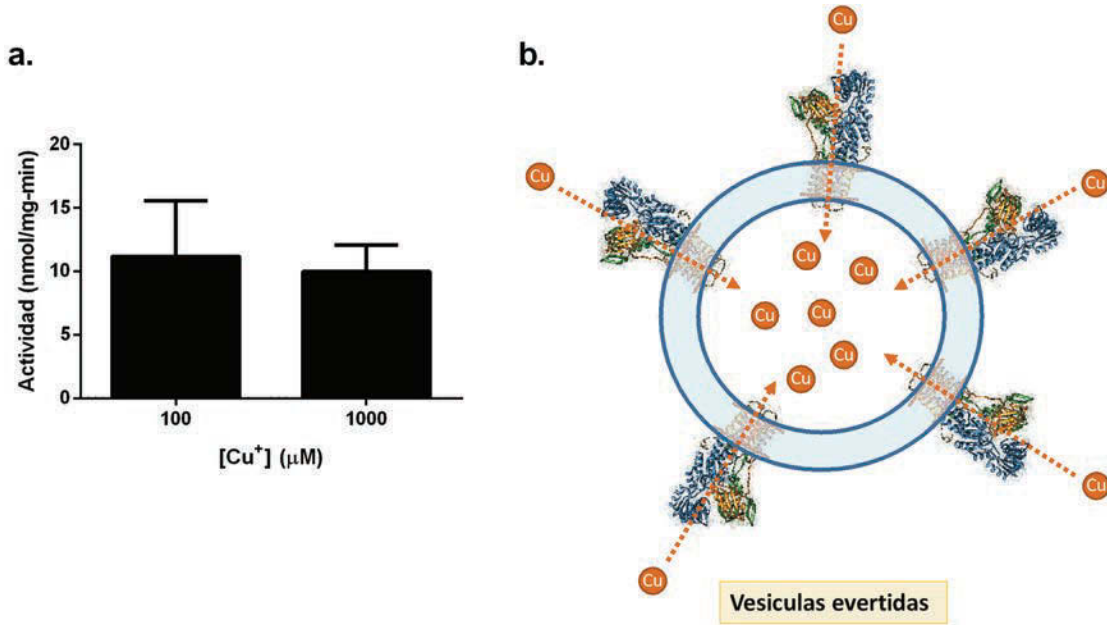
Lo anterior demuestra que las modificaciones hechas a la metodología fueron adecuadas para el estudio del transporte de Cu⁺ en vesículas evertidas de membrana que sobreexpresen las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*. Las concentraciones de Cu⁺ usadas para este ensayo son altas comparadas con los valores fisiológicos [37], sin embargo en este ensayo se quiere tener la enzima saturada para tener valores de actividad cercanos

al V_{max} . En conclusión, los ensayos de transporte en vesículas de *EcCopA* mostraron que el método es válido para determinar el Cu^+ internalizado en vesículas. El paso subsiguiente fue realizar la cuantificación en las vesículas evertidas enriquecidas con CtpA.

La Figura 6-34 muestra los resultados obtenidos del transporte de Cu^+ al adicionar al medio de reacción 100 o 1000 μM de Cu^+ , mostrando una tasa de transporte de $11,17 \pm 4,41$ y $9,99 \pm 2,08$ nmol Cu^+ /mg proteína-min, respectivamente, sugiriendo que a 100 μM de Cu^+ la enzima CtpA ya se encuentra saturada. La tasa de transporte de Cu^+ mediada por CtpA es comparable con la V_{max} de CopA2 de *P. aeruginosa* ($6,7 \pm 0,4$ nmol Cu^+ /mg proteína-min), cuya función es metalar cuproproteínas periplasmáticas [151]. Al obtener tasas de transporte de Cu^+ similares, es posible hipotetizar que CtpA podría tener una función similar a CopA2 de *P. aeruginosa*, y no una función de desintoxicación de Cu. Este sería un comportamiento similar al reportado para el transporte de Cu^+ mediado por CtaA de *Synechocystis* PCC ($8,7 \pm 0,6$ nmol Cu^+ /mg proteína-min), una Cu^+ ATPasa relacionada con el ensamblaje de cuproproteínas [207]. También se observó que la tasa de transporte de CtpA es más baja en comparación a la mostrada por *EcCopA* estimada bajo las mismas condiciones del presente trabajo. Se conoce que la Cu^+ ATPasa de *E. coli* se asocia a la desintoxicación del metal del citosol bacteriano [208] y por ello presenta una mayor tasa de transporte, que para el caso de CtpA, su baja actividad induciría a pensar que no podría asociarse a desintoxicación debido a su baja capacidad de transporte.

Los resultados del transporte de Cu^+ muestran que el catión fue internalizado en la vesícula evertida, o sea, desde el seno de la solución al interior de la vesícula (Figura 6-34b). Al hacer una comparación con la disposición espacial de la membrana en la célula se estaría transportando el metal desde el citosol bacteriano hacia el espacio extracelular, que considerando las constantes cinéticas de CtpA y sus tasas de transporte, se estarían sacando cationes para ser entregados a una enzima extracitoplasmática.

Figura 6-34: Transporte de Cu^+ mediado por CtpA en vesículas de membrana evertidas. **a.** La actividad enzimática asociada con la tasa de transporte de Cu^+ se representada en valores de nmol de Cu^+ estimado en las vesículas, por mg de proteína por minuto. Estos valores se obtuvieron al probar dos concentraciones iniciales de Cu^+ en el medio de reacción (100 y 1000 μM), es decir, fuera de las vesículas. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas. **b.** Esquema de transporte de Cu^+ mediado por Cu^+ ATPasas en vesículas evertidas de membrana.

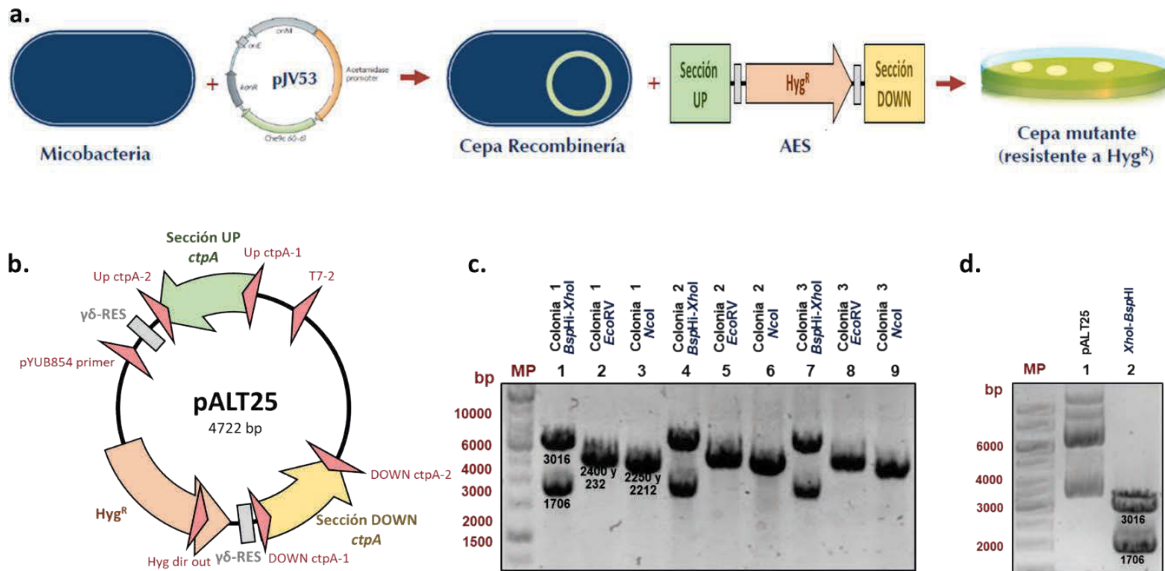


6.3.2.5 Construcción de un mutante de *M. tuberculosis* defectivo en *ctpA*

Para determinar la contribución de CtpA en la homeostasis iónica bacteriana y la virulencia, se optó por construir un mutante de *M. tuberculosis* defectivo en el gen *ctpA*. La estrategia usada para obtener el mutante se basa en un intercambio alélico mediado por proteínas de recombinación codificadas por micobacteriófagos, con el fin de reemplazar el gen *ctpA* por un casete de resistencia Hyg (*Hyg*^R), esta técnica es conocida como recombinación [152]. La estrategia experimental se muestra en la Figura 6-35a. La parte inicial del procedimiento es la obtención de la cepa de recombinación, que en este caso fue obtenida con la transformación del plásmido pJV53 en la cepa de *M. tuberculosis* H37Ra, este paso se había hecho previamente en nuestro grupo de investigación [124].

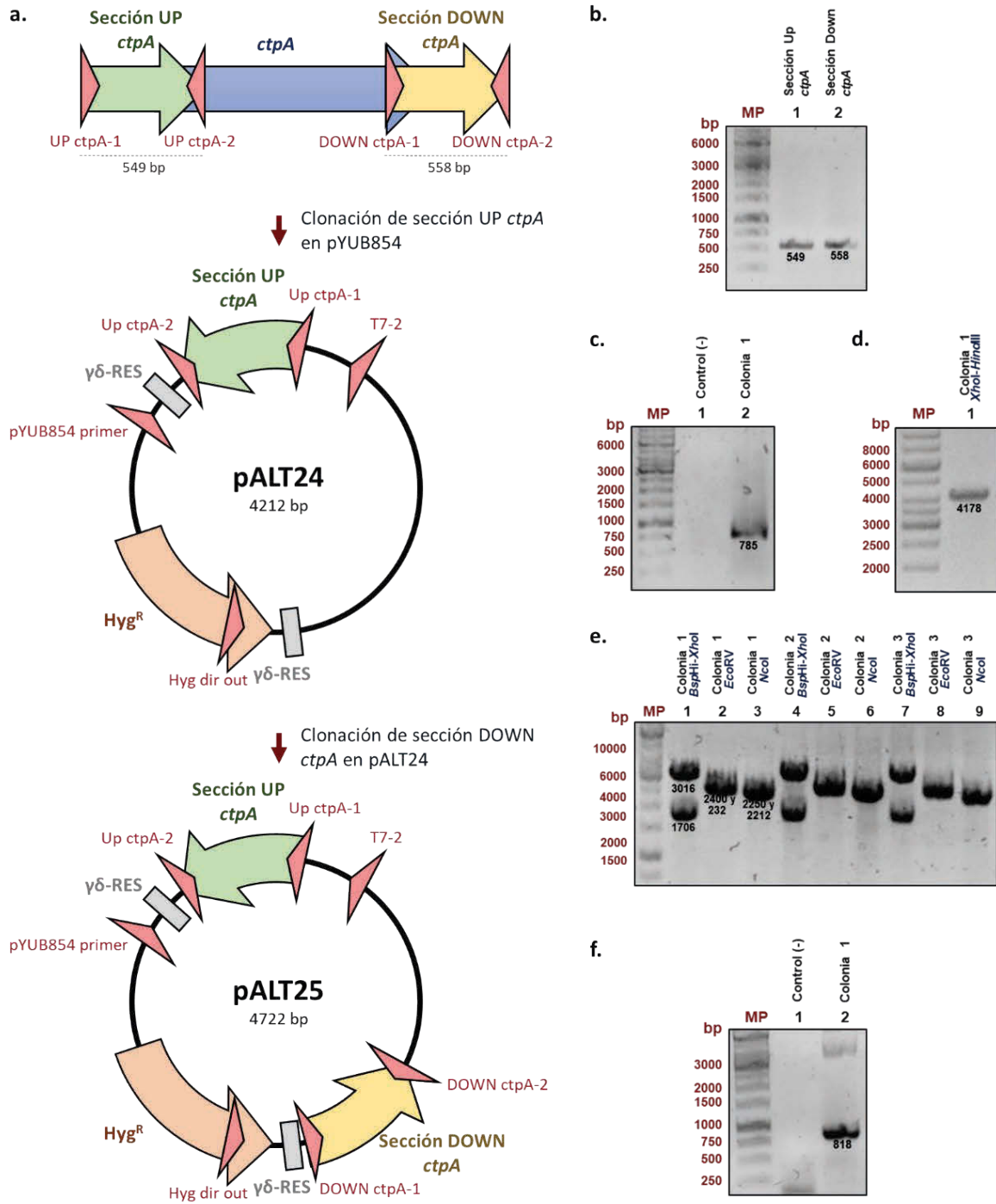
El siguiente paso implicó construir un sustrato de intercambio alélico (AES, por sus siglas en inglés) que consiste en un casete de Hyg^R flanqueado por aproximadamente 500 pb de las secuencias corriente arriba y abajo del gen a mutar. Usando técnicas de clonación convencionales se insertaron las regiones corriente arriba y abajo de *ctpA* flanqueando el casete de Hyg en el plásmido pYUB854. El plásmido conteniendo el AES de *ctpA* es pALT25 (Figura 6-35b) y su confirmación se hizo por mapeo de restricción y secuenciación (Figura 6-35c). El AES de tamaño de 3016 pb se obtuvo a partir de pALT25 por digestión doble de pALT25 con las enzimas de restricción *BspHI* y *XhoI* (Figura 6-35d).

Figura 6-35: Estrategia para la construcción del mutante de *M. tuberculosis* defectivo en *ctpA*. a. Esquema de obtención de mutantes defectivos en genes por la técnica de recombinería. b. Plásmido pALT25 que contiene el AES de *ctpA*. c. Mapeo de restricción de pALT25. d. Liberación de AES de *ctpA* (3016 pb) por digestión con *BspHI* y *XhoI*.



La estrategia detallada empleada para la construcción del plásmido pALT25 se describe en la Figura 6-36a. En ella las regiones corriente arriba y abajo de *ctpA* (sección UP y DOWN, respectivamente) (Figura 6-36b) se clonaron en el vector pYUB854 de tal manera que flanqueen el casete de *Hyg^R*. Primero se insertó la sección "UP" generando el plásmido recombinante pALT24 (Figura 6-36c y d). La segunda clonación se hizo al insertar la sección "DOWN" en pALT24 como vector, obteniendo finalmente al plásmido recombinante que contiene el AES de *ctpA*.

Figura 6-36: Obtención del AES de *ctpA*. a. Esquema de obtención útiles génicos para obtener el AES de *ctpA*. b. Amplificación por PCR de las secciones UP y DOWN de *ctpA* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores UP *ctpA*-1/UP *ctpA*-2 (549 pb) y DOWN *ctpA*-1/DOWN *ctpA*-2 (558 pb). c. PCR de colonia para la confirmación del plásmido pALT24 obteniendo un amplímero de 785 pb (iniciadores: pYUB854 primer/UP *ctpA*-1). d. Digestión doble de pALT24 con *HindIII* y *XhoI* para confirmación de tamaño de 4178 pb y segunda clonación. e. Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT25, se espera que al usar las enzimas *BspHI*-*XhoI* se produzcan dos bandas de 3016 y 1706 pb. La digestión con *NcoI* genera dos bandas de 2400 y 2322 pb, y la digestión con *EcoRV* genera tres bandas de 2250, 2212 y 260 pb. En este caso las colonias son positivas. f. PCR de colonia para la confirmación del plásmido pALT25 (iniciadores: *Hyg* dir out/DOWN *ctpA*-2) de la colonia 1, obteniendo el amplímero esperado de 818.



A la fecha se han realizado transformaciones del AES de *ctpA* en la cepa de recombinería obteniendo colonias con el fenotipo resistente a Hyg, pero a su vez evidenciando mediante PCR la presencia del gen *ctpA* (Datos no mostrados). Se hicieron modificaciones en protocolo de preparación de células competentes, inducción de proteínas de recombinería, y transformación, pero hasta el momento no se han obtenido colonias con el genotipo

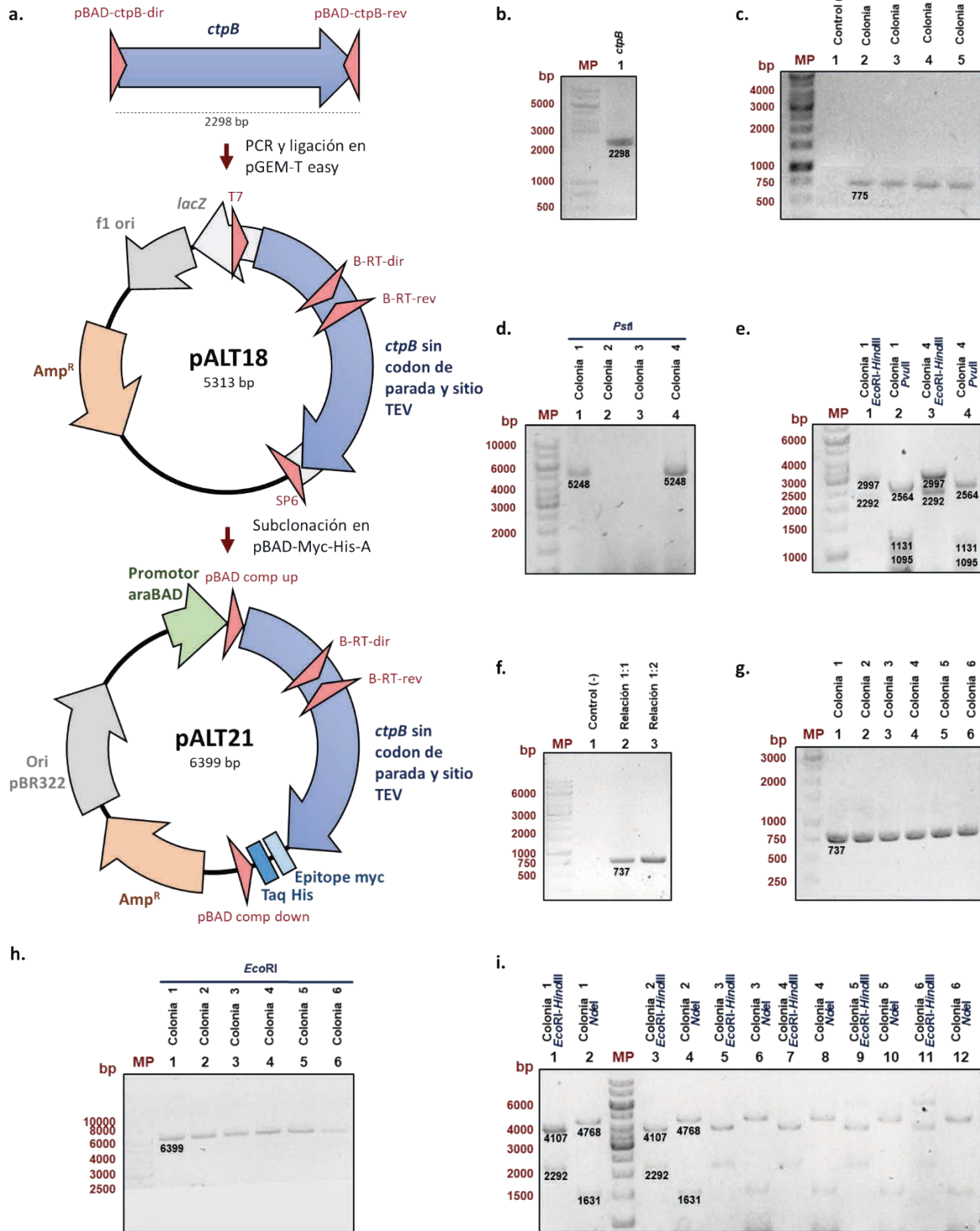
mutante. No es posible afirmar que al generar la mutación en el gen *ctpA* las bacterias no sean capaces de crecer en este medio de cultivo, ya que se trata de un gen no esencial [119]. Se hace necesario realizar modificaciones a la técnica de recombinación o usar otras estrategias que permitan la mutación de *ctpA* en *M. tuberculosis*.

6.3.3 Caracterización funcional de CtpB

6.3.3.1 Obtención de recombinantes de sobreexpresión de CtpB

Los recombinantes de sobreexpresión de CtpB se construyeron usando los mismos sistemas empleados para CtpA. En la Figura 6-37 se muestra el procedimiento empleado para generar el plásmido pALT21, que resulta de clonar el gen *ctpB* en el vector pBAD-Myc-His-A (Thermo Scientific), al que se le añadió un sitio TEV (Figura 6-37b). Inicialmente, *ctpB* se clonó en el vector pGEM-T easy®, para producir el plásmido pALT18, (Figura 15c-e). Para obtener este plásmido recombinante, durante su construcción se obtuvieron 4 colonias positivas por PCR de colonia, (Figura 6-37c); sin embargo, solo a dos de ellas fue posible extraer su plásmido y confirmarlas por análisis de mapeo de restricción (Figura 6-37d y e). Posteriormente, *ctpB* fue subclonado desde pGEM-T easy®, en el vector pBAD-Myc-His-A para finalmente obtener el plásmido recombinante pALT21 (Figura 6-37f-i).

Figura 6-37: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpB en *E. coli*. **a.** Esquema de clonación del gen *ctpB* en el plásmido pBAD-Myc-His-A. **b.** Amplificación por PCR del gen *ctpB* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores pBAD-ctpB-dir/pBAD-ctpB-rev **c.** PCR de colonia para confirmación del plásmido pALT18 (iniciadores: T7/B-RT-rev) obteniendo el amplímero esperado de 775 pb. **d** y **e.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT18, se espera que al cortar con la enzima *XhoI* se produzca una banda de 5313 pb, con la digestión con *EcoRI-HindIII* se generen dos bandas de 2997 y 2292 pb, y con la digestión con *PvuII* se generen tres bandas de 2564, 1131 y 1095 pb. En este caso las colonias 1 y 4 fueron positivas. **f.** PCR de confirmación producto de ligación para generar el plásmido pALT21 (iniciadores: pBAD comp up/B-RT-rev), amplificando el fragmento esperado de 737 pb. **g.** PCR de colonia para confirmación del plásmido pALT21 (iniciadores: pBAD comp up/B-RT-rev). **h** y **i.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT21, se espera que al usar las enzimas *EcoRI-HindIII* se produzcan dos bandas de 4107 y 2292 pb; y la digestión con *PvuII* se generen dos bandas de 4768 y 1631 pb. En este caso todas las colonias son positivas.



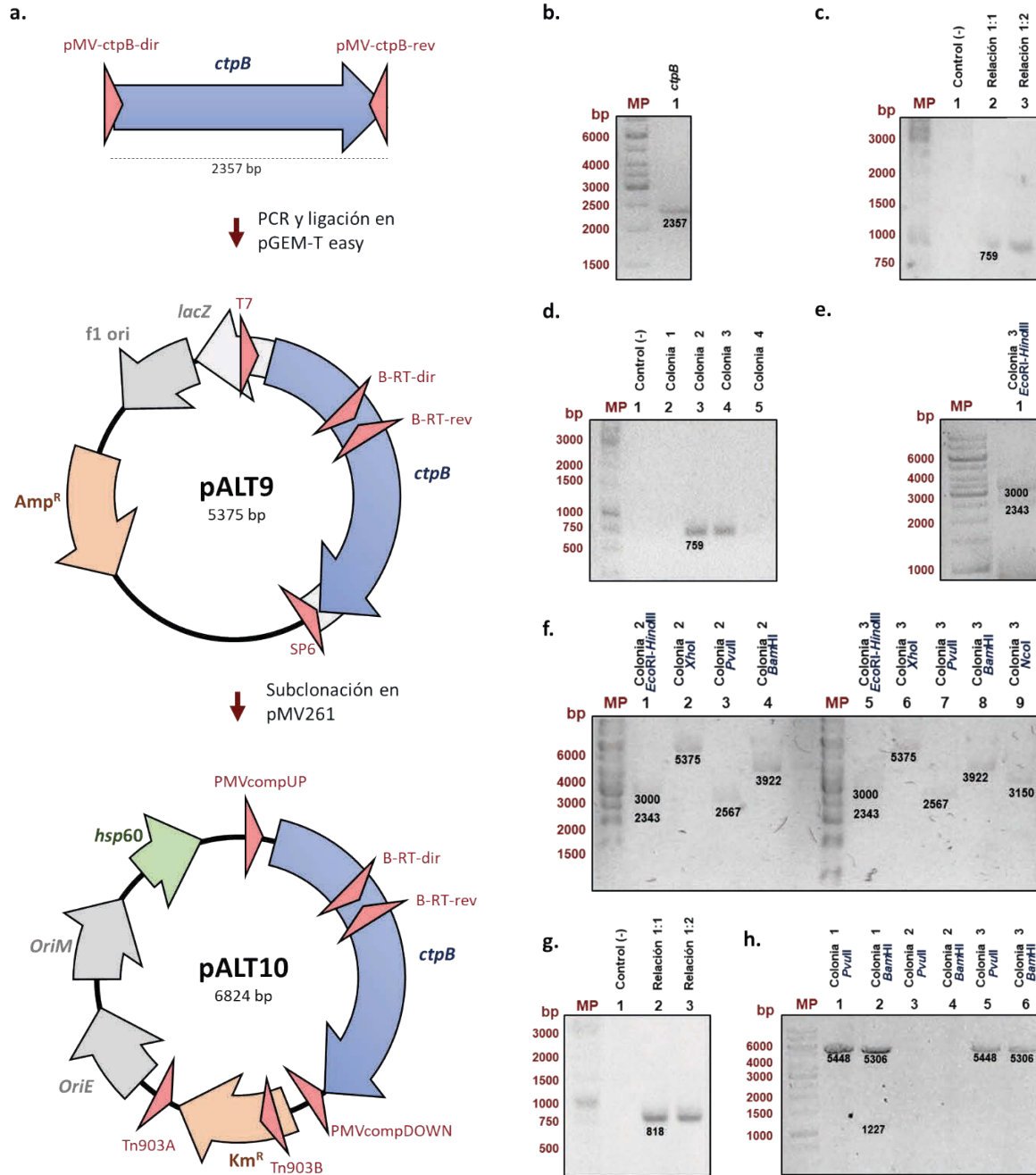
Procedimientos similares se usaron para generar el plásmido pALT10, que permite la expresión del gen *ctpB* de *M. tuberculosis* en micobacterias. La Figura 6-38 muestra la metodología detallada para generar pALT10 que resulta de clonar *ctpB* en el vector lanzadera micobacteria-*E. coli*, pMV261. En el proceso de clonación (Figura 6-38b), *ctpB*

fue inicialmente clonado en el vector pGEM-T easy® (Figura 6-38c) obteniendo 2 colonias positivas (Figura 6-38d-f). A partir del recombinante obtenido (pALT9), *ctpB* fue posteriormente subclonado en pMV261 (Figura 6-38g-h).

6.3.3.2 Sobreexpresión y purificación de CtpB en *E. coli*

La sobreexpresión de la proteína recombinante de CtpB se hizo de forma parecida a lo aplicado para CtpA, en este caso partiendo células de *E. coli* LMG194 transformadas con el plásmido recombinante pALT22, recombinante de expresión de CtpB fusionado a una etiqueta de His, y usando el sistema pBAD que permite la inducción de la proteína con L-arabinosa. Como se observa en la Figura 6-39b, a partir del lisado de dos colonias se detecta la expresión de CtpB por Dot-Blot. Las condiciones para la expresión de la proteína fueron: medio LB suplementado con 0,05% de agente inductor (L-arabinosa), 37 °C, 180 rpm de agitación durante 3 horas. El resultado de este análisis muestra que existe proteína recombinante para continuar con su purificación.

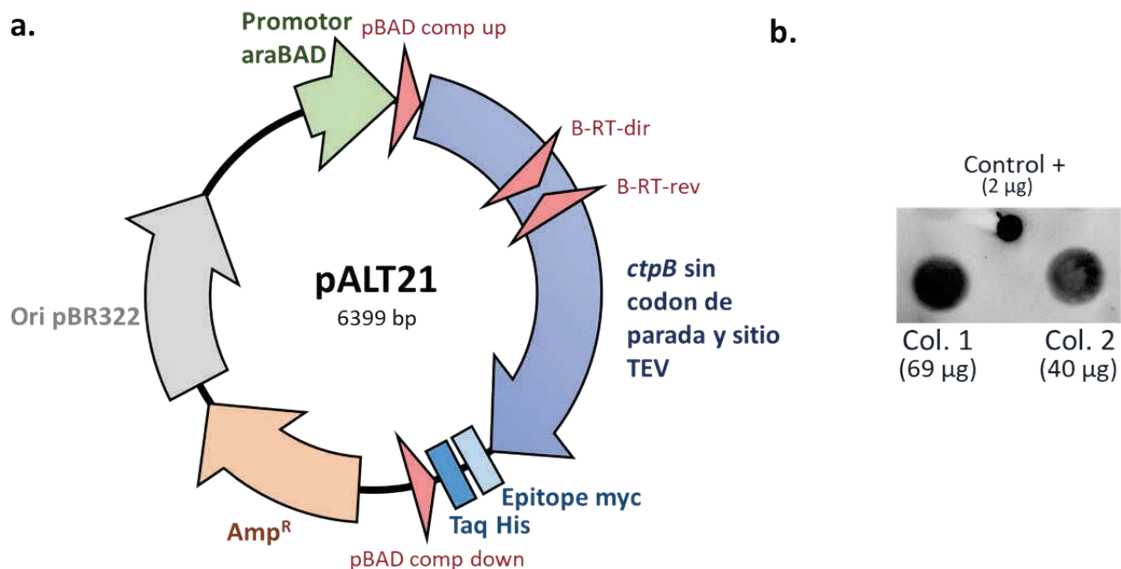
Figura 6-38: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpB en micobacterias. **a.** Esquema de clonación del gen *ctpB* en el plásmido pMV261. **b.** Amplificación por PCR del gen *ctpB* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores pMV-ctpB-dir/pMV-ctpB-dir, obteniendo un fragmento de 2357 pb. **c.** PCR de confirmación del producto de ligación para generar el plásmido pALT9 (iniciadores: T7/B-RT-rev), obteniendo el fragmento esperado de 759 pb. **d.** PCR de colonia para confirmación del plásmido pALT9 (iniciadores: T7/B-RT-rev), obteniendo el amplímero esperado en las colonias 2 y 3. **e** y **f.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT9, se espera que al usar las enzimas *EcoRI-HindIII* se produzcan dos bandas de 3000 y 2343 pb, con la digestión con *XhoI* se genere una banda de 5375 pb, y con la digestión con *PvuII* se generen cuatro bandas de 2567, 1263, 1024 y 521pb (por concentración del ADN e intensidades relativas al tamaño de la banda, solo se alcanzan a ver bandas mayores de 2kb), con la digestión con *BamHI* se generen tres bandas de 3922, 1227 y 226 pb, y con la digestión con *NcoI* se generen cuatro bandas de 3150, 1428, 530 y 267 pb. En este caso ambas colonias son positivas. **g.** PCR de confirmación producto de ligación para generar el plásmido pALT10 (iniciadores: PMVcompUP/B-RT-rev), obteniendo el fragmento esperado de 818 pb. **h.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT10, se espera que al usar la enzima *PvuII* se produzcan tres bandas de 5448, 855 y 521 pb, y con la digestión con *BamHI* se generen cuatro bandas de 5306, 1227, 226 y 651pb. En este caso las 1 y 3 colonias son positivas.



Como en el caso de CtpA, para la purificación de CtpB también se utilizó el sistema de expresión controlado proporcionado por el medio AI, y las mismas condiciones de cultivo que fueron empleados para CtpA (20 °C. 180 rpm y 18 h), obteniendo resultados favorables para la expresión de CtpB (Figura 6-40c y d). El cultivo bacteriano usado para la purificación se llevó hasta un OD_{600nm} de 4,5, y se aplicó la misma estrategia utilizada en la purificación de CtpA. En el proceso de purificación, la proteína recombinante CtpB se

solubilizó, se aisló de la bicapa lipídica de la bacteria (Figura 6-40c y d), y se eluyó mayoritariamente con imidazol a una concentración por encima de 150 mM (Figura 6-40). El procedimiento utilizado permitió recuperar 2,3 mg de proteína purificada, obteniendo un rendimiento de 4,5 mg/L de cultivo bacteriano, comparable con lo reportado en la literatura [200].

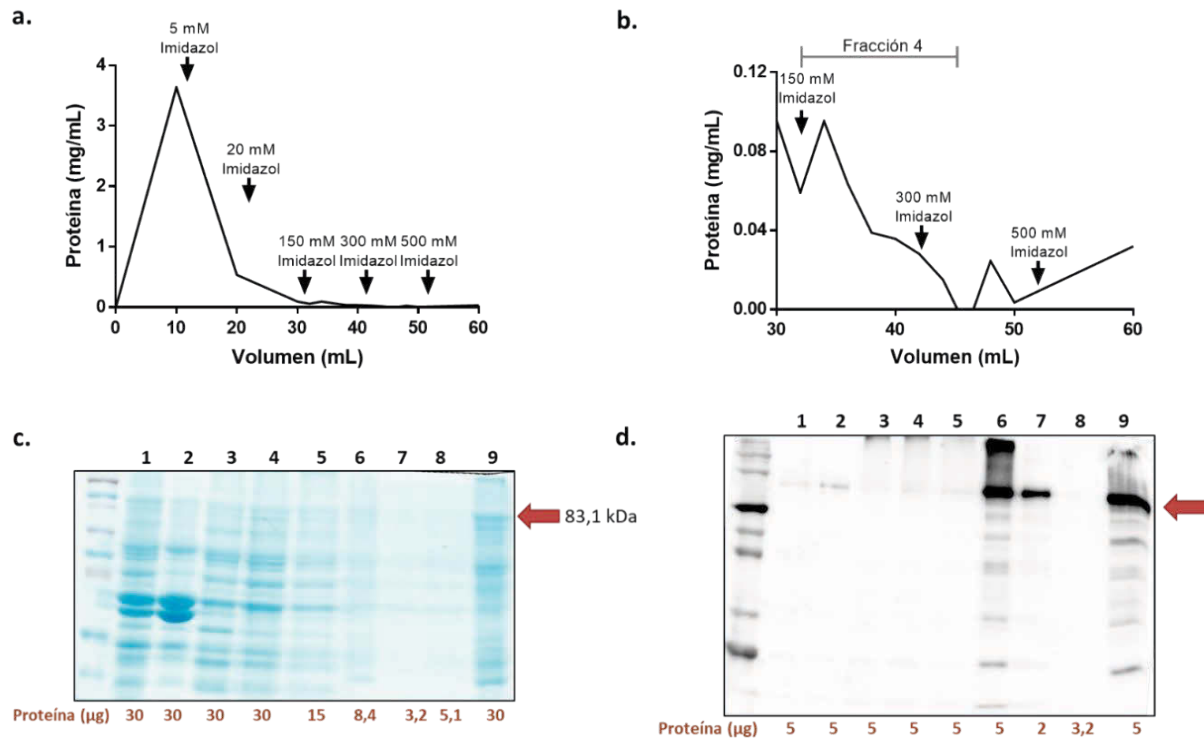
Figura 6-39: Sobreexpresión de CtpB en *E. coli*. **a.** Esquema del plásmido pALT21 para la sobreexpresión de CtpB. **b.** La sobreexpresión se realizó en *E. coli* cepa LMG194 y se verificó mediante ensayos de Dot-Blot usando anticuerpo 1º dirigido contra el His-tag (δ -His Epitope Tag Antibody Rabbit, Thermo Scientific) y secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate*, Thermo Scientific).



Los análisis mediante SDS-PAGE y Western-Blot para monitorear el proceso de purificación de CtpB (Figura 6-40c y d) muestran que a lo largo de cada paso de purificación: obtención de fracción de membrana plasmática, solubilización de membrana, cromatografía de afinidad y concentración de proteína, se observa una banda enriquecida a 83,1 kDa, que corresponde a CtpB recombinante. En el extracto final de la purificación se presentaron bandas contaminantes, sugiriendo co-elución con otras proteínas en la cromatografía de afinidad. En el caso del Western-Blot se observa una reacción cruzada detectando bandas de menor tamaño, lo que podría sugerir una posible degradación de la proteína recombinante. A pesar de tener un extracto de proteína recombinante purificado

parcialmente, este fue utilizado para hacer los ensayos de actividad enzimática con el fin de conocer la funcionalidad de la enzima después del proceso de purificación.

Figura 6-40: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpB. **a.** Perfil de elución de la cromatografía afinidad. El seguimiento se realizó cuantificando mediante Bradford el contenido de proteínas en las fracciones. **b.** Ampliación del perfil de elución de proteínas, en las fracciones donde se detectó la proteína de interés: 5 fracciones de 2 mL eluidas con imidazol 150 mM y 2 fracciones de 2 mL eluidas con imidazol 300 mM. Aunque el gradiente se hizo hasta imidazol 500 mM, por Western-Blot se determinó que en esta fracción no eluye la proteína **c.** SDS-PAGE de la purificación de CtpB. Carril 1. Fracción de membrana. 2. Pellet de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 3. Sobrenadante de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 4. Proteínas no retenidas. 5. Lavado con imidazol 20 mM. 6. Fracción 4 (Elución con imidazol 150 mM y 300 mM primeras fracciones). 7. Elución con imidazol 300 mM ultimas fracciones. 8. Elución con imidazol 500 mM. 9. Extracto de CtpB purificado. **d.** Western-Blot de monitoreo de la purificación de CtpB. Carril 1. Fracción de membrana. 2. Pellet de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 3. Sobrenadante de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 4. Proteínas no retenidas. 5. Lavado con imidazol 20 mM. 6. Fracción 4 (Elución con imidazol 150 mM y 300 mM primeras fracciones). 7. Elución con imidazol 300 mM ultimas fracciones. 8. Elución con imidazol 500 mM. 9. Extracto de CtpB purificado.

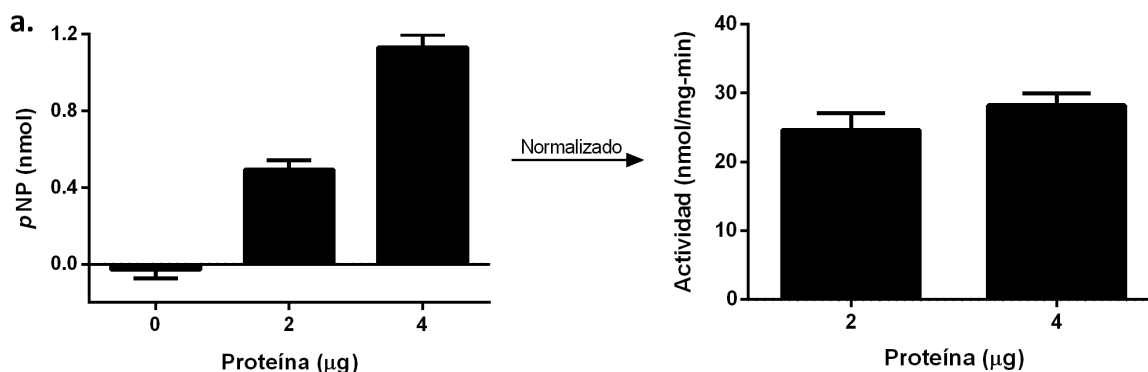


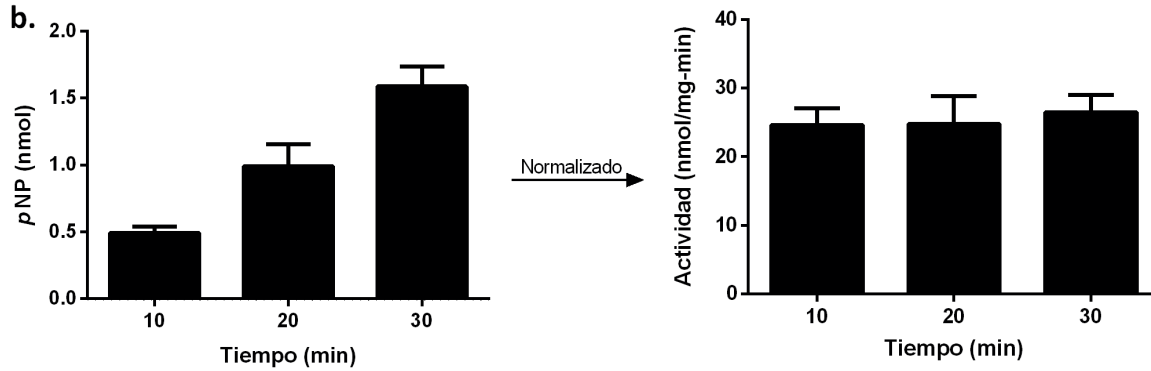
6.3.3.3 El extracto de CtpB purificado presentó actividad p NPPasa y Cu^+ ATPasa

La integridad del extracto de proteína pura de CtpB se verificó también mediante el ensayo de actividad p NPPasa, siguiendo la estrategia utilizada para CtpA recombinante (Numeral 6.3.2.3). En la Figura 6-41a se muestra la actividad p NPP obtenida variando la cantidad de proteína. Se encontró que a partir de 4 μ g de extracto purificado de CtpB, la actividad específica (normalizada) se hace constante al comparar con el valor obtenido utilizando solo 2 μ g de proteína. También se observó que con el mismo tiempo de reacción, la cantidad de p NP producido es mayor y cuantificable. El ensayo de actividad p NPPasa en función del tiempo, mostró valores de actividad constante desde 10 min de reacción, que resultaron ser confiables y alejados del ruido; por el contrario, en tiempos cortos se observaron valores de p NP bajos y poco confiables.

Los resultados de actividad enzimática demuestran que el proceso de purificación permitió obtener la enzima CtpB de forma funcional, con una actividad p NPPasa de $28,26 \pm 1,70$ nmol p NPP/mg-min, valor que se encuentra en el rango de lo reportado en la literatura para Ca^{2+} ATPasa SERCA ($12,1 \pm 0,4$ nmol p NPP/mg-min) [201], pero inestable con el tiempo para realizar experimentación adicional que requiere procedimientos más largos.

Figura 6-41: Actividad p NPPasa del extracto purificado de CtpB. a. Variación de la cantidad de proteína adicionada a la reacción enzimática. En el gráfico sin normalizar (izquierda) se obtiene mayor cantidad de producto a mayor cantidad de enzima. Cuando la actividad se normaliza por la cantidad de proteína (derecha) se observa un comportamiento constante. b. Actividad p NPPasa en función del tiempo de reacción. En el gráfico sin normalizar (izquierda) hay mayor cantidad de producto a mayor tiempo de reacción. Cuando la actividad se normaliza por el tiempo de reacción (derecha) se observa un comportamiento constante.

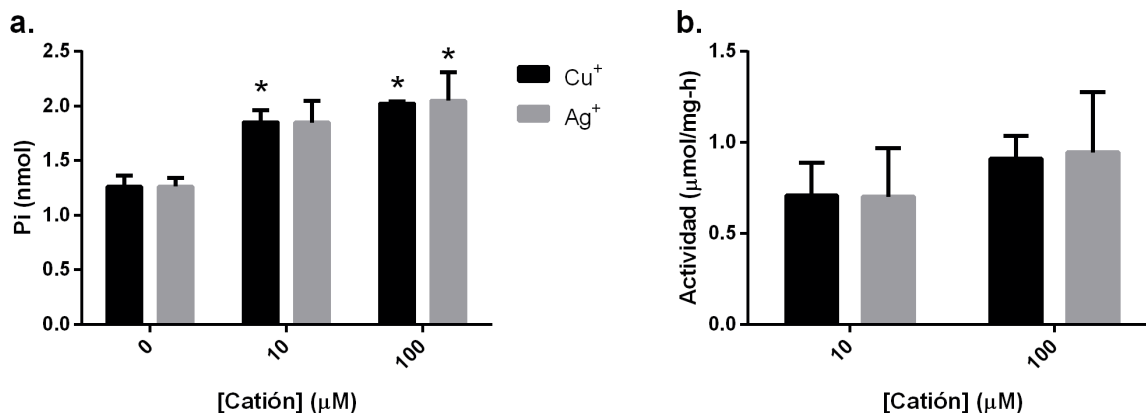




Para continuar con la caracterización de CtpB se hicieron ensayos específicos de actividad ATPasa, a partir del extracto purificado de CtpB. Se determinó la actividad ATPasa estimulada por los cationes Cu^+ y Ag^+ . Para ellos se realizaron reacciones enzimáticas con 2,5 μg de proteína, ATP 3 mM, pH 7,4 a 37 °C, durante 20 min. Los resultados obtenidos mostraron que el extracto de CtpB purificado presenta una actividad ATPasa estimulada por ambos iones, Cu^+ y Ag^+ (Figura 6-42), coincidiendo con su posible función Cu^+ ATPasa determinada en predicciones bioinformáticas, y corroborando su función de Ag^+ ATPasa observada previamente *in vitro* para este tipo de enzimas [24]. En la Figura 6-42a se muestra la cuantificación del fosfato inorgánico (Pi) producido en las reacciones enzimáticas al variar el contenido de catión en la reacción. La diferencia observada del Pi liberado entre reacciones suplementadas con o sin el catión no es muy grande, pero en algunos casos es estadísticamente significativa. La actividad ATPasa específica de cada catión (Figura 6-42b) fue de $15,2 \pm 2,1$ y $15,8 \pm 5,5$ nmol/mg-min al adicionar 100 μM de Cu^+ y Ag^+ , respectivamente (La concentración de catión se escogió con el fin de asegurar que la enzima este saturada y su actividad se encuentra a V_{max}). Los valores obtenidos son similares cuando se añaden 10 μM de cualquiera de los cationes ($11,8 \pm 3,0$ y $11,7 \pm 4,6$ nmol/mg-min, para Cu^+ y Ag^+ , respectivamente) sugiriendo que la actividad enzimática está cerca de la V_{max} . Con esta suposición, la velocidad máxima se puede comparar con la observada para otras Cu^+ ATPasas, como por ejemplo CopA de *E. coli* que tiene un valor de $27,3 \pm 4,5$ nmol/mg-min [102]. Que CtpB muestre un valor menor de V_{max} sugiere una menor capacidad de transporte del catión.

Figura 6-42: Estimulación por Cu^+ y Ag^+ de la actividad ATPasa del extracto purificado de CtpB. a. Cantidad de Pi liberado en la reacción enzimática en ausencia y presencia de Cu^+ y Ag^+ (10 y 100 μM cada uno). La reacción enzimática se hizo con 2,5 μg de proteína pura, pH 7,4, 37 °C y 20 minutos. Las diferencias significativas ($*p < 0,05$) se hicieron comparando los valores de Pi liberados en presencia y ausencia de catión. b.

Actividad Cu^+ y Ag^+ ATPasa utilizando 10 y 100 μM de catión. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas.



Al igual que CtpA, se observó que CtpB purificada perdió rápidamente su actividad enzimática. Ensayos paralelos y posteriores de actividad $p\text{NNPasa}$ evidenciaron que la enzima fue muy inestable al removerse los lípidos de la bicapa, perdiendo su actividad en cuestión de minutos. Se hicieron intentos de nuevas purificaciones y variación de diferentes condiciones de purificación y almacenamiento de la enzima, pero no fue posible encontrar un extracto que fuese activo con el tiempo, para poder determinar los parámetros cinéticos de la enzima. La estrategia alterna para el establecimiento de la actividad ATPasa de CtpB fue la misma que se hizo para la determinación de los parámetros cinéticos de CtpA, en donde se realizan los ensayos sobre preparaciones de membrana celular sobreexpresando la proteína, estableciendo la diferencia de actividad entre vesículas de membranas sobreexpresando la proteína y vesículas aisladas de la bacteria transformadas con el vector vacío.

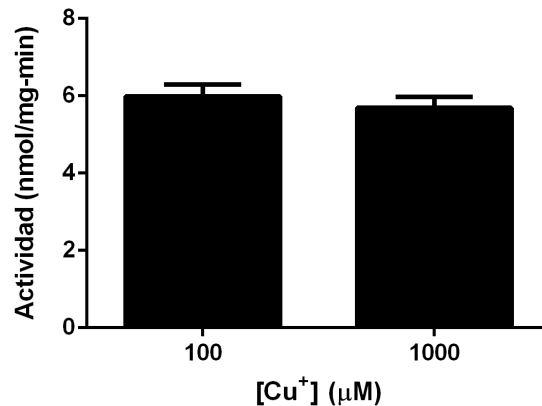
6.3.3.4 CtpB transporta Cu^+ en vesículas evertidas de membrana de *E. coli* ΔcopA

Al presentar dificultades para obtener un extracto de CtpB puro y activo con el tiempo, se optó por usar el sistema de expresión de *E. coli* para aislar vesículas evertidas de membrana enriquecidas con CtpB y hacer ensayos de transporte de Cu^+ . Al igual que los ensayos hechos con CtpA, se empleó una cepa mutante de *E. coli* deficiente en CopA (Cu^+ ATPasa endógena).

La Figura 6-43 muestra los resultados obtenidos del transporte de Cu^+ al suplementar las reacciones con 100 y 1000 μM de Cu^+ (concentraciones que aseguran la saturación de la

enzima), obteniendo una tasa de transporte de $5,99 \pm 0,30$ y $5,69 \pm 0,28$ nmol Cu⁺/mg proteína-min, respectivamente. Este valor es comparable con la V_{max} de CopA2 de *P. aeruginosa* ($6,7 \pm 0,4$ nmol Cu⁺/mg proteína-min), una Cu⁺ ATPasa relacionada con la metalación de cuproproteínas periplasmáticas [151]. El que CtpB tenga una tasa de transporte de Cu⁺ similar a CopA2, sugiere que su función podría ser la metalación de proteínas. Por otra parte, la tasa de transporte de CtpB es menor que la de EcCopA medida en condiciones muy similares a las utilizadas en el presente trabajo ($121,1 \pm 4,7$ nmol/mg-min), esto puede indicar que CtpA al tener una baja tasa de transporte podría no relacionarse con la desintoxicación del metal como lo hace EcCopA [208].

Figura 6-43: Transporte de Cu⁺ mediado por CtpB en vesículas de membrana evertidas. La actividad enzimática asociada a la tasa de transporte de Cu⁺ se representada en valores de nmol de Cu⁺ dentro de las vesículas por mg de proteína por minuto. Estos valores se obtuvieron al suplementar la reacción con dos concentraciones de Cu⁺ diferentes (100 y 1000 μM). Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas.



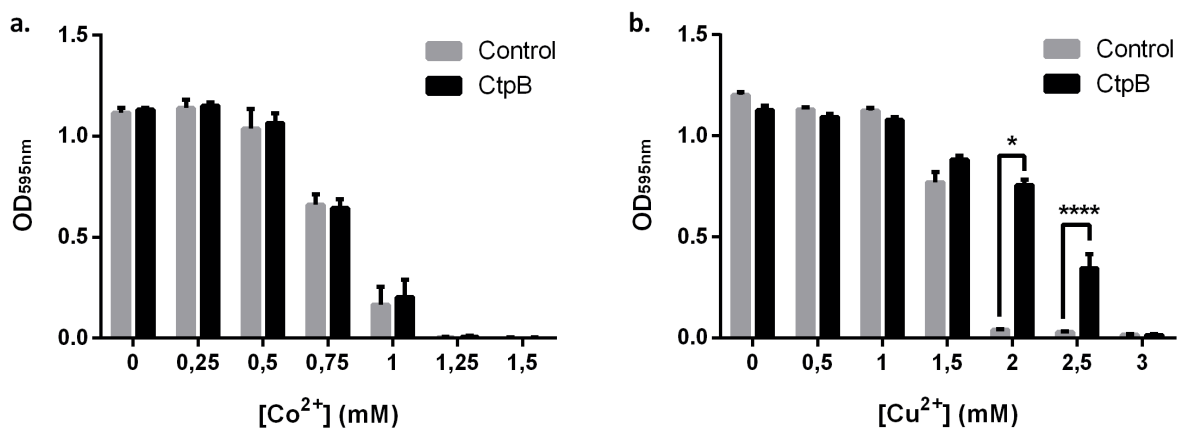
Los resultados de la Figura 6-43 muestran que el Cu⁺ fue internalizado en las vesículas evertidas, lo que indica que la enzima es capaz de transportar el metal desde el medio de reacción hacia el interior de la vesícula, que al comparar con la disposición de la membrana en células completas indicaría que el transporte del metal lo hace desde el citosol bacteriano hacia el espacio extracelular.

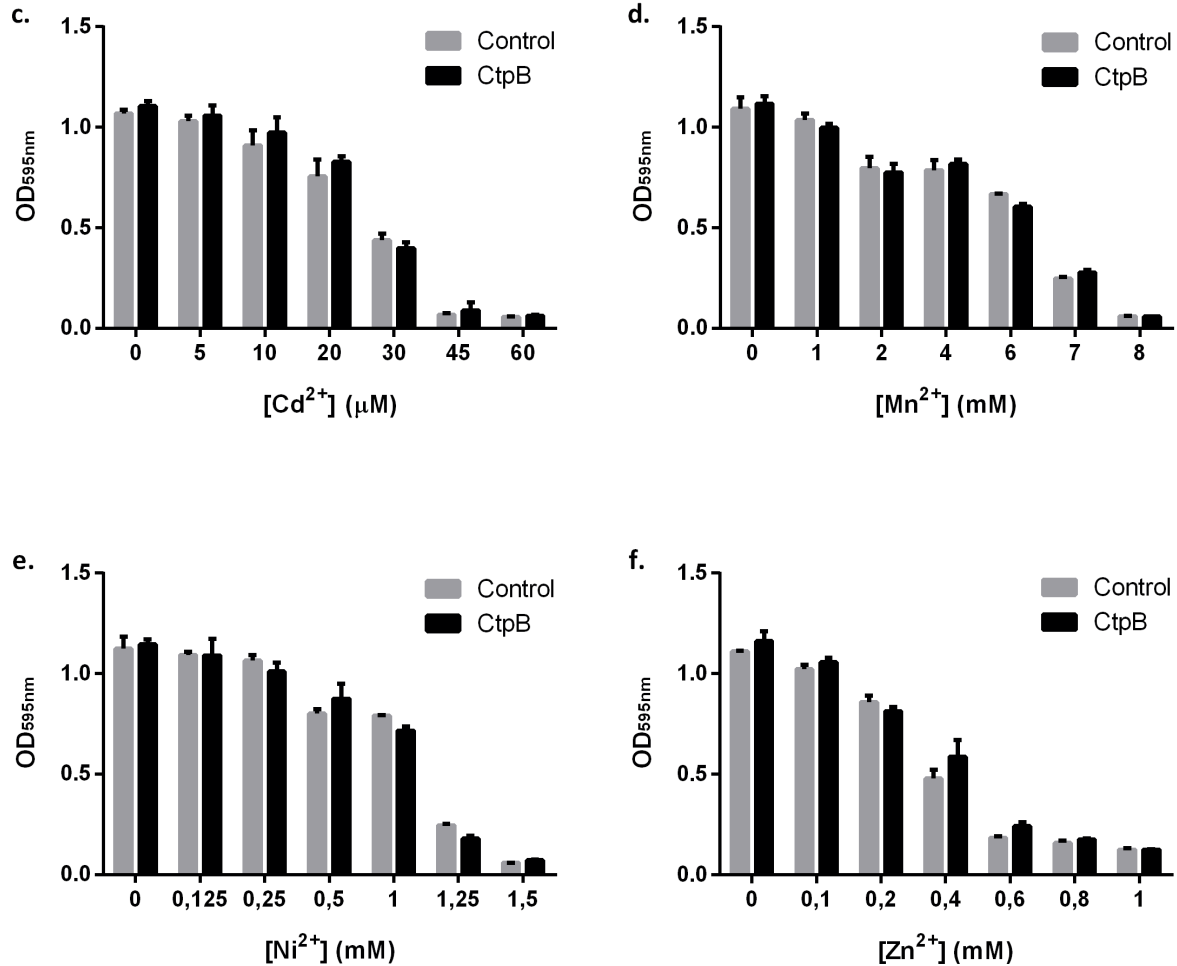
6.3.3.5 La sobreexpresión de CtpB confiere tolerancia a las micobacterias frente a Cu²⁺

Para hacer un acercamiento al sustrato y la direccionalidad del transporte de CtpB, se evaluó la capacidad de crecimiento de micobacterias en presencia de diferentes

concentraciones de los cationes posiblemente transportados. En este sentido, se evaluó la influencia de la sobreexpresión de CtpB en la tolerancia de células frente a concentraciones variables de Co^{2+} , Cd^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} o Zn^{2+} . Como se observa en la Figura 6-44, células de *M. smegmatis* expresando heterológamente CtpB fueron más tolerantes a concentraciones tóxicas de Cu^{2+} comparado con las células control tipo silvestre. Al suplementar los cultivos con 2 y 2,5 mM de Cu^{2+} (una cantidad tóxica para las cepas control de *M. smegmatis* mc²155), la cepa recombinante de *M. smegmatis* sobreexpresando CtpB exhibió un crecimiento bacteriano superior al de la cepa control transformada con pMV261. Para el caso de los demás cationes, no se observó una diferencia significativa en el crecimiento bacteriano en las cepas de estudio. Cabe anotar que estos ensayos se realizaron sin someter las células a calor por lo que el fenotipo observado corresponde a la expresión basal de la proteína. Este resultado permite pensar que CtpB está relacionada con el transporte de Cu^+ desde el interior hacia el exterior celular. Por lo tanto, el 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 en forma reducida desde el interior hacia el exterior celular [90].

Figura 6-44: Efecto de concentraciones variables de metales pesados en el crecimiento de *M. smegmatis* mc²155 sobreexpresando CtpB. El OD_{595nm} del cultivo bacteriano se midió luego de 72 h de cultivo en medio líquido LB suplementado con concentraciones variables de los cationes de a. Co^{2+} , b. Cu^{2+} , c. Cd^{2+} , d. Mn^{2+} , e. Ni^{2+} y f. Zn^{2+} . En negro se muestran los valores para la cepa recombinante que sobreexpresa CtpB y en gris el control que corresponde a la cepa transformada con el vector vacío. Los datos se muestran como el promedio \pm SEM derivado de medidas por triplicado biológico. Las diferencias significativas corresponden a valores de * $p \leq 0,05$ y **** $p \leq 0,0001$.





6.3.3.6 La actividad ATPasa de CtpB es estimulada por Cu⁺

La membrana plasmática de células de *M. smegmatis* mc²155 sobreexpresando CtpB se utilizó para determinar la actividad ATPasa mediada por CtpB y estimulada por cationes de metales pesados. Como se observa en la Figura 6-45, la actividad ATPasa *in vitro* de CtpB estimulada por 10 μM de Cu⁺ presenta un valor de 2,31 ± 0,14 nmol/mg-min. Cabe anotar, que al ser un extracto crudo de membrana, se hace necesario descontar la contribución de otras enzimas ATPasas de la membrana, para ello se realizaron reacciones enzimáticas paralelas usando vesículas de membrana aisladas de bacterias transformadas con el vector pMV261 vacío y su valor de actividad se descontó de los valores de actividad enzimática reportados.

6.3.3.7 Condiciones óptimas para la actividad ATPasa de CtpB embebida en membrana de *M. smegmatis*

Previo a la determinación de los parámetros cinéticos de CtpB, se estimaron las condiciones óptimas de actividad ATPasa *in vitro* a partir de proteína recombinante embebida en membrana plasmática de micobacteria. Como se muestra en la Figura 6-46a, se encontró que la actividad ATPasa no específica (sin normalizar por la cantidad de proteína) fue proporcional a la cantidad de proteína añadida a la reacción enzimática. Como es de esperarse, al normalizar la actividad por la cantidad de proteína añadida a la reacción, los valores de actividad se hicieron constantes a partir de un valor determinado de proteína, en este caso, 20 μg . Por ello, en el diseño experimental se asignó 20 μg como la cantidad de proteína de membrana óptima para la reacción enzimática, en un volumen final de 50 μL . En la Figura 6-46b se muestra la actividad en función del tiempo, encontrando un aumento en la producción de Pi con el tiempo de reacción, que al normalizar los valores, se hace constante a partir 10 min. Sin embargo, al considerar la desviación de las medidas, se observa una reducción a un mayor tiempo de reacción, por lo que se consideró 60 min como tiempo óptimo para las medidas de actividad. Por su parte, en la Figura 6-46c se muestra la actividad de CtpB en función de la temperatura, mostrando que la proteína funciona de manera óptima a 37°C, y se pierde rápidamente actividad a temperaturas menores a 18 °C y superiores a 45 °C, lo que demuestra que la actividad de la enzima es sensible al calor. Adicionalmente, la actividad de CtpB fue dependiente del pH del medio de reacción con un máximo de actividad a pH cercanos a la neutralidad (Figura 6-46d), similar a lo observado en otras ATPasas bacterianas con actividad máxima a pH 7,4 e inhibidas a un pH menor de 6 [202]. Finalmente, la adición de cisteína a una concentración final de 0,5 mM estimuló la actividad Cu^+ ATPasa de CtpB, como sucedió con CtpA, que tuvo un máximo de actividad al suplementar la reacción con 0,3 mM de cisteína. Basados en todo lo anterior, las reacciones enzimáticas para determinar los parámetros cinéticos de CtpB se hicieron a un volumen de 50 μL , donde se utilizaron 20 μg de proteína, cisteína 0,5 mM, pH 7,4, 37°C y 60 minutos de reacción.

Figura 6-45: La actividad ATPasa de CtpB es estimulada por Cu^+ . Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados. La grafica muestra el valor de la actividad ATPasa específica estimulada por los siguientes iones: Co^{2+} , Cu^+ , Cu^{2+} , Mn^{2+} , Ni^{2+} y Zn^{2+} en una concentración de 10 μM . El ensayo se hizo utilizando membrana plasmática de *M. smegmatis* mc²155 transformada con pMV261 (Barras grises) y pALT10 (Barras negras). En cada condición se hicieron medidas por triplicado técnico, las barras de error

corresponden al SEM de los datos. Se usó la prueba T de student para evaluar las diferencias estadísticamente significativas (** $p < 0,01$).

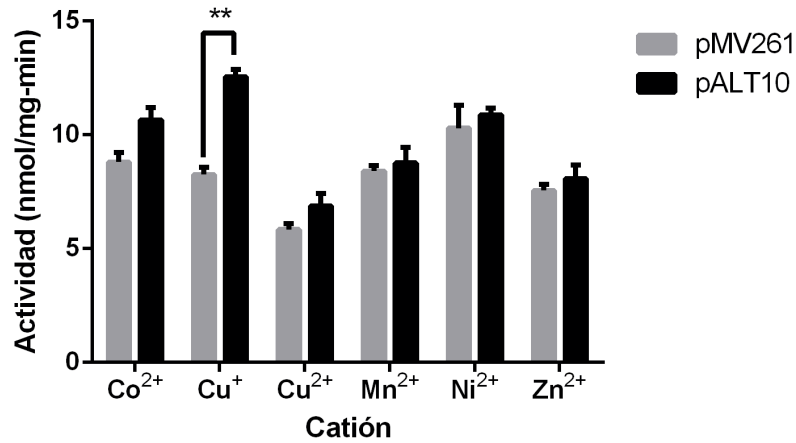
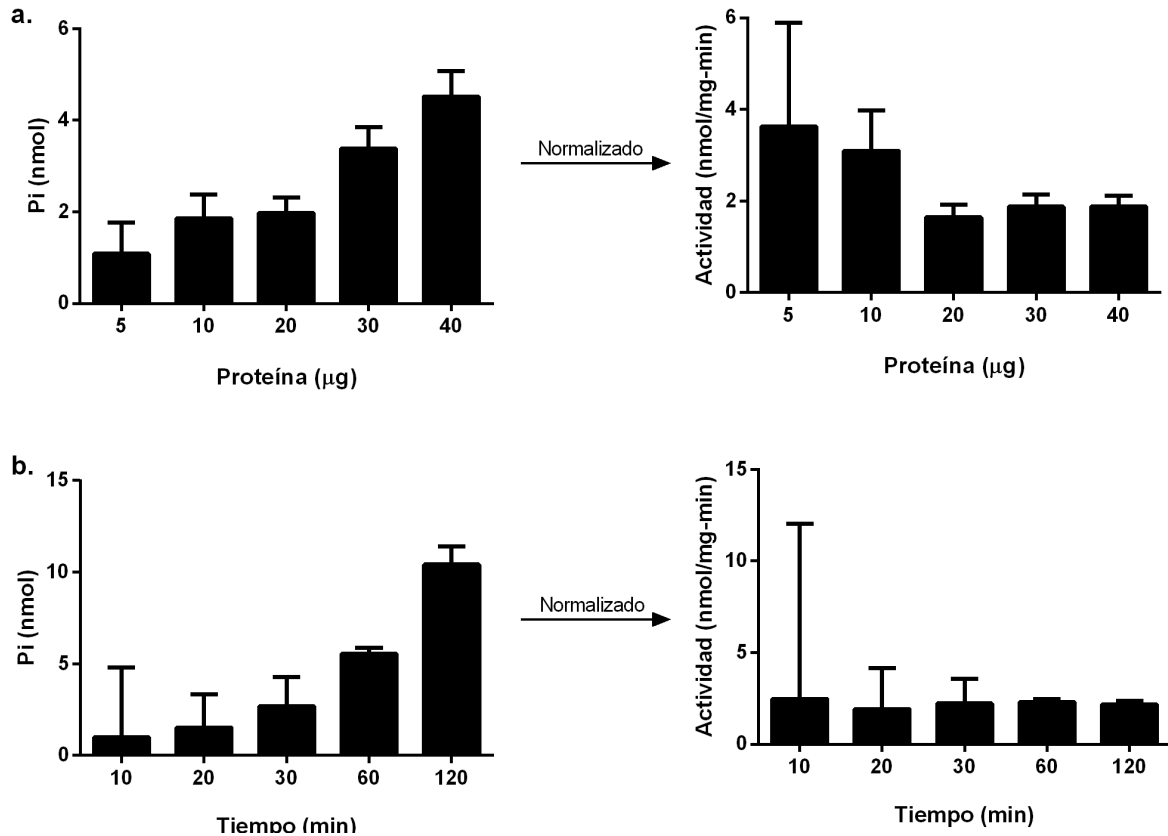
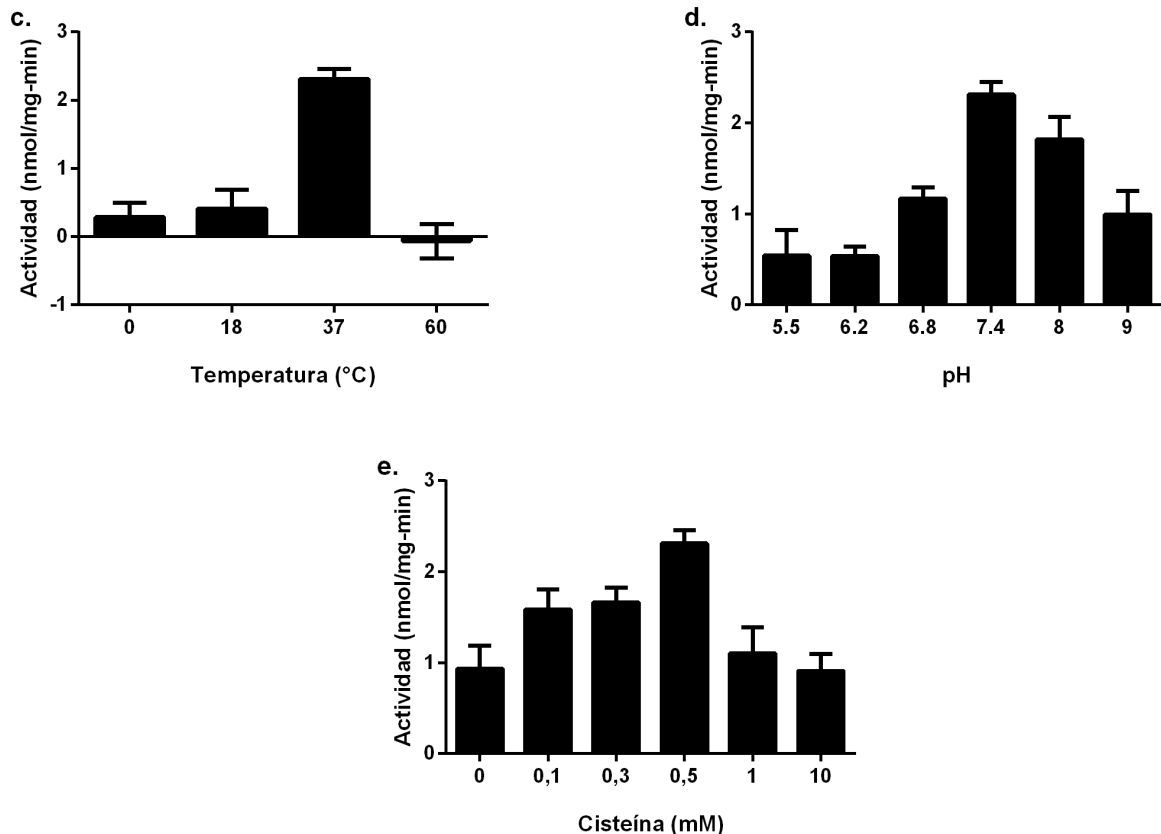


Figura 6-46: Condiciones óptimas para la actividad Cu⁺ ATPasa de CtpB sobreexpresada en la membrana de *M. smegmatis* mc²155. La actividad Cu⁺ ATPasa se midió en membrana de *M. smegmatis* mc²155 enriquecidas con CtpB. Se variaron condiciones que afectan los parámetros enzimáticos como: **a.** cantidad de proteína, **b.** tiempo de reacción, **c.** temperatura, **d.** pH y **e.** concentración de cisteína. En cada condición se hicieron medidas por triplicado y los datos se grafican como el promedio ± SEM.





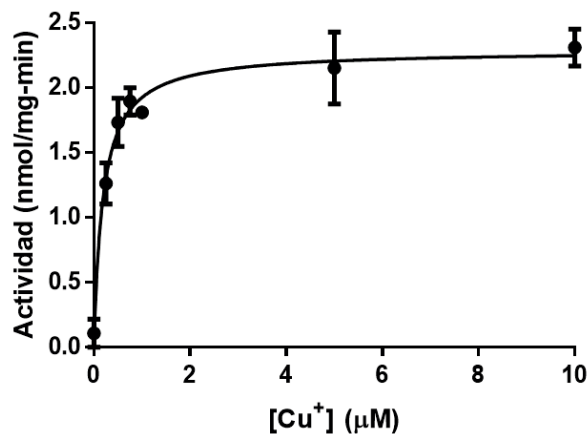
6.3.3.8 La actividad ATPasa de CtpB sigue una cinética de Michaelis-Menten frente a Cu⁺

La proteína CtpB embebida en la membrana micobacteriana catalizó la hidrólisis de ATP dependiente de concentraciones variables de Cu⁺. Cuando Mg²⁺, ATP y Cu⁺ fueron añadidos al medio de reacción, la actividad Cu⁺ ATPasa alcanzó una V_{max} de $2,29 \pm 0,10$ nmol/mg-min en concentraciones de Cu⁺ por encima de 5 μ M. La hidrólisis de ATP se ensayó en presencia de concentraciones variables de Cu⁺ libre entre 0,25 y 10 μ M usando una concentración de ATP constante de 3 mM, exhibiendo un $K_{1/2}$ de $0,19 \pm 0,04$ μ M, y una V_{max} de $2,29 \pm 0,10$ nmol/mg/min (Figura 6-47). Estos resultados confirman que CtpB fue transcrita y traducida, y el producto se ensambló en la membrana de *M. smegmatis* como una enzima funcional.

Al comparar los valores de las constantes cinéticas obtenidas para CtpB, con otras Cu⁺ ATPasas, se encuentra que la V_{max} de CopA de *E.coli* (*EcCopA*, $27,3 \pm 4,5$ nmol/mg-min) [102] es un orden de magnitud mayor al obtenido para CtpB. La diferencia radicaría

principalmente en que nuestros experimentos se realizaron utilizando extracto proteico crudo de membrana, lo que subestimaría la actividad enzimática específica de CtpB. LA constante $K_{1/2}$ obtenida para CtpB puede ser comparada solo con la Cu⁺ ATPasa ATP7A de humano que tiene un valor de $0,6 \pm 0,04 \mu\text{M}$ [205], las dos se encuentran en el mismo orden de magnitud. Este parámetro indica que CtpB tiene una mayor afinidad por el Cu⁺ y puede funcionar cuando el metal se encuentra a bajas concentraciones.

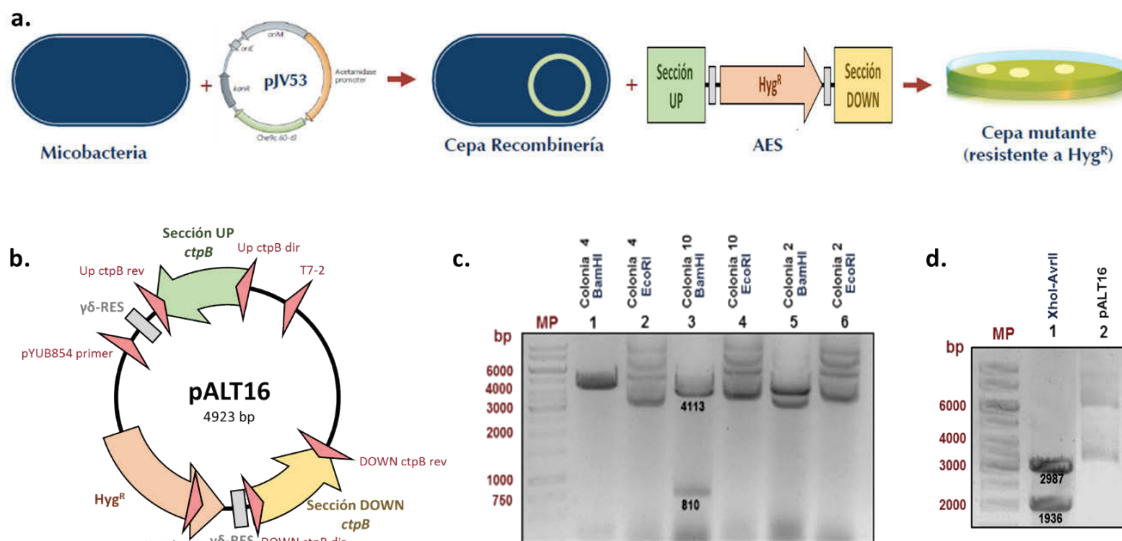
Figura 6-47: La actividad Cu⁺ ATPasa de CtpB se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. Se cuantificó el fosfato liberado de la hidrólisis de ATP en presencia de concentraciones variables de Cu⁺ entre 0,25 y 10,0 μM con valores de $K_{1/2}$ de $0,19 \pm 0,04 \mu\text{M}$ y V_{max} $2,29 \pm 0,10 \text{ nmol/mg}\cdot\text{min}$. Los valores de $K_{1/2}$ y V_{max} se calcularon utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas.



6.3.3.9 Construcción del mutante de *M. tuberculosis* defectivo en el gen *ctpB*

Al igual que para CtpA, se quiere conocer la contribución de CtpB en la homeostasis iónica bacteriana y la virulencia de *M. tuberculosis*, por lo que se optó por construir un mutante defectivo en el gen usando la estrategia de recombinación. La estrategia experimental utilizada se muestra en la Figura 6-48a. El sistema empleado para la construcción del AES de *ctpB* es el plásmido pYUB854, donde se insertan las regiones corriente arriba y abajo de *ctpB* flanqueando el casete de *Hyg^R*. El plásmido que contiene el AES de *ctpB* es pALT16 (Figura 6-48b), que se corroboró mediante mapeo de restricción y secuenciación (Figura 6-48c). El AES de tamaño de 2987 pb se obtuvo por digestión de pALT16 con las enzimas de restricción *XhoI* y *AvrII* (Figura 6-48d).

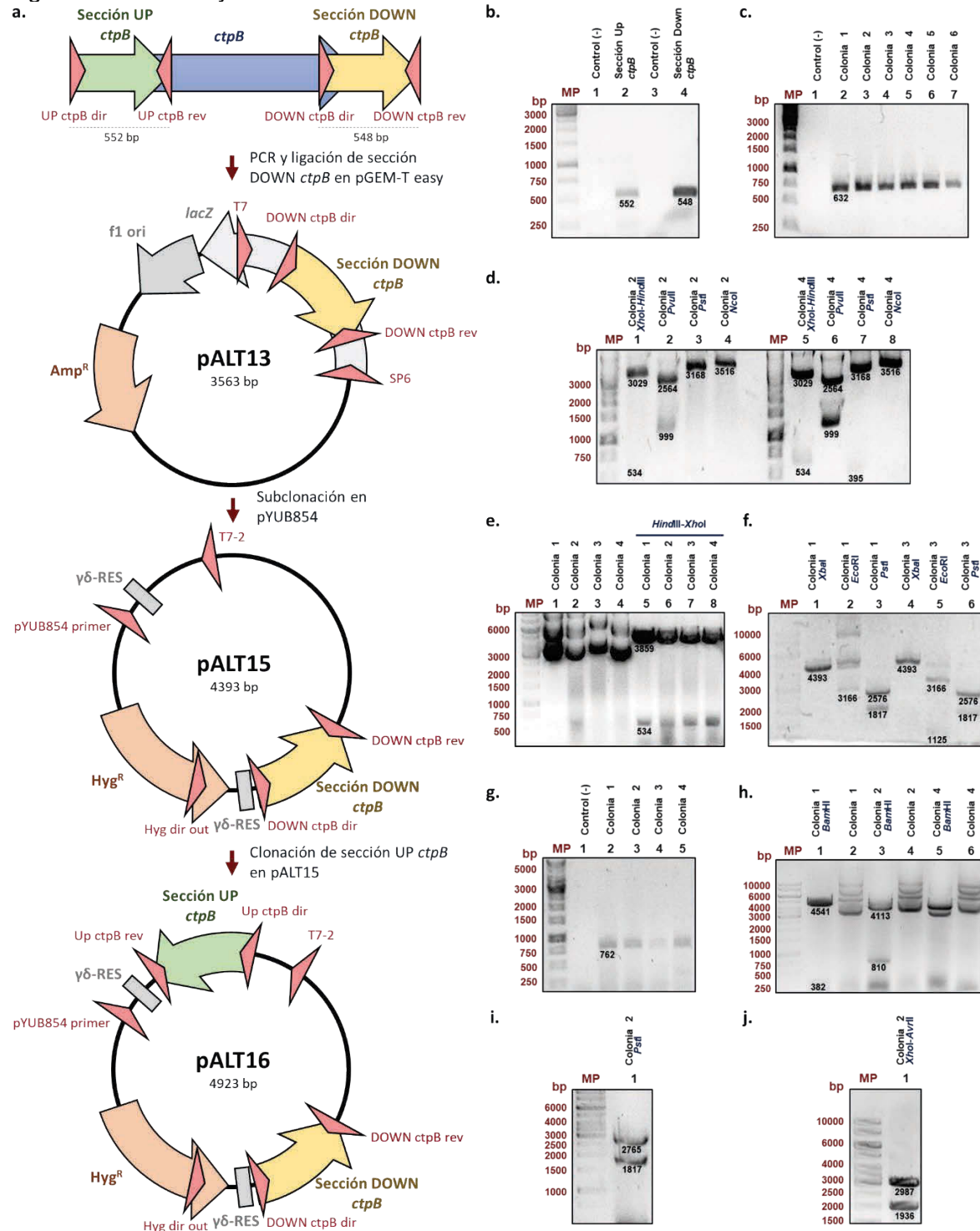
Figura 6-48: Estrategia para la construcción del mutante de *M. tuberculosis* defectivo en *ctpB*. **a.** Esquema de obtención de mutantes defectivos en genes por la técnica de recombinería. **b.** Mapa del plásmido pALT16 que contiene el AES de *ctpB*. **c.** Mapeo de restricción de pALT16 extraído de dos colonias positivas. Se espera que al usar la enzima *Bam*HI se produzcan dos bandas de 4113 y 810 pb. En este caso la colonia 10 es positiva. **d.** Liberación de AES de *ctpB* (2987 pb) por digestión con *Xho*I y *Avr*II.



La construcción detallada del plásmido pALT16 se describe en la Figura 6-49a, resultado de la clonación de la región corriente abajo de *ctpB* (Figura 6-49b) en el vector pGEM-T easy® (Figura 6-49c y d), que posteriormente fue subclonado en vector pYUB854 (Figura 6-49e y f) generando al plásmido recombinante pATL15. Este último fue usado como vector para clonar la región corriente arriba del *ctpB* (Figura 6-49a) y obtener el constructo final pALT16 (Figura 6-49g-j).

Figura 6-49: Obtención del AES de *ctpB*. **a.** Esquema de construcción de útiles génicos para obtener el AES de *ctpB*. **b.** Amplificación por PCR de las secciones UP y DOWN de *ctpB* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores UP-*ctpB*-dir/UP-*ctpB*-rev y DOWN-*ctpB*-dir/DOWN-*ctpB*-rev, obteniéndose los amplímeros esperados de 552 y 548 pb, respectivamente. **c.** PCR de colonia para la confirmación del plásmido pALT13 (iniciadores: T7/DOWN-*ctpB*-rev), se espera un fragmento de 632 pb. **d.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT13, que se hizo a partir de las colonias 2 y 4 seleccionadas aleatoriamente, se espera que al usar las enzimas *Xho*I-*Hind*III se produzcan dos bandas de 3029 y 534 pb, la enzima *Pvu*II dos bandas de 2564 y 999 pb, la enzima *Pst*I dos bandas de 3168 y 395, y la enzima *Nco*I una banda de 3516 pb. Ambas colonias son positivas para la subclonación se usó la colonia 4. **e y f.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT15, se espera que al usar las enzimas *Xho*I-*Hind*III se produzcan dos bandas de 3859 y 534 pb, la enzima *Xba*I una banda de 4393 pb, la enzima *Eco*RI dos bandas de 3166 y 1125, y la enzima *Pst*I dos bandas de 2576 y

1817 pb. Las colonias 1 y 3 fueron positivas; se seleccionó la 3 para clonar la sección UP de *ctpB*. **g.** PCR de colonia para la confirmación del plásmido pALT16 (iniciadores: pYUB854 primer/UP *ctpB*-dir), obteniendo el amplímero esperado de 762 pb. **h y i.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT15, se espera que al usar la enzima *Bam*HI se produzcan dos bandas de 4113 y 810 pb, y la enzima *Pst*I dos bandas de 2765 y 1817 pb. Encontrando que la colonia 2 es positiva. **j.** Liberación de AES de *ctpB* (2987 bp) por digestión con *Xho*I y *Avr*II.

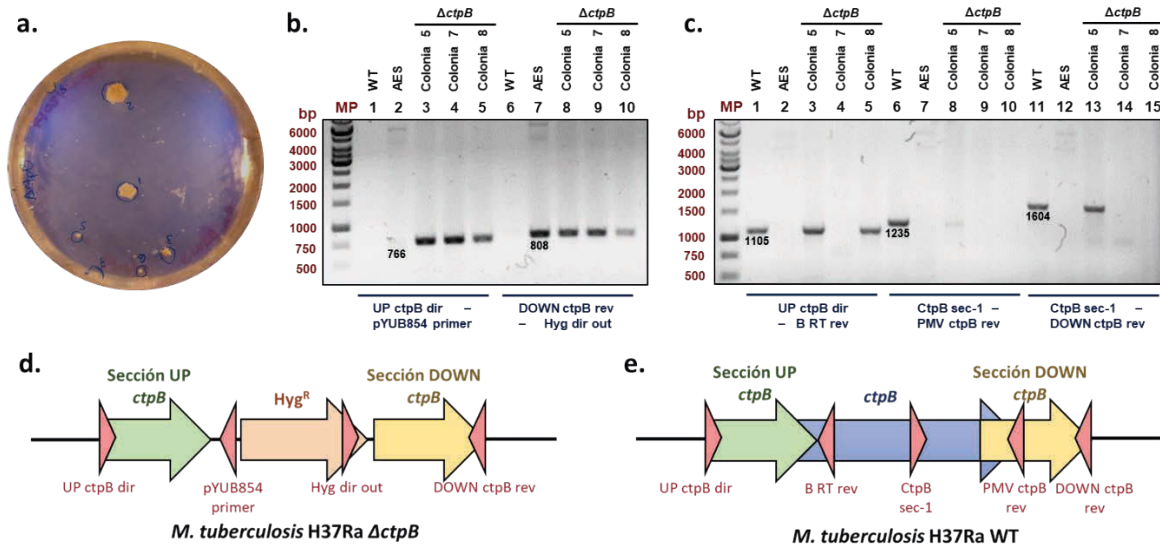


El paso final para la obtención del mutante por sustitución de *M. tuberculosis* H37Ra, $\Delta ctpB$, es la transformación del AES en la cepa de recombinería inducida con acetamida al 0,2 %. En este paso se hicieron varios intentos siguiendo la metodología sugerida por Van Kessel [152], pero hasta la fecha no se han obtenido colonias resistentes a Hyg. No es posible afirmar que al generar la mutación en el gen *ctpB* la población de estas bacterias no sea capaz de crecer en este medio de cultivo, ya que el gen *ctpB* es no esencial [119]. Por lo tanto, fue necesario hacer modificaciones del procedimiento con el fin de obtener de colonias resistentes a Hyg. El primer cambio fue variar el cultivo de la cepa de recombinería. Se utilizó 7H9-OADC-Km-Chx-Tween 80 suplementado con succinato 0,2 %, la modificación en este punto fue la adición de OADC que en el caso de la referencia, fue excluido por interferencias en los procesos de recombinación [209]. Esta modificación del medio de cultivo permitió un mayor crecimiento bacteriano, obteniendo cultivos con un OD_{600nm} más altos. Cuando el cultivo masivo llegó a un OD_{600nm} de 0,6 se indujo la expresión de las proteínas de recombinación con acetamida al 0,2 % y como segunda modificación se adicionó glicina 1,5 %, que aumenta la eficiencia de transformación de ADN en micobacterias de crecimiento lento [209, 210]. En la transformación se aumentó la cantidad de AES de *ctpB* transformado, se emplearon 200 ng en vez de 100 ng de ADN. Haciendo todos estos cambios se obtuvieron colonias resistentes a Hyg 50 µg/mL, como se muestra en la placa de la Figura 6-50a.

El análisis del genotipo mutante de las colonias se hizo por PCR (Figura 6-50b-e) como se muestra en la Figura 6-50d y e. Mediante PCR se analizaron las posibles colonias mutantes en *ctpB* ($\Delta ctpB$), como control positivo y negativo, se utilizó ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra cepa silvestre (WT) y el plásmido pALT16 que contiene el AES de *ctpB* (AES), respectivamente. Los controles fueron seleccionados de tal manera que el primero comprueba la presencia del gen y el segundo la mutación del mismo. En la Figura 6-50b y d se muestra el primer análisis que permite evidenciar la presencia del gen de resistencia a Hyg en la región genómica de *ctpB*, donde debió ocurrir la mutación por sustitución, usando dos juegos de iniciadores que anillan en el casete de Hyg^R y en la región corriente arriba o abajo de *ctpB*. En todas las colonias analizadas se evidencia la inserción del casete en la región del genoma esperada. Para confirmar el genotipo mutante es necesario demostrar la ausencia de *ctpB* en el genoma, en la Figura 6-50c y e se muestra este análisis. En este caso la mutación se indica por ausencia de un producto de PCR al usar los tres diferentes juegos de iniciadores que anillan en la parte interna y externa del gen.

El primer juego de iniciadores UP *ctpB* dir y B RT rev confirma que la colonia 7 es mutante. En el producto con el segundo juego de iniciadores CtpB sec 1 y PMV *ctpB* rev se observan que las colonias 7 y 8 son mutantes y esto se reafirma con el tercer juego de iniciadores (CtpB sec 1 y DOWN *ctpB* rev). Los resultados anteriores demuestran que las colonias 7 y 8 son los mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB*, pero en el caso de la colonia 8 la mutación ocurre cerca al extremo 3', mientras que la colonia 7 se tiene la mutación esperada. Para efectos de experimentos posteriores, las dos colonias serian apropiadas; sin embargo, con la colonia 7 se tiene una mayor seguridad en la mutación del gen *ctpB*, razón por la que se decide continuar trabajando con esta colonia.

Figura 6-50: Obtención del mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* y comprobación del genotipo. a. Posibles colonias mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB*, luego de la transformación con el AES de la cepa de recombinería inducida y seleccionadas en medio solido 7H11-OADC-Hyg-Km-Chx. b. Comprobación del genotipo mutante amplificando parte del casete de Hyg y *ctpB*. c. Comprobación del genotipo mutante amplificando regiones internas de *ctpB*. En todas las PCR de comprobación se muestra el análisis hecho a 3 posibles colonias de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* (Δ *ctpB*) y se usaron como controles ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Ra cepa silvestre (WT) y el plásmido pALT16 (AES) d. Esquema de la región del genoma de *M. tuberculosis* H37Ra donde ocurrió la sustitución de *ctpB* por el casete de Hyg, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR positivas en colonias mutantes). e. Región genómica de *ctpB* en *M. tuberculosis* H37Ra, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR negativas en colonias mutantes).



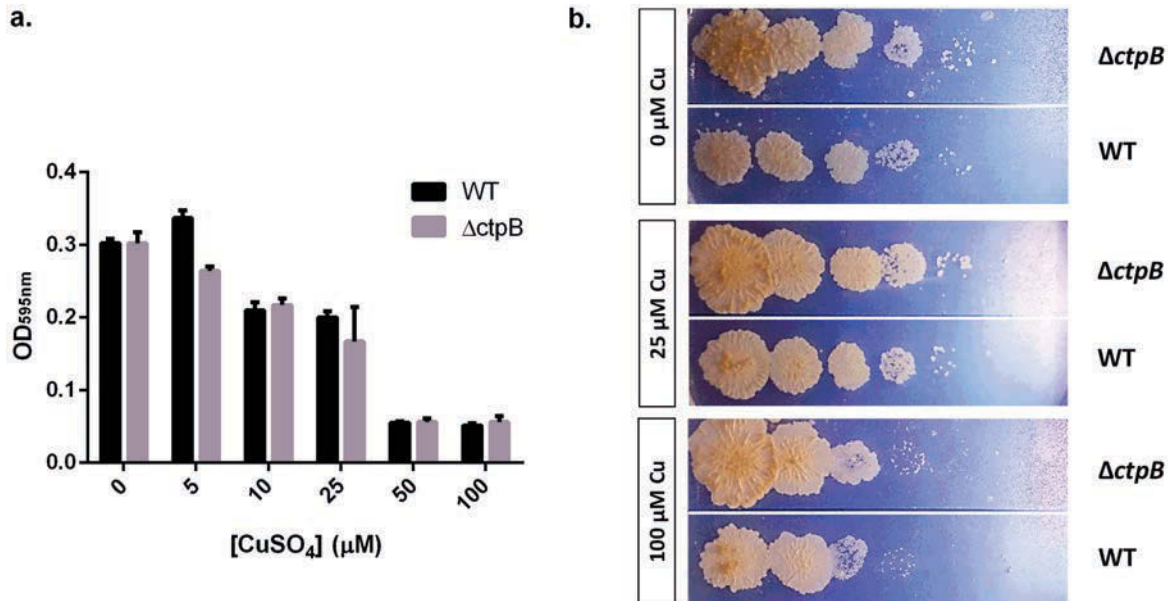
6.3.3.10 Ensayo de toxicidad de Cu^{2+} en células de *M. tuberculosis* defectivas en el gen *ctpB*

Un vez construido y confirmado el mutante de *M. tuberculosis* defectivo en el gen *ctpB*, hizo un ensayo fenotípico de crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones variables de Cu con el fin de conocer el efecto de la ausencia de la ATPasa en la viabilidad celular. Dentro de las caracterizaciones funcionales de CtpB en el presente trabajo, se determinó el efecto que tiene la sobreexpresión de CtpB en el crecimiento de *M. smegmatis*, encontrando una mayor tolerancia al metal por parte de la cepa que sobreexpresa el transportador (Numeral 6.3.3.5). Como ensayo complementario a este análisis funcional se planteó ver el efecto que tiene la delección del gen *ctpB* en el crecimiento bacteriano en diferentes concentraciones de Cu^{2+} y ver si tiene el efecto contrario a la sobreexpresión haciendo más sensible a la bacteria. En la Figura 6-51 se muestran los resultados obtenidos de este ensayo. Se encontró que el mutante crece de forma similar a la cepa silvestre tanto en medio líquido como en medio sólido, indicando que la mutación del gen *ctpB* en *M. tuberculosis* H37Ra no tiene un efecto en el crecimiento de la bacteria en presencia de Cu^{2+} .

En otras bacterias como *P. auroginosa* y *Sinorhizobium meliloti* que codifican más de dos Cu^+ ATPasas en su genoma, se ha encontrado las ATPasas pueden cumplir dos funciones diferentes como desintoxicación del metal y metalación de enzimas extracitoplasmáticas. Se ha evidenciado que al mutar los genes que la Cu^+ ATPasas relacionadas de la metalación de enzimas, la viabilidad celular en presencia de Cu no resulta en fenotipo sensible al metal [151, 166], tal como se observó en el caso de la mutación de *M. tuberculosis* en la Cu^+ ATPasas CtpB. Esta evidencia corrobora los resultados obtenidos en el análisis transcripcional, los ensayos funcionales y cinética enzimática de CtpB, que muestran que el transportador no se comporta como una ATPasa encargada de la desintoxicación del metal, pero si sugería que ella puede encargarse de la metalación de proteínas extracitoplasmáticas, proveyéndolas del cofactor para que sean funcionales y posiblemente se encarguen de una respuesta a una condición de hipoxia como sugieren nuestros resultados del análisis transcripcional.

Figura 6-51: Efecto de concentraciones variables de Cu^{2+} en el crecimiento del mutante defectivo de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpB . a. El $\text{OD}_{595\text{nm}}$ del cultivo bacteriano se midió luego de 20 días de cultivo en medio Sauton modificado que contiene

concentraciones variables de los cationes de CuSO₄. En negro se muestran los valores para la cepa silvestre de *M. tuberculosis* H37Ra (WT) y en gris el mutante de *M. tuberculosis* H37Ra $\Delta ctpB$ ($\Delta ctpB$). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM derivado de medidas por triplicado biológico. **b.** El crecimiento de las dos cepas de *M. tuberculosis* (WT y $\Delta ctpB$) en medio sólido 7H11-OADC suplementado con 0, 25 y 100 μ M de CuSO₄. Se sembraron 5 μ L de diluciones seriadas en base 10 de un cultivo crecido en fase exponencial de las dos cepas (diluciones 10⁰ a 10⁻⁶).



Durante el desarrollo del presente trabajo se planteó la construcción de un mutante de *M. smegmatis* mc²155 defectivo en el gen de la Cu⁺ ATPasa endógena (*msmeg_5014*), este mutante se hizo con el fin de tener una cepa de expresión de *M. smegmatis* que no expresé la Cu⁺ ATPasa, permitiendo obtener un sistema expresión más apropiado para sobreexpresar otras Cu⁺ ATPasas. Adicionalmente se construyó este mutante como control de confirmación del sistema de recombinación empleado para la mutación de genes en micobacterias. La construcción del mutante *M. smegmatis* mc²155 $\Delta msmeg_5014$ se muestra en el Anexo C, y al mutante obtenido se le evaluó su crecimiento bacteriano en presencia de diferentes concentraciones de Cu²⁺ (Anexo D), a diferencia del mutante de *M. tuberculosis* $\Delta ctpB$, el mutante de *M. smegmatis* $\Delta msmeg_5014$ presentó un fenotipo sensible a Cu²⁺ comparado con la cepa silvestre. Lo anterior sugiere que la Cu⁺ ATPasa de *M. smegmatis* tiene como función la desintoxicación del metal.

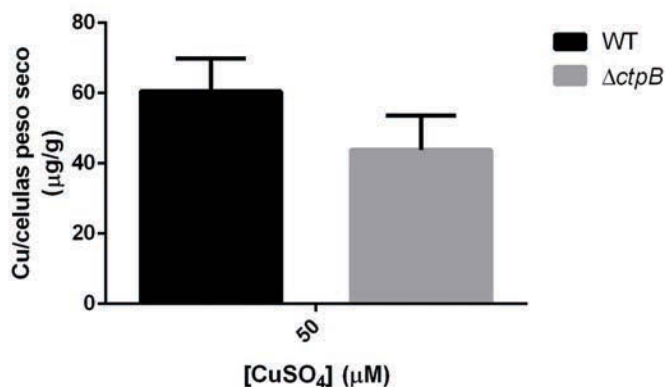
6.3.3.11 Acumulación de Cu⁺ en células de *M. tuberculosis* defectivas en *ctpB*

Dentro de la caracterización fenotípica del mutante de *M. tuberculosis* H37Ra $\Delta ctpB$ se propuso un análisis de acumulación del metal en células completas. Este ensayo consistió

en intoxicar las células con CuSO_4 50 μM y determinar el contenido de Cu intracelular, en el ensayo se comparan la cepa mutante y la cepa silvestre. En la Figura 6-52 se muestra los resultados obtenidos de este ensayo, encontrando que no hay diferencias significativas en el contenido de Cu^+ intracelular entre las dos cepas.

Estos ensayos también se realizaron con otros mutantes defectivos en Cu^+ ATPasas, se espera que las enzimas que se encargan de la desintoxicación del metal presenten un aumento en la concentración intracelular de Cu^+ al mutar el gen, ya que la ausencia del transportador disminuye el eflujo Cu^+ al exterior celular [151, 166]. Por otro lado, las Cu^+ ATPasas encargadas de la metalación de proteínas extracitoplasmáticas no presentan este fenotipo, y resultan en el mismo patrón de acumulación entre la cepa mutante y la silvestre [151, 166]. Por lo tanto, que el mutante *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpB no acumule Cu^+ intracelular corrobora los resultados previamente encontrados que sugieren que CtpB es una Cu^+ ATPasa cuya función es metalar proteína extracitoplasmáticas.

Figura 6-52: Ensayo de acumulación de Cu en células completas del mutante defectivo de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpB . El contenido de Cu intracelular determinado por AAS-GF de células completas que fueron tratadas con 50 μM de CuSO_4 , se muestra como μg de Cu por g de pellet seco. En negro se muestran los valores para la cepa silvestre de *M. tuberculosis* H37Ra (WT) y en gris el mutante de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpB (ΔctpB). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM derivado de medidas por triplicado biológico.



Los resultados de los ensayos fenotípicos (viabilidad y acumulación de Cu) hechos a mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpB , no descartan una respuesta compensatoria por parte de las otras dos Cu^+ ATPasas, CtpA y CtpV; el efecto compensatorio indica que las dos ATPasas se encarguen de la desintoxicación del metal supliendo la actividad de CtpB y por tanto no se observe este fenotipo sensible al catión en el mutante. Para evaluar este

posible efecto compensatorio es necesario la construcción de mutantes dobles o triples en las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*. Sin embargo, en estudios hechos con un mutante de *M. tuberculosis* Δ *ctpV* se encontró que la bacteria presenta un fenotipo sensible a Cu [11], por lo que en este caso no se presentó un efecto compensatorio por parte de CtpA y CtpB, para suplir esta función, esto indica que estas dos Cu⁺ ATPasas presentan una función diferente a la desintoxicación de Cu.

6.3.4 Caracterización funcional de CtpV

6.3.4.1 Obtención de un recombinante de sobreexpresión de CtpV

De manera similar como lo realizado para CtpA y CtpB, el gen *ctpV* de *M. tuberculosis* (Rv0969), inicialmente se intentó clonar en el vector pBAD Myc His A, pero no se obtuvo el plásmido recombinante. Por tanto, se decidió clonar el gen *ctpV* usando el sistema pBAD topo TA (Thermo Scientific) que permite la sobreexpresión de la proteína recombinante en *E. coli*. El sistema Topo permite la inserción directa de un producto de PCR para expresión, aprovechando la colas de A en el extremo 3' del producto de PCR y la cola de T del extremo 5' del vector, mediado por la actividad de la Topoisomerasa que une los dos fragmentos [211]. En la Figura 6-53a se muestra el procedimiento utilizado para generar el plásmido recombinante de sobreexpresión llamado pALT26. Al igual que en las clonaciones hechas anteriormente, al gen se le añadió un sitio TEV (Figura 6 -53b) asegurando la direccionalidad correcta de ligación, para de esta manera expresar la proteína recombinante correcta (Figura 6-53).

6.3.4.2 Sobreexpresión en *E. coli* y purificación de CtpV recombinante

Una vez construido el plásmido recombinante pALT26 se procedió a expresar la proteína CtpV en células de *E. coli* DC194 (cepa de *E. coli* LMG194 defectiva en CopA), por lo que fue necesario transformar pALT26 en esa cepa de expresión. La proteína recombinante obtenida contiene una etiqueta de His en el extremo C-terminal que permite su purificación y detección mediante técnicas de Dot-Blot y Western-Blot usando un anticuerpo anti-Histidinas. La evaluación de la expresión de CtpV se analizó mediante Dot-Blot a partir de cuatro colonias recombinantes (Figura 6-54b). Las condiciones para la expresión de la proteína recombinante fueron: medio LB suplementado con 0,05% de agente inductor (L-arabinosa), 37 °C, 180 rpm de agitación durante 3 horas. Como se observa, la expresión

de CtpV se evidencia en todas las colonias analizadas, con mayor intensidad de expresión en la colonia 3, por lo que se decidió continuar el proceso con esta colonia (Figura 6-54b).

Figura 6-53: Obtención del recombinante de sobreexpresión de CtpV en *E. coli*. **a.** Esquema de clonación del gen *ctpV* en el plásmido pBAD topo TA. **b.** Amplificación por PCR del gen *ctpV* usando como molde ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv y los iniciadores pBAD topo *ctpV* For/pBAD-*ctpV*-rev (fragmento de 2337 pb). **c.** PCR de colonia para confirmación de la direccionalidad del inserto (iniciadores: 5 *ctpV* seq/pBAD For) y la construcción del plásmido pALT26 (amplímero de 1870 pb).

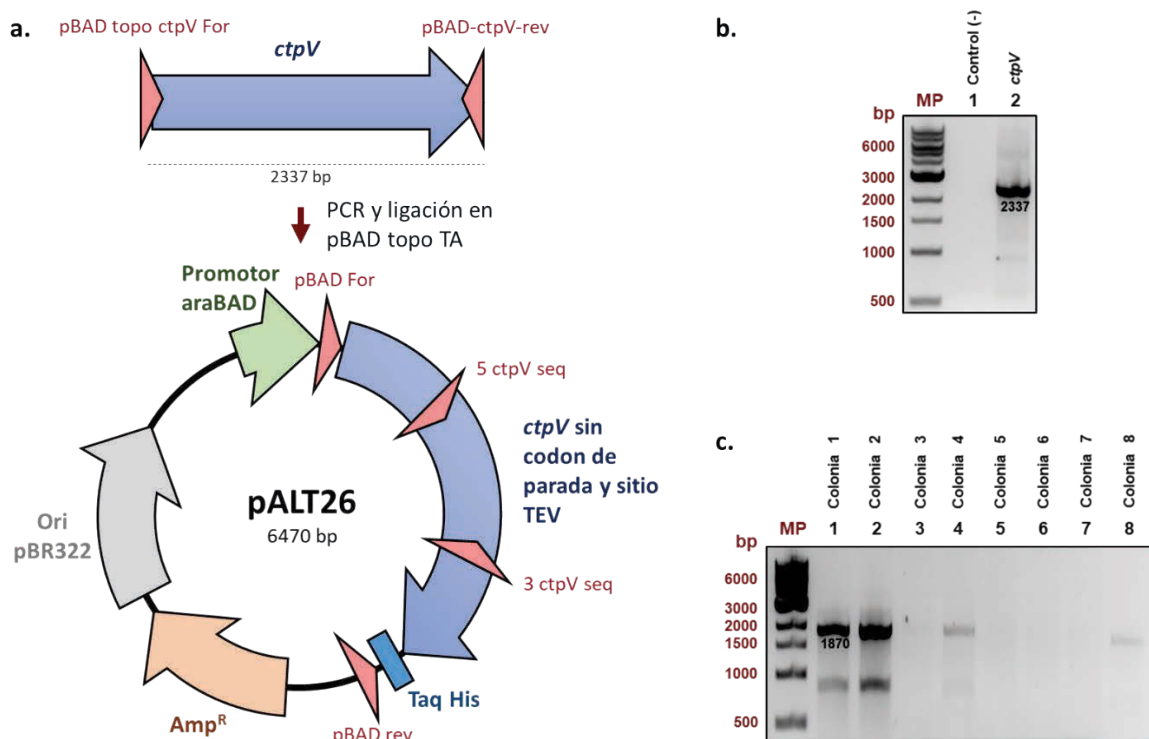
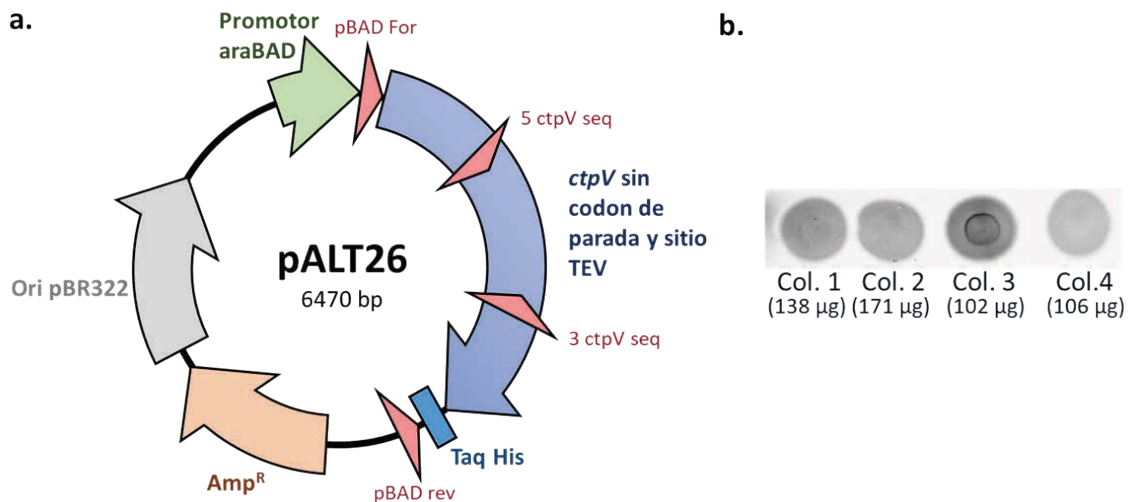
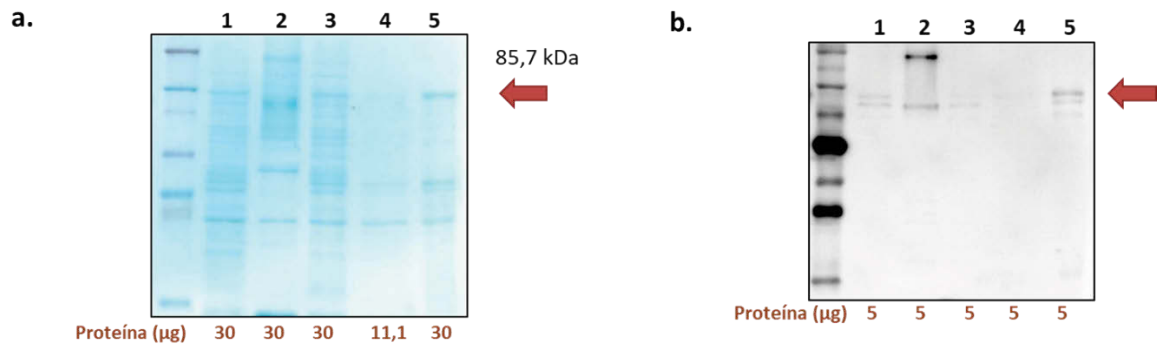


Figura 6-54: Sobreexpresión de CtpV en *E. coli*. **a.** Esquema del plásmido pALT26 para la sobreexpresión de CtpV. **b.** Análisis de expresión de CtpV en *E. coli* DC194 a partir de 4 colonias diferentes. La verificación se hizo mediante ensayos de Dot-Blot usando anticuerpo 1^o dirigido contra el His-tag (*6x-His Epitope Tag Antibody Rabbit*, Thermo Scientific) y secundario conjugado con peroxidasa de rábano (*Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate*, Thermo Scientific).



La metodología empleada para la purificación de CtpV fue la misma que se usó en las purificaciones anteriores, donde básicamente se utiliza el medio *AI* en el sistema de expresión controlado (20 °C. 180 rpm y 18 h), y el cultivo inducido fue crecido hasta un OD_{600nm} de 4,0. Posteriormente las bacterias fueron lisadas, se aisló la membrana plasmática de la que se extrajeron las proteínas de membrana de la bicapa lipídica con detergente DDM al 1%, y se procedió a hacer la cromatografía de afinidad para purificar CtpV recombinante. La proteína de interés se visualizó eluyendo con imidazol 150 mM (Figura 6-55). La purificación de CtpV mediante cromatografía de afinidad fue satisfactoria; se obtuvo un rendimiento de 2,2 mg/L de cultivo bacteriano. Al analizar el producto de purificación de CtpV mediante SDS-PAGE, se observó una banda de 85,7 kDa, además de otras bandas contaminantes, lo que sugiere degradación y/o co-elución de otras proteínas (Figura 6-55). Aun así, el grado de purificación de la proteína se consideró adecuado para hacer los ensayos posteriores de actividad enzimática.

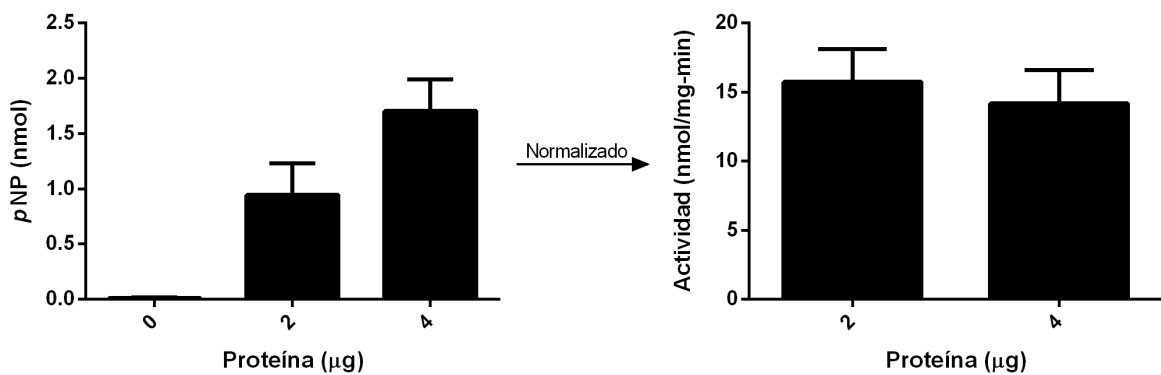
Figura 6-55: Purificación por cromatografía de afinidad de la proteína recombinante CtpV. **a.** SDS-PAGE de la purificación de CtpV. Carril 1. Sobrenadante de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 2. Pellet de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 3. Proteínas no retenidas. 4. Lavado con imidazol 20 mM. 5. Extracto de CtpV purificado (Elución con imidazol 150 mM). **b.** Western-Blot de la purificación de CtpV. Carril 1. Sobrenadante de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 2. Pellet de solubilización de membrana con DDM al 0,75%. 3. Proteínas no retenidas. 4. Lavado con imidazol 20 mM. 5. Extracto de CtpV purificado (Elución con imidazol 150 mM).



6.3.4.3 El extracto de CtpV purificado presentó actividad p NPPasa y Cu^+ ATPasa

Los ensayos de actividad p NPPasa del extracto purificado de CtpV mostraron que la enzima es activa luego del proceso de purificación. En la Figura 6-56 se muestran los resultados de actividad p NPPasa variando la cantidad de proteína. Se observó cómo lo esperado, que a mayor cantidad de enzima se produzca más p NP, y al normalizar los a valores de actividad enzimática específica, a partir de 4 µg de proteína, la actividad se hace constante $14,19 \pm 2,41$ nmol p NPP/mg-min, con un valor de actividad similar al observado a partir de los extractos purificados de CtpA y CtpB.

Figura 6-56: Actividad p -nitrofenil fosfatasa (p NPPasa) del extracto purificado de CtpV. Variación de la cantidad de proteína añadida a cada reacción enzimática. En el gráfico sin normalizar (izquierda) hay mayor cantidad de producto a mayor cantidad de enzima. Cuando la actividad se normaliza por la cantidad de proteína (derecha) se observa un comportamiento constante de la actividad enzimática.



Por otra parte, el extracto de CtpV purificado mostró actividad ATPasa estimulada por Cu⁺ de $14,1 \pm 0,3$ nmol/mg-min al utilizar 10 μ M del catión en el medio de reacción, esta concentración se seleccionó con el fin de comparar la actividad de CtpV a las mismas condiciones donde se observó actividad para CtpA y CtpB a partir de proteínas purificadas ($3,8 \pm 1,4$ y $11,8 \pm 3,0$ nmol/mg-min, respectivamente). El extracto de CtpV mostró una mayor actividad ATPasa comparado con CtpA y CtpB, lo que sugiere que esta enzima tiene una mayor capacidad de transporte comparada con sus homólogos de *M. tuberculosis*. La actividad obtenida para CtpV es comparable con el valor de V_{max} reportado para la Cu⁺ ATPasa CopA de *E. coli*, que es de $27,3 \pm 4,5$ nmol/mg-min [102]. Tal como sucedió con CtpA y CtpB, los extractos enzimáticos de CtpV perdieron rápidamente actividad enzimática con el tiempo, lo que impedía seguir utilizándolos para caracterizaciones posteriores de la enzima.

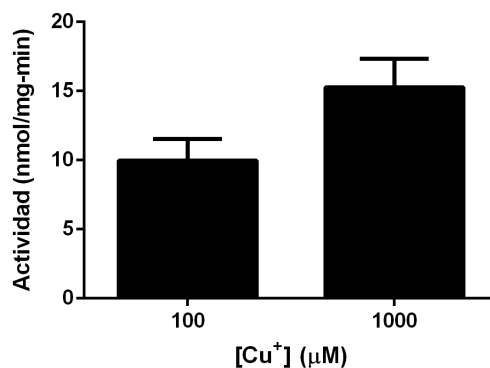
La estrategia alterna para determinar la actividad ATPasa de CtpV fue similar a la empleada para la determinación de los parámetros cinéticos de CtpA y CtpB, pero en este caso se hicieron los ensayos en preparaciones de membrana cruda de *E. coli* DC194 y no *M. smegmatis* mc²155 como en los casos anteriores, al no contar con un recombinante de expresión de CtpV en micobacterias. La actividad ATPasa asociada a CtpV se estimó como la diferencia de actividad entre vesículas de membranas sobreexpresando la proteína y vesículas aisladas de bacterias transformadas con el vector pBAD vacío, resultados que se muestran más adelante en el texto.

6.3.4.4 CtpV transporta Cu⁺ en vesículas evertidas de *E. coli* Δ copA

Las vesículas evertidas de *E. coli* DC194 (mutante de *E. coli* Δ copA) enriquecidas CtpV se usaron para los ensayos de transporte de Cu⁺, siguiendo la misma metodología empleada para CtpA y CtpB. Los resultados mostrados en la Figura 6-57 revelan que el catión fue transportado al interior de las vesículas; al hacer una comparación de la disposición espacial de la vesícula evertida y la disposición real de la enzima en la membrana de la célula, es posible afirmar que el transporte del metal en la célula se hace desde el citosol hacia el espacio extracelular.

Figura 6-57: Transporte de Cu⁺ mediado por CtpV en vesículas de membrana evertidas. Actividad enzimática relacionada con la tasa de transporte de Cu⁺ que se representada en valores de nmol de Cu⁺ dentro de las vesículas por mg de proteína por minuto. Estos valores se obtuvieron al realizar la reacción enzimática utilizando dos

concentraciones iniciales diferentes de Cu^+ (100 y 1000 μM) en el medio de reacción (Fuera de la vesícula de membrana evertida enriquecida por CtpV). Los datos se grafican como promedio \pm SEM derivados de tres réplicas técnicas.



Los valores de actividad enzimática que representan la tasa de transporte de Cu^+ mediada por CtpV (Figura 6-57) fueron de $9,98 \pm 1,56$ y $15,28 \pm 2,05$ nmol Cu^+ /mg proteína-min al suplementar la reacción con 100 y 1000 μM de Cu^+ , respectivamente. Estas concentraciones altas de catión permiten estimar la actividad enzimática cercal al V_{max} . Al comparar las 3 Cu^+ ATPasas de *M. tuberculosis*, se observa que CtpV muestra una mayor tasa de transporte, sugiriendo que esta enzima se encarga de transportar el catión con mayor eficiencia, y de acuerdo a lo reportado anteriormente, CtpV se podría asociar con la desintoxicación de Cu en *M. tuberculosis* [11]. El valor de V_{max} de transporte de Cu^+ de CopA2 de *P. aeruginosa* ($6,7 \pm 0,4$ nmol Cu^+ /mg proteína-min), ATPasa encargada de metalar cuproproteínas periplasmáticas [151], se puede compararse con el valor obtenido para CtpV usando 1000 μM de Cu^+ , concentración que indicaría saturación de la enzima y el valor de actividad es cercano al V_{max} , lo que contradice la posible función que estaría cumpliendo CtpV en *M. tuberculosis*. Sin embargo, evaluando las cinéticas de transporte de CopA1 y CopA2 de *P. aeruginosa* se tiene que la ATPasa relacionada con la desintoxicación de Cu^+ tienen un $K_{1/2}$ mayor (CopA1, $K_{1/2} = 152,6 \pm 7,9$ μM de Cu^+), comparable con el obtenido para CtpV en este trabajo. Al suplementar el medio de reacción con 100 mM de Cu^+ se tiene una tasa de transporte menor en comparación con 1000 μM de Cu^+ , indicando que en esta primera concentración la enzima no ha llegado a su V_{max} . Esta tendencia no se observa en los resultados obtenidos de CtpA y CtpB, sugiriendo que de las tres Cu^+ ATPasas de *M. tuberculosis*, CtpV es la más posiblemente encargada de la desintoxicación de Cu^+ .

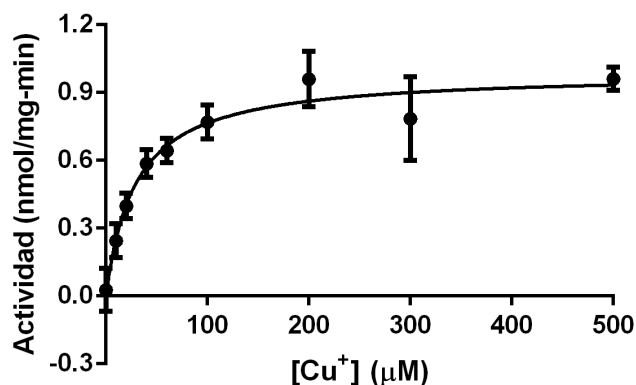
Otra consideración a tener en cuenta es que *M. tuberculosis* es más susceptible al Cu²⁺ que *P. aeruginosa*, lo que se puede ver reflejado en la CMI de 25 µM para la micobacteria (determinado en el presente trabajo), mientras que la reportada para *P. aeruginosa* es de 4 mM [151]. Al ser más susceptible *M. tuberculosis* al Cu, sus Cu⁺ ATPasas pueden tener una menor tasa de transporte, suponiendo también que estas enzimas son el principal sistema de eflujo del metal fuera del citosol bacteriano, que puede verse evidenciado con fenotipo de mayor susceptibilidad a Cu²⁺ que presentan algunos mutantes de Cu⁺ ATPasas en algunas bacterias [151, 208].

6.3.4.5 La actividad ATPasa de CtpV sigue una cinética de Michaelis-Menten frente a Cu⁺

En la determinación de los parámetros cinéticos de CtpV embebida en la membrana, se midió la actividad Cu⁺ ATPasa de membranas de *E. coli* DC194 enriquecidas con este transportador. Al ser un extracto crudo de membrana es necesario descontar la contribución de otras enzimas ATPasas presentes en la membrana, para ello se realizaron reacciones enzimáticas paralelas usando membranas aisladas de bacterias transformadas con el vector pBAD vacío y su valor de actividad se descontó de los valores de actividad enzimática reportados.

La proteína CtpV embebida en la membrana de *E. coli* catalizó la hidrólisis de ATP dependiente de concentraciones variables de Cu⁺. Cuando Mg²⁺, ATP y Cu⁺ fueron añadidos al medio de reacción, la actividad Cu⁺ ATPasa alcanzó una V_{max} en concentraciones de Cu⁺ por encima de 200 µM. La hidrólisis de ATP se estimó en presencia de concentraciones variables de Cu⁺ entre 0 y 500 µM, exhibiendo un $K_{1/2}$ de 29,11 ± 8,02 µM, y una V_{max} de 0,988 ± 0,068 nmol/mg-min (Figura 6-58). Los resultados confirman que CtpV fue transcrita y traducida, y el producto se ensambló en la membrana de *E. coli* como una bomba de Cu⁺ funcional.

Figura 6-58: La actividad Cu⁺ ATPasa de CtpV se ajusta a una cinética de Michaelis-Menten. Se cuantificó el fosfato liberado de la hidrólisis de ATP en presencia de concentraciones variables de Cu⁺ entre 0 y 500 mM, obteniendo valores de $K_{1/2}$ de 29,11 ± 8,02 µM y V_{max} 0,988 ± 0,068 nmol/mg-min. Los valores de $K_{1/2}$ y V_{max} se calcularon utilizando el programa Prism 6 versión 6.0h para Windows 10, GraphPad Software, La Jolla California USA, www.graphpad.com. Los datos se grafican como promedio ± SEM derivados de tres réplicas técnicas.



La V_{max} obtenida para CtpV es baja en comparación con CtpA y CtpB, lo que podría deberse principalmente al sistema de expresión utilizado en cada uno de los ensayos. Para CtpV se usaron membranas extraídas de *E. coli* y no *M. smegmatis*. Este mismo comportamiento de subestimación de la actividad ATPasa se había observado previamente en nuestro grupo de investigación al desarrollar otro trabajo de posgrado [212], donde se expresó Pma1 (posible transportador de Na^+/K^+ ó Ca^{2+}) de *M. smegmatis* en ambos sistemas. Los ensayos de actividad Ca^{2+} ATPasa fueron de $2,142 \pm 0,353$ y $8,132 \pm 0,353$ nmol Pi/mg-min al sobreexpresar en membranas de *E. coli* y *M. smegmatis*, respectivamente [212]. La diferencia en la actividad se podría explicar parcialmente por la composición lipídica de la membrana plasmática de las dos bacterias, que en el caso de la micobacteria es más cercana al ambiente lipídico que se encuentra CtpV en *M. tuberculosis*. Lo anterior demuestra que el V_{max} puede variar con el sistema de expresión, por lo que el valor obtenido puede estar subestimado y al compararlo con otras Cu^+ ATPasas este es muy bajo. Además, al tratarse de un extracto de membrana no se tiene la proteína aislada y pura, por lo que el valor de actividad enzimática específica debe ser mayor al tener un extracto purificado.

Al comparar la $K_{1/2}$ de CtpV con valores previamente reportados para otras Cu^+ ATPasas bacterianas, CtpV muestra valores cercanos y mayores a CopA de *E. coli* y *A. fulgidus* ($5,4 \pm 0,6$ μM y $2,1 \pm 0,6$ μM , respectivamente) [91, 202]. Esta diferencia podría ser parcialmente explicada al analizar los resultados del estudio realizado por de Drees y colaboradores [91], donde los MBD del N terminal de CopA de *E. coli* fueron mutados obteniendo valores de $K_{1/2}$ mayores ($5,4 \pm 0,6$ μM para CopA, $8,7 \pm 0,6$ μM para $\Delta\text{N}_1\text{CopA}$ y $31,9 \pm 5,0$ μM para $\Delta\text{N}_{1/2}\text{CopA}$ [91]). Teniendo en cuenta que CtpV no presenta estos

dominios el valor de $K_{1/2}$ es más cercano al obtenido a CopA carente de los dos MBD ($\Delta N_{1/2} \text{CopA}$).

Por otro lado, el parámetro de $K_{1/2}$ de la actividad Cu⁺ ATPasa de CtpV es mayor comparado con el obtenido para CtpA y CtpB, lo que se puede interpretar como una menor afinidad por el Cu⁺. Al relacionar este resultado con los parámetros cinéticos del transporte de Cu⁺ de las dos Cu⁺ ATPasas de *P. aeruginosa*, que presentan dos funciones biológicas diferentes, se encuentra que en el caso de CopA1 existe un $K_{1/2}$ mayor que CopA2 [151], indicando que la bomba encargada de la desintoxicación del catión presenta un valor de $K_{1/2}$ mayor que el de la enzima que metala proteínas. Esta comparación entre cinéticas, midiendo actividad ATPasa y transporte de Cu⁺, es posible toda vez que la actividad ATPasa es una medida indirecta del transporte del catión, ya que durante cada ciclo catalítico se libera una molécula de fosfato por el catión transportado. Lo anterior permite corroborar que en el caso de las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*, CtpV es la encargada de la desintoxicación de Cu⁺.

Tabla 6-13: Parámetros cinéticos de las Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*. Se resumen los tipos de cinéticas y parámetros cinéticos que fueron determinados para las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*.

Enzima	Tipo de cinética	Parámetros cinéticos		
		$K_{1/2}$ (μM)	V_{max} (nmol Pi/mg-min)	h
CtpA	Enzima Alostérica (modelo de Hill)	$4,68 \times 10^{-2}$	10,3	1,91
CtpB	Michaelis Menten	0,19	2,29	---
CtpV	Michaelis Menten	29,11	0,988	---

En la Tabla 6-13 se resumen los parámetros cinéticos determinado por la actividad ATPasa de las tres Cu⁺ ATPasas de *M. tuberculosis*. Teniendo presente el valor del parámetro cinético $K_{1/2}$ es posible sugerir que CtpV es una enzima encargada de la desintoxicación de Cu⁺, y CtpA y CtpB son las enzimas encargadas de metalación con Cu⁺ de proteínas periplasmáticas o de membrana en la su cara externa. Para conocer los posibles blanco de metalación de estas enzimas hay que hacer aproximaciones bioinformáticas de las cuproproteínas de *M. tuberculosis* localizadas fuera del citosol bacteriano, y observar si ellas están relacionadas con estas bombas.

6.4 Discusión general de los resultados

Los múltiples ambientes que *M. tuberculosis* puede ocupar dentro del hospedero durante la infección explican la abundancia de mecanismos de defensas que la bacteria ha desarrollado durante su evolución, entre ellas el gran número de ATPasas tipo P. Para sobrevivir a dichos ambientes cambiantes, la micobacteria debe censar, responder y adaptarse rápidamente a nuevos ambientes de tal forma que pueda soportar condiciones como pH ácido, hipoxia, inanición, ROS y RNS, concentraciones tóxicas de cationes metálicos, entre otras [8, 213]. Por ello, la virulencia de las micobacterias es un fenómeno basado en la expresión controlada de múltiples genes involucrados en varias etapas de la interacción hospedero-patógeno, incluyendo adhesión, invasión, replicación intracelular y diseminación a otros sitios [214]. En cierta medida, dichas respuestas son específicas y se pueden evidenciar por cambios en los niveles transcripcionales y en los perfiles de síntesis de proteínas posterior a la exposición a dichas condiciones de estrés.

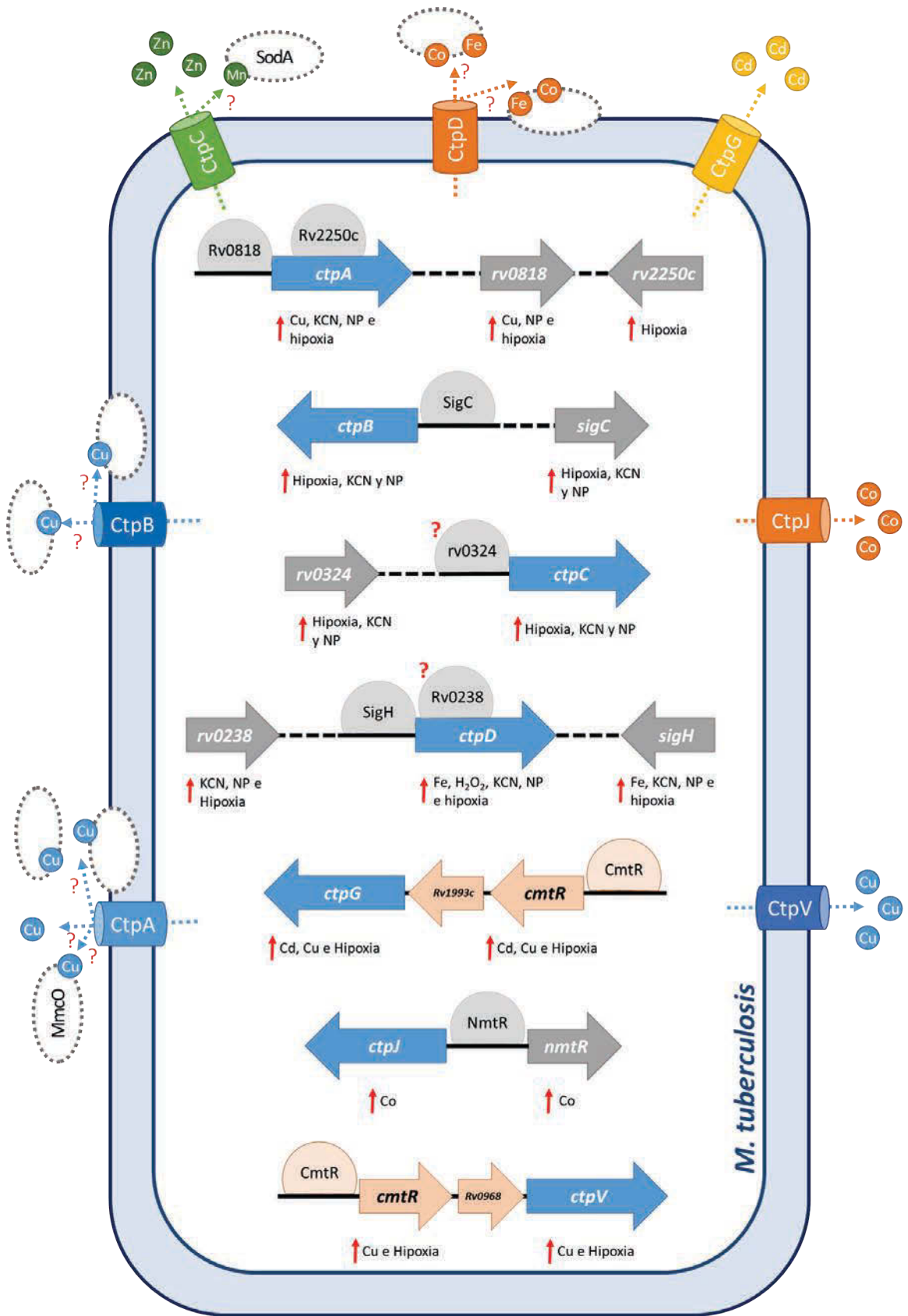
En ese sentido y como se detalló en el Numeral 6.1.3 de los resultados transcripcionales de las ATPasas tipo P_{1B} bajo condiciones de estrés, muestran que las ATPasas tipo P_{1B} activan sus perfiles transcripcionales en respuesta a condiciones de estrés relacionadas al proceso de infección. Encontrando que los genes *ctpA*, *ctpC*, *ctpG*, *ctpJ* y *ctpV* son preferencialmente activados en presencia de cationes de metales pesados, que *ctpA*, *ctpB* y *ctpD* se activan en presencias de agentes de estrés redox, y que por su parte, *ctpB* y *ctpC* se activan en un ambiente *in vitro* de hipoxia. A partir de estos resultados es posible postular que CtpA, CtpC, CtpJ, CtpG y CtpV están relacionadas con procesos de desintoxicación de cationes de metales pesados, por presentar una respuesta transcripcional frente a concentraciones altas de cationes de metales pesados, que a su vez coincide con los sustratos de estas ATPasas [11, 44, 50, 171, 174]. También los resultados obtenidos sugieren que CtpA, CtpB, y CtpD estarían asociadas con la respuesta al estrés redox, toda vez que estos transportadores presentaron una activación en su transcripción bajo la presencia de agentes de estrés oxidativo y nitrosativo, como el KCN y nitroprusiato de sodio, respectivamente. De manera importante se evidencia que CtpB y CtpC pueden ser relevantes cuando *M. tuberculosis* entra a un estado de hipoxia. En la respuesta al estrés redox e hipoxia, las ATPasas tipo P_{1B} no actúan directamente para mitigar el estrés generado, ya que ellas tienen como función el transporte de cationes a través de la membrana plasmática; cuando ellas se expresan bajo estas condiciones

posiblemente su función sea la entrega de cofactores (o cationes) para activar enzimas extracitoplasmáticas, y que sean funcionales para hacer frente a la condición de estrés expuestas.

Se postularon los posibles reguladores transcripcional de cada una de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*, de la siguiente forma: Rv0818-Rv2250c (de CtpA), SigC (de CtpB), Rv0324 (de CtpC), SigH-Rv0238 (de CtpD), CmtR (de CtpG), NmtR (de CtpJ), y CosR (de CtpV). A partir de estos reguladores se hizo el análisis transcripcional en las condiciones de estrés utilizadas para el ensayo con la ATPasa. Los resultados mostraron una respuesta concertada entre la activación de la transcripción del regulador y la ATPasa tipo P_{1B}, esto es, los genes de los reguladores transcripcionales propuestos aumentan sus niveles de transcripción en respuesta a las mismas condiciones de estrés previamente evaluadas con las ATPasas tipo P_{1B} que posiblemente están regulando.

De manera interesante, se encontró que CtpG, CtpJ y CtpV se encuentran reguladas por proteínas metaloreguladoras que sensan los cationes de Cd²⁺, Co²⁺ y Cu⁺, respectivamente. La regulación de CtpB y CtpD implica factores sigma de la ARN polimerasa alternativos (SigC y SigH, respectivamente) que modulan la transcripción de los transportadores en condiciones de estrés. Finalmente, CtpA, CtpC y CtpD pueden ser regulados por proteínas de la Familia de ArsR y TetR, y el mecanismo como estarían controlando la expresión de las ATPasas se desconoce. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo permitieron hacer un acercamiento a la relación que existe entre el regulador y la expresión de las ATPasas tipo P_{1B}.

Figura 6-59: Resumen de los resultados obtenidos del estudio de las ATPasas tipo P_{1B} y sus posibles reguladores transcripcionales. Se representa una célula de *M. tuberculosis*, como un citosol delimitado por una membrana plasmática. En su membrana se ubican las 7 ATPasas tipo P_{1B} representadas como cilindros, que exporta cationes desde el citoplasma micobacteriano. Se hace una separación de los siete transportadores en dos grupos: Aquellas ATPasas que tendrían un papel en la desintoxicación con cationes de metales pesados CtpA, CtpC, CtpG, CtpJ y CtpV; y las ATPasas que estarían involucradas en la respuesta estrés redox e hipoxia, que en este caso se encargarían de metalar a enzimas extracitoplasmáticas (representadas por óvalos punteados). En el citosol se muestran los genes de la ATPasa tipo P_{1B} y su regulador transcripcional, cuando ellos se separan por líneas punteadas indican diferente localización genómica, y los genes los reguladores que hacen parte de operones se representan en anaranjado. También se muestran las condiciones en que la transcripción de los genes es inducida (NP, nitroprusiato de sodio).



Es necesario tener en mente que, a pesar de que estas proteínas involucradas en la homeostasis iónica micobacteriana se estudiaron como actores aislados, ellos deben actuar en una misma célula en eventos concertados. Por ello y con propósitos netamente comparativos, la Figura 6-59 intenta esquematizar las funciones de las ATPasas tipo P_{1B} y sus posibles reguladores transcripcionales, que fueron caracterizadas aquí, como estrategia para elucidar posibles relaciones entre ellas.

Por otra parte, como el estudio se enfocó en determinar las características funcionales de las tres Cu⁺ ATPasas, para conocer si tienen una función compensatoria o funciones diferentes en la célula. La estrategia coordinada de experimentos de biología molecular, bioinformática, bioquímica y microbiología nos permitieron establecer características funcionales de estas ATPasas, como un primer paso en conocer la función de estas enzimas. Estas determinaciones se hicieron a partir de ensayos donde sobreexpusieron los transportadores en membrana plasmática, así como medidas de actividad ATPasa que permitieron corroborar que CtpA, CtpB y CtpV tienen como especificidad iónica Cu⁺. En general, la homeóstasis del Cu⁺ debe ser un proceso vital para el bacilo tuberculoso, ya que posee tres sistemas de transporte activo primario encargados de la extrusión del catión.

Los resultados de los parámetros cinéticos de las 3 ATPasas estudiadas tienen como temperatura óptima de actividad 37°C sugiriendo que son activas durante la infección de hospederos de sangre caliente. En lo que respecta al pH óptimo de reacción, se ha establecido que el pH del compartimento en el que reside *M. tuberculosis* dentro de los macrófagos varía entre 6,2 y 4,5 [215], por lo que uno esperaría que aquellas bombas que se activen durante la infección tengan su máximo de actividad en valores de pH ácido. No obstante, se ha determinado que la micobacteria usa varios mecanismos para mantener el pH intracelular cercano a 7, aun cuando los valores pH externo sean ácidos [215], lo que parcialmente explica el hecho de que las tres enzimas, CtpA, CtpB, y CtpV, tengan valores óptimos de pH cercanos a la neutralidad.

La presencia de múltiples transportadores de Cu⁺ en *M. tuberculosis* es un indicativo de que el organismo tiene la habilidad de prosperar en ambientes con niveles de Cu^{+/2+} cambiantes, lo que es totalmente cierto, ya que el bacilo tuberculoso se localiza extracelularmente, en granulomas, en endosomas tempranos, en fagosomas [216, 217],

donde también se experimenta cambios en la concentración del catión [10]. No obstante, se esperaría que estos transportadores no trabajen de forma simultánea, sino que participen en la respuesta a diferentes condiciones ambientales. De forma interesante, cuando se comparan los perfiles transcripcionales obtenidos en el presente trabajo, se observa que la transcripción del gen *ctpA* se incrementa en concentraciones subletales de Cu^{2+} (20 μM) y también en condiciones de estrés redox, indicando que la ATPasa se puede encargar del transporte del metal en bajas concentraciones, y también se puede asociar con la respuesta al estrés redox. Por su parte el gen *ctpB* presentó activación de su transcripción en condiciones de hipoxia, y finalmente el gen *ctpV* indujo su transcripción en concentraciones tóxicas de Cu^{2+} (500 μM), encargándose del transporte del metal cuando este se encuentra en altas concentraciones. Estos resultados sugieren que las tres Cu^+ ATPasas son activas y tienen actividades diferentes durante el proceso de infección.

Adicionalmente, si se compara el valor del parámetro cinético $K_{1/2}$ de CtpA, CtpB y CtpV determinado por los ensayos de actividad Cu^+ ATPasa, se encontró que el $K_{1/2}$ de CtpV es mayor comparado con el obtenido para CtpA y CtpB, lo que se puede interpretar como una menor afinidad por el Cu^+ . Al comparar este resultado con las Cu^+ ATPasas de *P. auroginosa* la bomba encargada de la desintoxicación del catión presenta un valor de $K_{1/2}$ mayor que el de las enzimas que metalan proteínas [151]; por lo tanto, posiblemente de las tres Cu^+ ATPasas, CtpV sea potencialmente la ATPasa encargada de la desintoxicación del metal. Este efecto también fue sugerido al determinar la actividad Cu^+ ATPasa de los extractos puros de estos transportadores, mostrando que CtpV presenta una mayor estimulación de la actividad enzimática seguido de CtpB y CtpA. Otro de los ensayos funcionales para comparar la actividad enzimática de los tres transportadores, fue el de transporte de Cu^+ en vesículas de membrana. Se encontró que al usar vesículas evertidas enriquecidas con CtpV se obtuvo una mayor tasa de transporte de Cu^+ comparado con CtpA y CtpB. El conjunto de estos resultados sugiere fuertemente que CtpV es una ATPasa encargada del eflujo eficiente de Cu^+ y por lo tanto una función de desintoxicación del metal. Esta función se había reportado anteriormente al hacer ensayos de viabilidad en presencia de Cu^{2+} con un mutante de *M. tuberculosis* defectivo en *ctpV*, este mutante presentó un fenotipo sensible a metal [11].

En el caso específico de CtpB se obtuvo un mutante de *M. tuberculosis* H37Ra defectivo en el gen, este mutante fue utilizado para evaluar su viabilidad en presencia de

concentraciones variables de Cu²⁺, los resultados mostraron que la mutación no afecta la tolerancia a Cu²⁺ por parte de la micobacteria. Adicionalmente, un análisis complementario de acumulación del metal en el citosol bacteriano, mostró que la cepa mutante acumula Cu⁺ en la misma medida que la cepa silvestre. El conjunto de estos resultados permite postular que la desintoxicación de Cu⁺ es producto del transporte de las Cu⁺ ATPasas CtpA y CtpV de *M. tuberculosis*, por lo que es posible asociar a CtpB con ATPasas que tienen como función metalar proteínas extracitoplasmáticas que responden a diferentes condiciones de estrés. Esta evidencia corrobora los resultados obtenidos de los parámetros enzimáticos de CtpB y la activación transcripcional del gen *ctpB* en un ambiente de bajas tensiones de oxígeno.

En general los resultados nos permiten sugerir que las ATPasas tipo P_{1B} podrían ser dianas prometedoras para el desarrollo de fármacos, ya que son parte de las herramientas que las micobacterias patógenas utilizan para convertir el ambiente hostil del fagosoma en un nicho habitable. En concordancia, se ha demostrado que la delección de las ATPasas tipo P conlleva a atenuación de la virulencia de *M. tuberculosis* [11, 23, 25, 44, 50]. Esto resulta de gran interés, ya que en la actualidad, se está optando por identificar dianas cuya inhibición afecte la virulencia más que la viabilidad de la bacteria, ya que es capaz de atenuar la bacteria deteniendo su crecimiento y generando menos presión selectiva, que adicionalmente no afecta dramáticamente la microbiota del hospedero. Algunos ejemplos son los inhibidores de la adhesión (Aaptaminas, Piridazinona y Pilicidas) y los inhibidores del *Quorum Sensing* (derivados de furanona), que afectan la virulencia de *E. coli*, *P. aeruginosa* y/o *S. aureus* [218]. Además, fármacos que bloqueen sistemas centrales, como el transporte iónico mediado por ATPasas tipo P_{1B}, podría tener amplio espectro de actividad, toda vez que son sistemas conservados por todos los patógenos. El problema está en encontrar la manera de inhibir la bomba del patógeno sin afectar la de su hospedero. En nuestro grupo de investigación actualmente 2013 se está trabajando en el desarrollo de inhibidores específicos para algunas ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*.

Por otro lado, la atenuación ocurrida al remover algunas de las ATPasas tipo P_{1B} del genoma de *M. tuberculosis* supone una visión favorable para el desarrollo de vacunas atenuadas. Los recientes proyectos en desarrollo de vacunas anti-TB se han enfocado en desarrollar una vacuna capaz de bloquear la infección inicial, en contraste con BCG, que protege principalmente contra la replicación activa del bacilo. Por ello, tener una vacuna

derivada directamente de *M. tuberculosis*, que causa TB en humanos, presenta una mayor ventaja. Ya que el uso de vacunas anti-TB vivas, atenuadas y derivadas de *M. tuberculosis* pueden despertar una mayor respuesta inmune, debido a que el perfil antigénico de la vacuna sería más cercano al de las cepas virulentas de *M. tuberculosis* [219].

Para evaluar si es posible tener cepas atenuadas que incluyan mutaciones en los genes que codifican para las ATPasas tipo P_{1B}, específicamente CtpA y CtpB, el paso a seguir será la generación de las respectivas cepas mutantes en *M. tuberculosis* H37Rv y la evaluación de su virulencia en modelos de infección. En el presente trabajo se desarrollaron los útiles génicos para la construcción de estos mutantes, y aunque no se haya especificado en el texto, se han hecho intentos de transformación de estos AES en la cepa de recombinería de *M. tuberculosis* H37Rv y todavía no se han obtenido colonias con el genotipo mutante. Actualmente nuestro grupo de investigación está trabajando en la construcción y evaluación de estos mutantes.

En conclusión, este trabajo es parte inicial del propósito de nuestro grupo de investigación a largo plazo de elucidar el potencial de las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* como posibles dianas terapéuticas o en el desarrollo de vacunas atenuadas.

7. Conclusiones y Perspectivas

7.1 Conclusiones

La evaluación de la respuesta transcripcional de los genes de las ATPasas tipo P_{1B} bajo condiciones que simulan el fagosoma en el que reside *M. tuberculosis*, mostró que todas se los transportadores se activan en condiciones de estrés específicas. De forma interesante los genes *ctpA*, *ctpC*, *ctpG*, *ctpJ* y *ctpV* tuvieron una respuesta en presencia de metales pesados, sugiriendo que dichas enzimas cumplen funciones en el proceso de desintoxicación de metales. Por otra parte, se encontró que los genes *ctpA*, *ctpB* y *ctpD* tienen una respuesta a condiciones de estrés redox, porque su transcripción tuvo una inducción en presencia de los agentes de estrés oxidativo y nitrosativo. Finalmente, los genes *ctpB* y *ctpC* fueron activos bajo condiciones de hipoxia. El conjunto de estos resultados sugiere que dichas enzimas cumplen funciones fundamentales durante el proceso infeccioso de *M. tuberculosis* y que su inhibición podría afectar la viabilidad o virulencia del patógeno durante la infección.

Se encontraron los posibles reguladores transcripcional de cada una de las ATPasas tipo P_{1B} de *M. tuberculosis*; de los que se evaluó la respuesta transcripcional en condiciones de estrés. Se encontró que existe una activación concertada por parte del regulador y el transportador que controla, sugiriendo que los reguladores están respondiendo transcripcionalmente donde la ATPasa presenta actividad, por lo que la inducción del regulador tiene una repercusión en la expresión de la ATPasa. Interesantemente, se encontró que CtpG, CtpJ y CtpV se encuentran reguladas por proteínas metaloreguladoras que sensan los cationes de Cd²⁺, Co²⁺ y Cu⁺, respectivamente. La regulación de CtpB y CtpD implica factores sigma de la ARN polimerasa alternativos (SigC y SigH, respectivamente) que modulan la transcripción de los transportadores en condiciones de estrés. Finalmente, CtpA, CtpC y CtpD pueden ser regulados por proteínas de la Familia de ArsR y TetR, y el mecanismo como estarían controlando la expresión de la ATPasa se

desconoce. Sin embargo, los resultados del presente trabajo permitieron hacer un acercamiento a la relación que existe entre el regulador y la expresión de las ATPasas tipo P_{1B}.

Por su parte, se postuló que CtpA es una Cu⁺ ATPasa debido a varios factores: para empezar, células sobreexpresando CtpA fueron más tolerantes a dosis sub-letales de Cu²⁺ comparado con células control. En concordancia, la actividad ATPasa de membrana plasmática enriquecidas con CtpA aumentó en función de la concentración de Cu⁺ siguiendo una cinética de que se ajusta a un modelo de Hill, con actividad enzimática máxima a pH 7,4 y 37°C, actividad específica de 10,3 nmol P/mg-min, afinidad por Cu⁺ ($K_{1/2}$ 4,68 x 10⁻² μM de Cu⁺). Adicionalmente los ensayos de actividad Cu⁺ ATPasa en el extracto de proteína pura de CtpA recombinante presentó una actividad específica de 3,8 nmol P/mg-min (en presencia de Cu⁺ 10 μM). Los ensayos de transporte de Cu⁺ en vesículas evertidas de membrana enriquecidas con CtpA presentaron una tasa de transporte de 9,99 nmol Cu/mg-min. Estos resultados en conjunto sugieren que CtpA presenta características enzimáticas de transportadores que tienen como función la metalación de proteínas extracitoplasmáticas.

En cuanto a la caracterización funcional de CtpB también sugiere un papel en la metalación de enzimas extracitoplasmáticas, toda vez que los resultados del análisis enzimático lo sugieren. Para empezar, se confirmó que la enzima es una Cu⁺ ATPasa porque células sobreexpresando CtpB se hicieron más tolerantes a dosis subletales del catión comparada con la cepa control. A su vez, ensayos de actividad ATPasa de membrana plasmática enriquecidas con CtpB presentaron una cinética tipo Michaelis-Menten, con una V_{max} de 2,29 nmol P/mg-min y $K_{1/2}$ de 0,19 μM de Cu⁺, con una actividad enzimática optima a pH 7,4, 37 °C y 0,5 mM de Cys. La proteína pura presentó una actividad de 11,8 nmol P/mg-min (en presencia de Cu⁺ 10 mM). Por otro lado, los ensayos de transporte de Cu⁺ en vesículas evertidas de membrana enriquecidas con CtpB presentaron una tasa de transporte de 5,69 nmol Cu/mg-min. Finalmente, el mutante de *M. tuberculosis* H37Ra $\Delta ctpB$ no presentó un fenotipo sensible a Cu, tanto en ensayos de viabilidad celular como ensayo de acumulación de metales, soportando el hecho que esta ATPasa tenga como función la metalación de enzimas extracitoplasmáticas y no una función de desintoxicación de Cu.

Finalmente, para CtpV también fue corroborada su especificidad iónica siendo Cu^+ . Los ensayos de actividad Cu^+ ATPasa en membrana plasmática enriquecida con CtpV permitieron determinar que la enzima sigue una cinética de Michaelis-Menten al aumentar la concentración de Cu^+ , encontrando que las membranas enriquecidas con CtpV presentan una actividad específica de 0,988 nmol P/mg-min y una afinidad por Cu^+ ($K_{1/2}$) de 29,11 μM . Al comparar este valor de $K_{1/2}$ con el de CtpA y CtpB, se encuentra que es más alto, indicando que posiblemente CtpV se encargue de la desintoxicación del metal. Esta función fue soportada por el ensayo de actividad Cu^+ ATPasa sobre el extracto puro de CtpV, donde se evidenció la mayor estimulación de la actividad enzimática; también se encontró una mayor tasa de transporte de Cu^+ en vesículas evertidas enriquecidas con CtpV. Todos los resultados inducen a pensar que CtpV es la ATPasa encargada de la desintoxicación por el metal en *M. tuberculosis*.

En conclusión, nuestra estrategia experimental basada en análisis transcripcionales, sobreexpresión y delección de las proteínas estudiadas junto con estudios bioinformáticos nos permitió sugerir que las proteínas CtpA, CtpB y CtpV hacen parte de los elementos involucrados en la interacción hospedero-patógeno de *M. tuberculosis*, contribuyendo al establecimiento exitoso de la infección tuberculosa. Por ello, sin descartar a las otras ATPasas tipo $\text{P}_{1\text{B}}$, estas proteínas se postulan como herramientas importantes del bacilo tuberculoso que pueden ser explotados en el desarrollo de estrategias para el control de la TB, ya sea como dianas terapéuticas o para la obtención de cepas atenuadas útiles en el desarrollo de vacunas.

7.2 Perspectivas

A corto plazo obtener la cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpA haciendo uso de los útiles génicos construidos en el presente trabajo, para posteriormente evaluar el fenotipo mutante relacionado al transporte de Cu y determinar su función. Finalmente, a partir de los mutantes de *M. tuberculosis* H37Ra ΔctpA y ΔctpB hacer ensayos fenotípicos relacionados con la respuesta a estrés redox, con el fin de indagar y dar mayor claridad en la función biológica de estas enzimas.

A mediano plazo se pretende plantear un posible papel de CtpA y CtpB en la infección tuberculosa. Además, los útiles génicos construidos en el presente trabajo permiten la

construcción de la cepa mutante defectiva en el gen *ctpA* y *ctpB* en la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv, y así hacer ensayos de infección *in vivo*, con el fin de conocer el potencial de estas dianas de atenuación. Adicionalmente, la información obtenida de la relación existente entre la actividad de las ATPasas tipo P_{1B} y las condiciones de estrés que *M. tuberculosis* enfrenta durante la infección, junto con la elucidación de la regulación transcripcional que estos transportadores; estos sistemas de regulación también se podrían explotar como potenciales dianas terapéuticas, ya que al inhibir de una manera indirecta la expresión de las ATPasas tipo P_{1B} se puede afectar la respuesta de la micobacteria a la condición de estrés que el transportar está involucrado.

A largo plazo se espera que esta investigación contribuya al conocimiento de los mecanismos responsables del éxito del bacilo tuberculoso relacionado con las ATPasas tipo P_{1B} y en colaboración con otras líneas de investigación poder llegar al diseño racional de nuevos antituberculosos o mutantes atenuados con potencial vacunal.

A. Anexo A: Lista de iniciadores en el desarrollo de la tesis

Nombre	Secuencia 5´-3´	Sitio de restricción	Función
Iniciadores para la construcción de recombinantes de sobreexpresión de CtpA			
pBAD-ctpA-dir	CTCGAGGATGACGACGCCGTGACCG	<i>XhoI</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pBAD-Myc-His A
pBAD-ctpA-rev	AAGCTTGGACTGAAAATACAGGTTTTCGCCGCTGCTCGCGGACGACGGCGCGGTC	<i>HindIII</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pBAD-Myc-His A
PMV Taq CtpA	TTTTGAATTCGTGGTGGTGGTGGTGGGATTGGAAGTACAGGT TTCCGCGGACGACGGCGCGGTC	<i>EcoRI</i>	Primer reverso para adicionar Taq His a CtpA y clonar en pMV261
ctpA sm dir	TGAGGTGAGTAATTTGGTC	----	Amplificación del gen <i>ctpA</i>
ctpA sm rev	CACGCGGATTTTGACTC	----	Amplificación del gen <i>ctpA</i>
ctpA pMV dir	TTTTGGATCCGATGACGACGCCGTGACC	<i>BamHI</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pMV261
ctpA pMV rev	TTTTGAATTCTGATCGGCGCGGTCTGG	<i>EcoRI</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pMV261
ctpA pET dir	TTTTCTCGAGATGACGACGCCGTGACC	<i>XhoI</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pET302
ctpA pET rev	TTTTGGATCCGCCGACAACGCATCACG	<i>BamHI</i>	Clonación de <i>ctpA</i> en pET302
Iniciadores para la construcción de recombinantes de sobreexpresión de CtpB			
pBAD-ctpB-dir	GAATTCGTGGCGGCTCCAGTTGTGG	<i>EcoRI</i>	Clonación de <i>ctpB</i> en pBAD-Myc-His A
pBAD-ctpB-rev	AAGCTTGGACTGAAAATACAGGTTTTCGCCGCTGCTTTGAGCGCCA AAATTGCGT	<i>HindIII</i>	Clonación de <i>ctpB</i> en pBAD-Myc-His A

Aol ctpA	ACTACGGCACCATCCTGACC	----	Construcción AES de CtpA por PCR solapante
Bol ctpA	CGGCAGCTTGTTGAGGGTCG	----	Construcción AES de CtpA por PCR solapante
Col ctpA	TTTTCTAGATCTCATCGTTCTTCGTGG	<i>XbaI</i>	Construcción AES de CtpA por PCR solapante
Dol ctpA	TTTTAAGCTTCGATGACCTGGCGACGTTGG	<i>HindIII</i>	Construcción AES de CtpA por PCR solapante
Eol ctpA	GACCCTCAACAAGCTGCCGGCTGCAGGTCGTCGAGGTCC	----	Construcción AES de CtpA por PCR solapante
Up ctpA dir	TTTTCTAGGACTACGGCACCATCCTGACC	<i>AvrII</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Up ctpA rev	TTTTGGTACCCCCGGCAGCTTGTTGAGG	<i>KpnI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpA dir	TTTTCTCGAGTCTCATCGTTCTTCGTGG	<i>XhoI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpA rev	TTTTAAGCTTCGATGACCTGGCGACGTTGG	<i>HindIII</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Up ctpA-1	TTTTTCATGAACTACGGCACCATCCTGACC	<i>BspHI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpA-1	TTTTAAGCTTTCTCATCGTTCTTCGTGG	<i>HindIII</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpA-2	TTTTCTCGAGCGATGACCTGGCGACGTTGG	<i>XhoI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Comp-UPctpA	CACGACTTCGGTCTGCTCAC	----	Confirmación de genotipo mutante
CtpA sec 1	GCACAGATCGGCCTGATAGC	----	Confirmación de genotipo mutante
CtpA sec 2	CGACGAACTCAAAGAACAGC	----	Confirmación de genotipo mutante
CtpA4	TACCGACCGAGATTAGCGTC	----	Confirmación de genotipo mutante
Comp-DOWNctpA	AGCCAGGCTGGTGATCTG	----	Confirmación de genotipo mutante

Iniciadores para la construcción de AES *ctpB*

Up ctpB dir	TTTTCTAGGGCGGGTGTACTGGGTGTCG	<i>AvrII</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Up ctpB rev	TTTTCTAGATCGACGCGGCTGGCACAGG	<i>XbaI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpB dir	TTTAAGCTTATCGCCGGTGCCGCCATGG	<i>HindIII</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
Down ctpB rev	TTTTCTCGAGTCTGCCGTGGTTGTCGAGC	<i>XhoI</i>	Construcción AES de CtpA por doble clonación en pYUB854
CtpB sec 1 (CtpB comp 1)	CATTGCTGGACTTGCAGG	----	Confirmación de genotipo mutante
Comp-UPctpB	TCTGCTCGATTCCGATCACG	----	Confirmación de genotipo mutante
Comp-DOWNctpB	GCGCTACGTTCTATCGTTCC	----	Confirmación de genotipo mutante
Iniciadores para la construcción de AES <i>msmeg_5014</i>			
UP 5014 dir (UpDir)	TTTTCTAGAAACCACGAGAAAGACCTGC	<i>XbaI</i>	Construcción AES de Msmeg_5014
UP 5014 rev (UpRev)	TTTTCTAGAGCTTGTGAGTTTGC GTTCG	<i>XbaI</i>	Construcción AES de Msmeg_5014
DOWN 5014 dir (DownDir)	TTTAAGCTTAACCTGTTCTGGGCGTTCG	<i>HindIII</i>	Construcción AES de Msmeg_5014
DOWN 5014 rev (DownRev)	TTTTCTCGAGCATCAAGAAGGCGCTGACG	<i>XhoI</i>	Construcción AES de Msmeg_5014
Msmeg_5014-1	TCCTCTGGATCCTGTTCTGTG	----	Confirmación de genotipo mutante
Msmeg_5014-2	ATCTGGGGCTGTCGATGG	----	Confirmación de genotipo mutante
Iniciadores para análisis por qPCR de reguladores transcripcionales ATPasas tipo P_{1B}			
RT-Rv2250c-dir	ATACCGGTGGTTCGTATCCTG	----	qPCR <i>rv2250c</i>
RT-Rv2250c-rev	ACCGCGACAATCTGCTTTAC	----	qPCR <i>rv2250c</i>
RT-Rv0818-dir	TGCACGAAGTATGGGGGTAT	----	qPCR <i>rv0818</i>
RT-Rv0818-rev	CGACCAAGTGGTCTTGCATA	----	qPCR <i>rv0818</i>
RT-Rv2069-dir	GGACGATCTCACCAAGAGA	----	qPCR <i>rv2069</i>
RT-Rv2069-rev	GGTCGCCGTCTATGAGATGT	----	qPCR <i>rv2069</i>

RT-Rv0324-dir	AAGACGTGGCAAGGCTGTT	----	qPCR <i>rv0324</i>
RT-Rv0324-rev	CGGCTATCGGGATATTGATG	----	qPCR <i>rv0324</i>
RT-Rv3223c-dir	CCGATACTGACCAACACCT	----	qPCR <i>rv3223c</i>
RT-Rv3223c-rev	GCCTCTTTGATCTCGGTGTC	----	qPCR <i>rv3223c</i>
RT-Rv0238-dir	TTAACGGCTACCACGAGACC	----	qPCR <i>rv0238</i>
RT-Rv0238-rev	TCTGGTCGAAGTTGATGCTG	----	qPCR <i>rv0238</i>
RT-Rv1994c-dir	CCAACCATCTGTCGTGTTTG	----	qPCR <i>rv1994c</i>
RT-Rv1994c-rev	ACACAGGGTTGGTCGGTATC	----	qPCR <i>rv1994c</i>
RT-Rv3744-dir	ATGATCCTCACCCAGCTACG	----	qPCR <i>rv3744</i>
RT-Rv3744-rev	CAAGTGCTCGCTGTGGTAAA	----	qPCR <i>rv3744</i>
RT-Rv0967-dir	AAGGAATTGACCGCAAAGAA	----	qPCR <i>rv0967</i>
RT-Rv0967-rev	CACGTCTCCAAGTGGTTGTG	----	qPCR <i>rv0967</i>
RT-Rv0818-dir-2	GAGAGTCTGGGCAAGGTGAG	----	qPCR <i>rv0818</i>
RT-Rv0818-rev-2	GCCCCGAAGAAGTCATAC	----	qPCR <i>rv0818</i>
RT-Rv0238-dir-2	CTCCAAGGAAGACCTGTTCG	----	qPCR <i>rv0238</i>
RT-Rv0238-rev-2	CTGGGTGTACATCACGATCC	----	qPCR <i>rv0238</i>
Iniciadores para análisis por qPCR de reguladores transcripcionales ATPasas tipo P_{1B}			
16SrRNAd	GAGATAGGCGTTCCTTGTG	----	qPCR 16S ARN
16SrRNAr	CTGGACATAAGGGGCATGAT	----	qPCR 16S ARN
A-RT-dir	GACCACCTCGACGTTGTACC	----	qPCR <i>ctpA</i>
A-RT-rev	CAAGCTGTTTGAGACCACGA	----	qPCR <i>ctpA</i>
B-RT-dir	ACATCCATGGAAACGCTGAT	----	qPCR <i>ctpB</i>
B-RT-rev	CAAGAACGAAGACGGTCACA	----	qPCR <i>ctpB</i>
C-RT-dir	GAAAAAGTTCGGGTGTCCAA	----	qPCR <i>ctpC</i>
C-RT-rev	CTCATCAATCCCCAGTTCGT	----	qPCR <i>ctpC</i>
D-RT-dir	CCGAGCAGAAGGTTGAAGTC	----	qPCR <i>ctpD</i>
D-RT-rev	AGTTCGTCCCGTATGGTCAC	----	qPCR <i>ctpD</i>
G-RT-dir	GGTCCAGCTGACCGTTGTAT	----	qPCR <i>ctpG</i>

G-RT-rev	ATTGCGCGTGAATACCAGAT	----	qPCR <i>ctpG</i>
J-RT-dir	GATGACCTGACCACCATTCC	----	qPCR <i>ctpJ</i>
J-RT-rev	CATTGAGTCCGACGATGATG	----	qPCR <i>ctpJ</i>
V-RT-dir	GCTGGGTTTCGTCAATGTTCT	----	qPCR <i>ctpV</i>
V-RT-rev	CGGCAAACAACCTGATACGTG	----	qPCR <i>ctpV</i>
V-RT-dir-2	ATGTTCTTCGGTGCTTACCC	----	qPCR <i>ctpV</i>
V-RT-rev-2	CACCGGCAAACAACCTGATAC	----	qPCR <i>ctpV</i>
RTsigAdir	CCTACGCTACGTGGTGGATT	----	qPCR <i>sigA</i>
RTsigArev	TGGATTTCCAGCACCTTCTCC	----	qPCR <i>sigA</i>

B. Anexo B: Plásmidos contruidos en el desarrollo de la tesis

Nombre*	Inserto	Vector	Selección	Ori	Característica
pALT1	<i>ctpA</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpA</i> sin mismatch para hacer PCR anidada
pALT2	<i>ctpA</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpA</i> con sitios para clonar en pMV261
pALT3	CDol <i>ctpA</i>	pDH5-Hyg	Hyg y Amp	oriE	Sección CDol de <i>ctpA</i> para obtención del AES por PCR solapante
pALT4	<i>ctpA</i>	pMV261	Km	oriE, oriM	Recombinante de expresión de <i>ctpA</i> en micobacterias
pALT5	Down <i>ctpA</i>	pYUB854	Hyg	oriE	Primera clonación para obtención del AES con sitios RES
pALT6	Up <i>ctpA</i>	pALT5	Hyg	oriE	AES de <i>ctpA</i> con sitios RES
pALT7	<i>ctpA</i>	pET302	Amp	oriE	Recombinante de expresión de CtpA en <i>E. coli</i>
pALT8	<i>ctpA</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpA</i> con Taq de His con sitios para la subclonación de pMV261
pALT9	<i>ctpB</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpB</i> con sitio <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> para subclonación en pMV261
pALT10	<i>ctpB</i>	pMV261	Km	oriE, oriM	Recombinante de expresión de CtpB en micobacterias
pALT11	<i>ctpA</i>	pMV261	Km	oriE, oriM	Recombinante de CtpA con Taq His para purificar
pALT12	<i>ctpB</i>	pMV261	Km	oriE, oriM	Recombinante de CtpB con Taq His para purificar
pALT13	Down <i>ctpB</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	Sección Down de CtpB para subclonar en pYUB854 entre sitios <i>HindIII</i> - <i>XhoI</i>
pALT14	Up <i>ctpB</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	Sección Up de CtpB para subclonar 2da vez en pYUB854 entre sitios <i>AvrII</i> - <i>XbaI</i>
pALT15	Down <i>ctpB</i>	pYUB854	Hyg	oriE	Primera clonación para la obtención del AES de <i>ctpB</i> con sitios RES

pALT16	Up <i>ctpB</i>	pALT15	Hyg	oriE	AES de <i>ctpB</i> con sitios RES
pALT17	<i>ctpA</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpA</i> con sitio <i>XhoI</i> y <i>HindIII</i> para subclonación en pBAD-Myc-His A
pALT18	<i>ctpB</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpB</i> con sitio <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> para subclonación en pBAD-Myc-His A
pATL19	<i>ctpV</i>	pGEMT easy	Amp	oriE	<i>ctpV</i> con sitio <i>EcoRI</i> y <i>HindIII</i> para subclonación en pBAD-Myc-His A
pALT20	<i>ctpA</i>	pBAD-Myc-His A	Amp	oriE	Recombinante de <i>ctpA</i> con Taq His para purificar
pALT21	<i>ctpB</i>	pBAD-Myc-His A	Amp	oriE	Recombinante de <i>ctpB</i> con Taq His para purificar
pATL22	<i>ctpV</i>	pBAD-Myc-His A	Amp	oriE	Recombinante de <i>ctpV</i> con Taq His para purificar
pALT23	AES <i>5014</i>	pYUB854	Hyg	oriE	AES de <i>msmeg_5014</i> con sitios RES (Gen Cu ⁺ ATPasa de <i>M. smegmatis</i>)
pALT24	Up <i>ctpA</i>	pYUB854	Hyg	oriE	Primera clonación para la obtención del AES <i>ctpA</i> con sitios RES
pALT25	Down <i>ctpA</i>	pALT24	Hyg	oriE	AES de <i>ctpA</i> con sitios RES
pALT26	<i>ctpV</i>	pBAD-Topo-TA	Amp	oriE	Recombinante de <i>ctpV</i> con Taq His para purificar

* Los plásmidos en cursiva deben ser verificados o están en curso de ser construidos.

C. Anexo C: Construcción de una cepa mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014

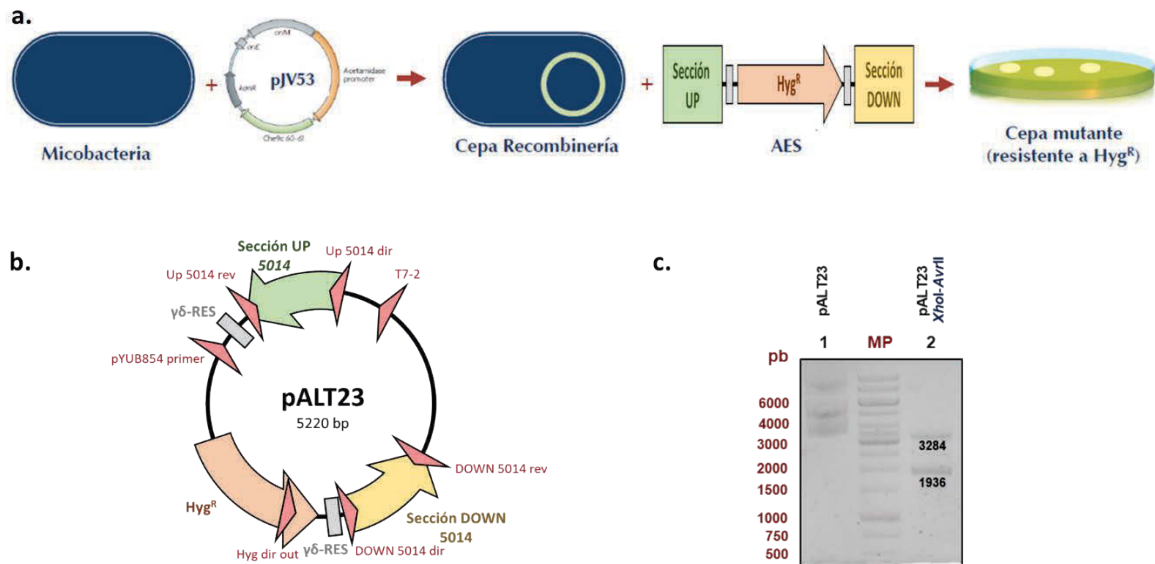
La estrategia experimental para la construcción de mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014, defectivo en el gen de la Cu⁺ ATPasa endógena, fue la misma estrategia de recombinación usada para construir los mutantes de *M. tuberculosis*. El fin es reemplazar el gen *msmeg_5014* por un casete *Hyg*^R. La estrategia experimental de se muestra en la Figura C1a. La parte inicial del procedimiento es la obtención de la cepa de recombinación que en este caso fue obtenida con la transformación del plásmido pJV53 en la cepa de *M. smegmatis* mc²155, este paso se había hecho previamente en el grupo de investigación [124].

El siguiente paso implica el uso de un sustrato de intercambio alélico (AES) que consiste en un casete de resistencia a Hyg (*Hyg*^R) flanqueado por aproximadamente 500 pb de las secuencias corriente arriba y abajo del gen a mutar. El sistema empleado para la construcción de este AES es el plásmido pYUB854, que usando técnicas de clonación convencionales se insertan las regiones corriente arriba y abajo de *msmeg_5014*. El plásmido que contiene el AES de *msmeg_5014* es pALT23 (Figura C1b). La digestión de pALT23 con las enzimas de restricción *Xho*I y *Avr*II produce el AES de tamaño de 3284 bp (Figura C1c).

La construcción detallada del plásmido pALT23 se describe en la Figura A2a. Se partió de dos constructos previamente generados en el grupo de investigación [220]. El primero es el plásmido recombinante pLGC3, que es producto de la clonación de la región corriente abajo del gen *msmeg_5014* (Sección DOWN 5014) en el plásmido pYUB854. El segundo es el plásmido pLGC1, que se obtuvo de la clonación de la región corriente arriba del gen

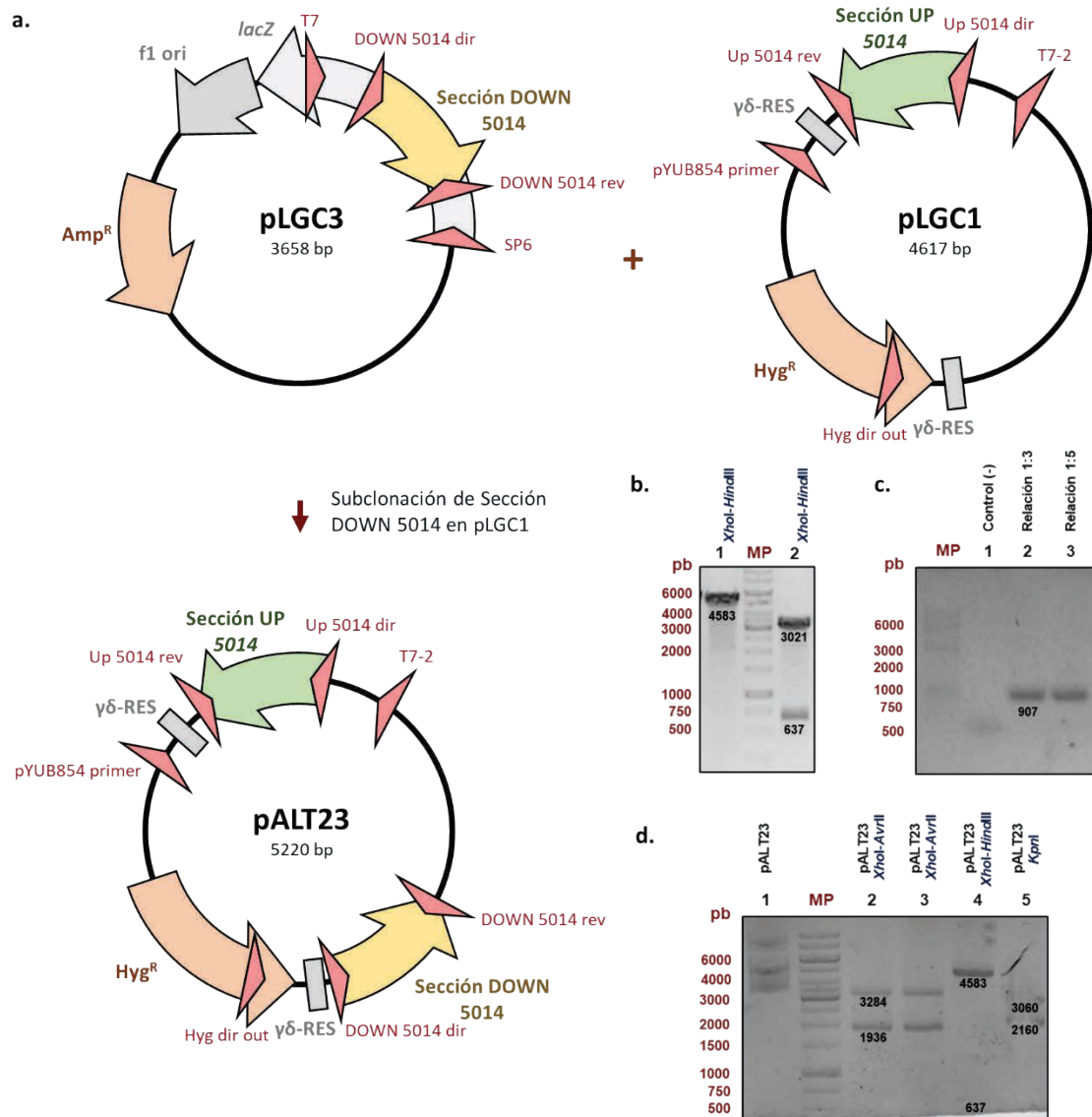
msmeg_5014 (Sección UP 5014) en el vector pGEM-T easy®. Se hizo la subclonación de la sección UP 5014 en el plásmido recombinante pLGC3 entre los sitios *Xho*I y *Hind*III (Figura A2b). El producto de ligación fue comprobado con los iniciadores Hyg dir out/DOWN 5014 rev, obteniendo para ambas relaciones molares de vector e inserto el amplímero del tamaño esperado de 907 pb (Figura A2c). El producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* HB101 y las bacterias transformantes fueron seleccionadas en placas de LB/agar/Hyg. Se obtuvo una colonia a la que se le hizo extracción del plásmido y un mapeo de restricción (Figura A2d). Finalmente, el plásmido construido fue secuenciado para verificar la integridad del constructo.

Figura C1: Estrategia para la construcción del mutante de *M. smegmatis* defectivo en *msmeg_5014*. **a.** Esquema de obtención de mutantes defectivos en genes por la técnica de recombinería. **b.** Mapa del plásmido pALT23 que contiene el AES de *msmeg_5014*. **c.** Liberación de AES de *msmeg_5014* (3284 bp) por digestión con *Xho*I y *Avr*II.



El paso final para la obtención del mutante por sustitución de *M. smegmatis* mc²155 Δ *msmeg_5014* es la transformación del AES en la cepa de recombinería inducida con acetamida al 0,2 %. En este paso se siguió la metodología sugerida por Van Kessel [152], con una modificación en el medio usado, LB en vez de 7H9-ADC.

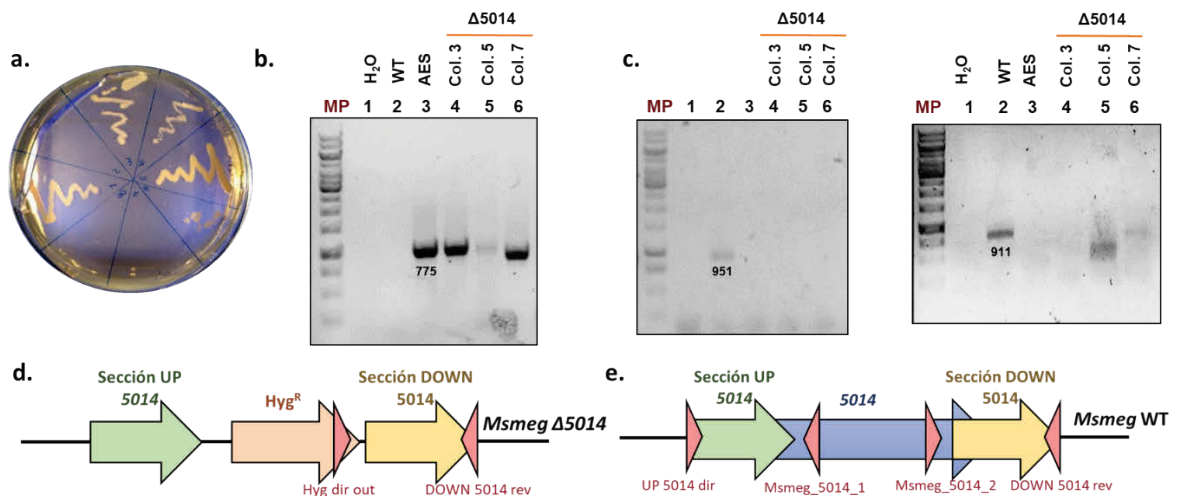
Figura C2: Obtención del AES de *msmeg_5014*. **a.** Esquema de obtención útiles génicos para obtener el AES de *msmeg_5014*. **b.** Digestión de plásmidos pLGC3 y pLGC1 para la subclonación de la sección DOWN 5014 (637 pb) en pLGC1 entre los sitios *Xho*I y *Hind*III (4583 pb). **c.** PCR de confirmación de producto de ligación (iniciadores: Hyg dir out/DOWN 5014 rev), se espera un fragmento de 907 pb. **d.** Mapeo de restricción del plásmido recombinante pALT23, se espera que al usar las enzimas *Xho*I-*Avr*II se produzcan dos bandas de 3284 y 1936 pb, las enzimas *Xho*I-*Hind*III dos bandas de 4583 y 637 pb, y la enzima *Kpn*I dos bandas de 3060 y 2160.



El análisis del genotipo mutante de las colonias se hizo por PCR (Figura C3b-e) con el esquema de análisis representado en la Figura C3d y e. En todas las PCR se analizaron las posibles colonias mutantes en *msmeg_5014* (Δ *msmeg_5014*), como control ADN

genómico de *M. smegmatis* mc²155 cepa silvestre (WT) y el plásmido pALT23 que contiene el AES de *msmeg_5014* (AES), los controles fueron seleccionados de tal manera que el primero comprueba la presencia del gen y el segundo la mutación del mismo. En la Figura C3b y d se muestra el primer análisis que permite evidenciar la presencia del gen de resistencia a Hyg en la región genómica de *msmeg_5014* (donde debió ocurrir la mutación por sustitución) usando iniciadores que anillan en el casete de Hyg^R y en la región corriente abajo de *msmeg_5014*. En todas las colonias analizadas se evidencia la inserción del casete en la región del genoma esperada.

Figura C3: Obtención del mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ *msmeg_5014* y comprobación del genotipo. **a.** Posibles colonias mutantes de *M. smegmatis* mc²155 Δ *msmeg_5014*, luego de la transformación con el AES de la cepa de recombinería inducida y seleccionadas en medio solido LB -Hyg-Km-Chx. **b.** Comprobación del genotipo mutante amplificando parte del casete de Hyg y *msmeg_5014*. **c.** Comprobación del genotipo mutante amplificando regiones internas de *msmeg_5014*. En todas las PCR de comprobación se muestra el análisis hecho a 3 posibles colonias de *M. smegmatis* mc²155 Δ *msmeg_5014* (Δ *msmeg_5014*) y se usaron como controles ADN genómico de *M. smegmatis* mc²155 cepa silvestre (WT) y el plásmido pALT23 (AES) **d.** Esquema de la región del genoma de *M. smegmatis* mc²155 donde ocurrió la sustitución de *msmeg_5014* por el casete de Hyg, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR positivas en colonias mutantes). **e.** Región genómica de *msmeg_5014* en *M. smegmatis* mc²155, indicando los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante (PCR negativas en colonias mutantes).



Para confirmar el genotipo mutante es necesario demostrar la ausencia de *msmeg_5014* en el genoma, en la Figura C3c y e se muestra este análisis. En este caso la mutación se indica por ausencia de un producto de PCR al usar los dos diferentes juegos de iniciadores que anillan en la parte interna y externa del gen. El primer juego de iniciadores UP 5014

dir y Msmeg_5014_1 confirma que las tres colonias son mutantes. En el producto con el segundo juego de iniciadores DOWN 5014 rev y Msmeg_5014_2 se observan que las colonias 3 y 5 son mutantes. Los resultados anteriores demuestran que las colonias 3 y 5 son los mutantes de *M. smegmatis* mc²155 H37Ra Δ *msmeg_5014*, pero en el caso de la colonia 7 la mutación ocurre cerca al extremo 5', mientras que las colonias 3 y 5 se tiene la mutación esperada. Para efectos de experimentos posteriores, las dos colonias serian apropiadas; sin embargo, con la colonia 3 se tiene una mayor seguridad en la mutación del gen *msmeg_5014*, razón por la que se decide continuar trabajando con esta colonia.

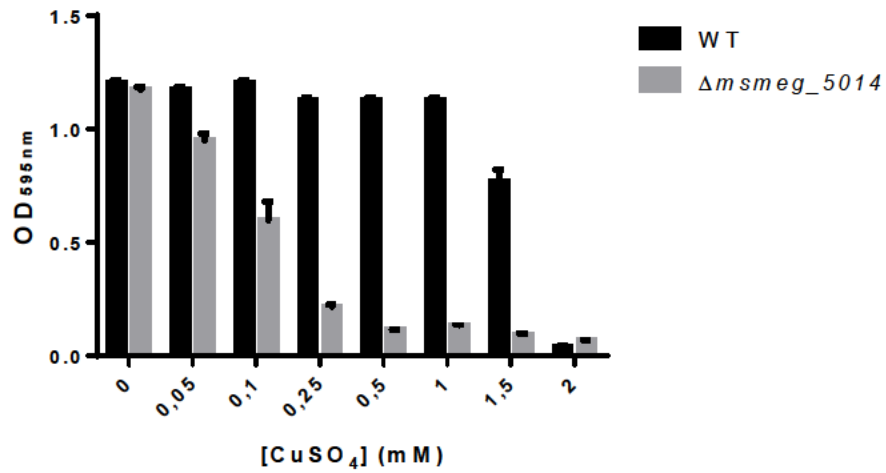
D. Anexo D: Ensayo de toxicidad de Cu en células de *M. smegmatis* defectivas en el gen *msmeg_5014*

Un vez construido y confirmado el mutante de *M. smegmatis* defectivo en el gen *msmeg_5014*, hizo un ensayo fenotípico de crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones variables de Cu con el fin de conocer el efecto de la ausencia de la ATPasa en la viabilidad celular. En la Figura D se muestran los resultados obtenidos de este ensayo. Se encontró que el mutante crece es a bajas concentraciones de CuSO₄ comparado con la cepa silvestre, indicando que la mutación del gen *msmeg_5014* en *M. smegmatis* mc²155 tiene un efecto en el crecimiento de la bacteria haciéndola más sensible a Cu. En otras bacterias como *P. auroginosa* y *Sinorhizobium meliloti* que codifican más de dos Cu⁺ ATPasas en su genoma, se ha encontrado las ATPasas pueden cumplir dos funciones diferentes como desintoxicación del metal y metalación de enzimas extracitoplasmáticas. Se ha evidenciado que al mutar los genes que las Cu⁺ ATPasas relacionadas de la desintoxicación del metal, la viabilidad celular en presencia de Cu resulta en fenotipo sensible al metal [151, 166], como se observa para el mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014.

La metodología empleada fue la misma que se usó en los ensayos de toxicidad frente a metales pesados de *M. smegmatis* sobreexpresando CtpB (Numeral 5.3.5), con la diferencia que solo se evaluó con CuSO₄ y se hizo la comparación entre la cepa silvestre y la cepa mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014.

Figura D: Efecto de concentraciones variables de Cu²⁺ en el crecimiento del mutante defectivo de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014. a. El OD_{595nm} del cultivo bacteriano

se midió luego de 72 días de cultivo en medio LB que contiene concentraciones variables de los cationes de CuSO₄. En negro se muestran los valores para la cepa silvestre de *M. smegmatis* mc²155 (WT) y en gris el mutante de *M. smegmatis* mc²155 Δ msmeg_5014 (Δ msmeg_5014). Los datos se muestran como el promedio \pm SEM derivado de medidas por triplicado biológico



Conflicto de Intereses

Los iniciadores para el análisis por qPCR de las ATPasas tipo P_{1B} fueron diseñados por Lorena Novoa durante su Tesis de Doctorado en Ciencias-Bioquímica, *Universidad Nacional de Colombia*. Las curvas de eficiencia de los iniciadores para el análisis por qPCR de los genes *sigA*, *ctpA*, *ctpB*, *ctpC*, *ctpD*, *ctpG* y *ctpJ*; la obtención del cADN por intoxicación con Cd²⁺ 40 μ M, Cu²⁺ 20 μ M, Fe³⁺ 0,41 mM, Mn²⁺ 0,2 mM y Ni²⁺ 2,5 mM; y la qPCR para el análisis de estos cADN con estos genes fue hecho por Epifanía Arango durante su estancia de investigación en nuestro grupo, *Universidad Nacional de Colombia*. Los plásmidos pLGC1 y pLGC3 usados para la construcción del AES de *msmeg_5014* fueron construidos por Laura Gil durante su Tesis de Pregrado en Química, *Universidad Nacional de Colombia*. Los plásmidos pYUB854 y pJV53 fueron donados por el profesor José Aínsa del Laboratorio de Genética de Micobacterias, *Universidad de Zaragoza*. Los ensayos de purificación de las proteínas CtpA, CtpB y CtpV, los ensayos de actividad pNPPasa y transporte de Cu⁺ en vesículas evertidas se realizaron bajo la tutoría y en el laboratorio del profesor José Argüello, *Worcester Polytechnic Institute*. Las medidas de Cu⁺ mediante AAS-GF de los ensayos de acumulación de la cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Ra Δ *ctpB* se realizaron bajo la tutoría de la Profesora Eliana Castillo, *Universidad Nacional de Colombia*. Los demás ensayos se realizaron en nuestro grupo de investigación y todos ellos se hicieron bajo la dirección del Profesor Carlos Yesid Soto, *Universidad Nacional de Colombia*.

Bibliografía

1. WHO, *Global Tuberculosis Report 2017*. 2017, Geneva: World Health Organization.
2. Luca, S. and T. Mihaescu, *History of BCG Vaccine*. *Maedica (Buchar)*, 2013. **8**(1): p. 53-8.
3. Chaisson, R.E. and M. Harrington, *How research can help control tuberculosis*. *Int J Tuberc Lung Dis*, 2009. **13**(5): p. 558-68.
4. Kaufmann, S.H., *Recent findings in immunology give tuberculosis vaccines a new boost*. *Trends Immunol*, 2005. **26**(12): p. 660-7.
5. Coll, P., [*Active drugs against Mycobacterium tuberculosis*]. *Enferm Infecc Microbiol Clin*, 2009. **27**(8): p. 474-80.
6. Martín, C., *Desarmando "El bacilo de la tuberculosis"*. G.d.A. Universidad de Zaragoza, Editor. España, 2006: p. 5-25.
7. Cambier, C.J., S. Falkow, and L. Ramakrishnan, *Host evasion and exploitation schemes of Mycobacterium tuberculosis*. *Cell*, 2014. **159**(7): p. 1497-509.
8. 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.
9. Botella, H., et al., *Metallobiology of host-pathogen interactions: an intoxicating new insight*. *Trends Microbiol*, 2012. **20**(3): p. 106-12.
10. 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.
11. Ward, S.K., et al., *CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, 2010. **77**(5): p. 1096-1110.
12. Duffus, J.N., "HEAVY METALS"—A MEANINGLESS TERM. *Pure and Applied Chemistry*, 2002. **74**(5): p. 793-807.
13. Hubner, R., K.B. Astin, and R.J. Herbert, 'Heavy metal'--time to move on from semantics to pragmatics? *J Environ Monit*, 2010. **12**(8): p. 1511-4.
14. Spagnolo, L., et al., *Unique features of the sodC-encoded superoxide dismutase from Mycobacterium tuberculosis, a fully functional copper-containing enzyme lacking zinc in the active site*. *J Biol Chem*, 2004. **279**(32): p. 33447-55.
15. Harth, G. and M.A. Horwitz, *Export of recombinant Mycobacterium tuberculosis superoxide dismutase is dependent upon both information in the protein and mycobacterial export machinery. A model for studying export of leaderless proteins by pathogenic mycobacteria*. *J Biol Chem*, 1999. **274**(7): p. 4281-92.
16. Agranoff, D. and S. Krishna, *Metal ion transport and regulation in Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience*, 2004. **9**: p. 2996-3006.
17. Palmgren, M.G. and P. Nissen, *P-type ATPases*. *Annual review of biophysics*, 2011. **40**: p. 243-66.
18. Novoa-Aponte, L., et al., *In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the Mycobacterium tuberculosis complex*. *BMC Struct Biol*, 2012. **12**: p. 25.
19. Novoa-Aponte, L. and C.Y. Soto Ospina, *Mycobacterium tuberculosis P-type ATPases: possible targets for drug or vaccine development*. *Biomed Res Int*, 2014. **2014**: p. 296986.
20. Sasseti, C.M. and E.J. Rubin, *Genetic requirements for mycobacterial survival during infection*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2003. **100**(22): p. 12989-94.

21. Forrellad, M.A., et al., *Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex*. Virulence, 2013. **4**(1): p. 3-66.
22. Kumar, M., et al., *Identification of Mycobacterium tuberculosis genes preferentially expressed during human infection*. Microb Pathog, 2011. **50**(1): p. 31-8.
23. Padilla-Benavides, T., et al., *A novel P(1B)-type Mn²⁺-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria*. J Biol Chem, 2013. **288**(16): p. 11334-47.
24. Arguello, J.M., S.J. Patel, and J. Quintana, *Bacterial Cu(+)-ATPases: models for molecular structure-function studies*. Metallomics, 2016. **8**(9): p. 906-14.
25. Patel, S.J., et al., *Fine-tuning of Substrate Affinity Leads to Alternative Roles of Mycobacterium tuberculosis Fe²⁺-ATPases*. J Biol Chem, 2016. **291**(22): p. 11529-39.
26. Koul, A., et al., *The challenge of new drug discovery for tuberculosis*. Nature, 2011. **469**(7331): p. 483-90.
27. Knechel, N.A., *Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis*. Crit Care Nurse, 2009. **29**(2): p. 34-43; quiz 44.
28. Coll, P., *Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis* Enferm Infecc Microbiol Clin, 2009. **27**: p. 474.
29. 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.
30. Ward, S.K., E.A. Hoye, and A.M. Talaat, *The global responses of Mycobacterium tuberculosis to physiological levels of copper*. J Bacteriol, 2008. **190**(8): p. 2939-46.
31. Nunes-Alves, C., et al., *In search of a new paradigm for protective immunity to TB*. Nat Rev Microbiol, 2014. **12**(4): p. 289-99.
32. Walzl, G., et al., *Immunological biomarkers of tuberculosis*. Nat Rev Immunol, 2011. **11**(5): p. 343-54.
33. 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.
34. Waldron, K.J. and N.J. Robinson, *How do bacterial cells ensure that metalloproteins get the correct metal?* Nat Rev Microbiol, 2009. **7**(1): p. 25-35.
35. Smith, I., *Mycobacterium tuberculosis pathogenesis and molecular determinants of virulence*. Clin Microbiol Rev, 2003. **16**(3): p. 463-96.
36. 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. 4980-4987.
37. Shi, X. and K.H. Darwin, *Copper homeostasis in Mycobacterium tuberculosis*. Metallomics, 2015.
38. Rastogi, N., E. Legrand, and C. Sola, *The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis*. Rev Sci Tech, 2001. **20**(1): p. 21-54.
39. Cook, G.M., et al., *Physiology of mycobacteria*. Adv Microb Physiol, 2009. **55**: p. 81-182, 318-9.
40. Daffé, M. and J.-M. Reyrat, *The Mycobacterial Cell Envelope*. 2008, Washington, DC: ASM Press. XIII, 395 p.
41. Brennan, P.J., *Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2003. **83**(1-3): p. 91-7.
42. Fu, Y., F.M. Chang, and D.P. Giedroc, *Copper transport and trafficking at the host-bacterial pathogen interface*. Acc Chem Res, 2014. **47**(12): p. 3605-13.
43. Wagner, D., et al., *Changes of the phagosomal elemental concentrations by Mycobacterium tuberculosis Mramp*. Microbiology, 2005. **151**(Pt 1): p. 323-32.
44. 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.
45. Gold, B., et al., *Identification of a copper-binding metallothionein in pathogenic mycobacteria*. Nat Chem Biol, 2008. **4**(10): p. 609-616.
46. Rodriguez, G.M. and I. Smith, *Identification of an ABC transporter required for iron acquisition and virulence in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2006. **188**(2): p. 424-30.

47. Homolka, S., et al., *Functional genetic diversity among Mycobacterium tuberculosis complex clinical isolates: delineation of conserved core and lineage-specific transcriptomes during intracellular survival*. PLoS Pathog, 2010. **6**(7): p. e1000988.
48. Siegrist, M.S., et al., *Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2009. **106**(44): p. 18792-7.
49. Serafini, A., et al., *Characterization of a Mycobacterium tuberculosis ESX-3 conditional mutant: essentiality and rescue by iron and zinc*. J Bacteriol, 2009. **191**(20): p. 6340-4.
50. Raimunda, D., et al., *Differential roles for the Co(2+) /Ni(2+) transporting ATPases, CtpD and CtpJ, in Mycobacterium tuberculosis virulence*. Mol Microbiol, 2014. **91**(1): p. 185-97.
51. 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.
52. Agranoff, D.D. and S. Krishna, *Metal ion homeostasis and intracellular parasitism*. Mol Microbiol, 1998. **28**(3): p. 403-12.
53. 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.
54. Kuhlbrandt, W., *Biology, structure and mechanism of P-type ATPases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2004. **5**(4): p. 282-95.
55. 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.
56. 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.
57. Tsuda, T. and C. Toyoshima, *Nucleotide recognition by CopA, a Cu⁺-transporting P-type ATPase*. EMBO J, 2009. **28**(12): p. 1782-91.
58. Sorensen, T.L., et al., *Localization of a K⁺-binding site involved in dephosphorylation of the sarcoplasmic reticulum Ca²⁺-ATPase*. J Biol Chem, 2004. **279**(45): p. 46355-8.
59. Ballal, A., B. Basu, and S.K. Apte, *The Kdp-ATPase system and its regulation*. J Biosci, 2007. **32**(3): p. 559-68.
60. Greie, J.C., *The KdpFABC complex from Escherichia coli: a chimeric K⁺ transporter merging ion pumps with ion channels*. Eur J Cell Biol, 2011. **90**(9): p. 705-10.
61. Rosenzweig, A.C. and J.M. Argüello, *Toward a molecular understanding of metal transport by P(1B)-type ATPases*. Current topics in membranes, 2012. **69**: p. 113-36.
62. 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.
63. Zielazinski, E.L., et al., *Sinorhizobium meliloti Nia is a P-ATPase expressed in the nodule during plant symbiosis and is involved in Ni and Fe transport*. Metallomics, 2013.
64. Rensing, C., B. Mitra, and B.P. Rosen, *The zntA gene of Escherichia coli encodes a Zn(II)-translocating P-type ATPase*. J Biol Chem, 1998. **273**(6): p. 3765-3770.
65. Sharma, R., et al., *The ATP hydrolytic activity of purified ZntA, a Pb(II)/Cd(II)/Zn(II)-translocating ATPase from Escherichia coli*. J. Biol. Chem., 2000. **275**(6): p. 3873-3878.
66. Mana-Capelli, S., A.K. Mandal, and J.M. Argüello, *Archeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu²⁺-ATPase - Functional role of its histidine-rich N-terminal metal binding domain*. J. Biol. Chem., 2003. **278**(42): p. 40534-40541.
67. Rutherford, J.C., J.S. Cavet, and N.J. Robinson, *Cobalt-dependent transcriptional switching by a dual-effector MerR-like protein regulates a cobalt-exporting variant CPx-type ATPase*. J Biol Chem, 1999. **274**(36): p. 25827-25832.
68. Novoa-Aponte, L., *Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de Mycobacterium tuberculosis*, in Departamento de Química. 2016, Universidad Nacional de Colombia. p. 204.
69. Gambel, A.M., M.G. Desrosiers, and D.R. Menick, *Characterization of a P-type Ca(2+)-ATPase from Flavobacterium odoratum*. J Biol Chem, 1992. **267**(22): p. 15923-31.
70. Toyoshima, C., et al., *Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 Å resolution*. Nature, 2000. **405**(6787): p. 647-655.

71. Shinoda, T., et al., *Crystal structure of the sodium-potassium pump at 2.4 Å resolution*. Nature, 2009. **459**(7245): p. 446-50.
72. Salvador, J.M., et al., *Ca²⁺ transport by reconstituted synaptosomal ATPase is associated with H⁺ countertransport and net charge displacement*. J Biol Chem, 1998. **273**(29): p. 18230-4.
73. 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.
74. Abe, K., K. Tani, and Y. Fujiyoshi, *Conformational rearrangement of gastric H(+),K(+)-ATPase induced by an acid suppressant*. Nat Commun, 2011. **2**: p. 155.
75. Fraile-Escanciano, A., et al., *Role of ENA ATPase in Na(+)-efflux at high pH in bryophytes*. Plant Mol Biol, 2009. **71**(6): p. 599-608.
76. Rodriguez-Navarro, A. and B. Benito, *Sodium or potassium efflux ATPase a fungal, bryophyte, and protozoal ATPase*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1798**(10): p. 1841-53.
77. Benito, B., B. Garciadeblas, and A. Rodriguez-Navarro, *Potassium- or sodium-efflux ATPase, a key enzyme in the evolution of fungi*. Microbiology, 2002. **148**(Pt 4): p. 933-41.
78. Pedersen, B.P., et al., *Crystal structure of the plasma membrane proton pump*. Nature, 2007. **450**(7172): p. 1111-4.
79. Morth, J.P., et al., *A structural overview of the plasma membrane Na⁺,K⁺-ATPase and H⁺-ATPase ion pumps*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2011. **12**(1): p. 60-70.
80. Snavelly, M.D., et al., *Magnesium transport in Salmonella typhimurium. Regulation of mgtA and mgtB expression*. J Biol Chem, 1991. **266**(2): p. 824-9.
81. Subramani, S., H. Perdreau-Dahl, and J.P. Morth, *The magnesium transporter A is activated by cardiolipin and is highly sensitive to free magnesium in vitro*. Elife, 2016. **5**.
82. Takar, M., Y. Wu, and T.R. Graham, *The Essential Neo1 Protein from Budding Yeast Plays a Role in Establishing Aminophospholipid Asymmetry of the Plasma Membrane*. J Biol Chem, 2016. **291**(30): p. 15727-39.
83. Møller, A.B., et al., *Phylogenetic analysis of P₅ P-type ATPases, a eukaryotic lineage of secretory pathway pumps*. Mol. Phylogenet. Evol., 2008. **46**(2): p. 619-634.
84. Cohen, Y., et al., *The yeast p5 type ATPase, spf1, regulates manganese transport into the endoplasmic reticulum*. PLoS One, 2013. **8**(12): p. e85519.
85. 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.
86. Dutta, S.J., et al., *Conserved aspartic acid 714 in transmembrane segment 8 of the ZntA subgroup of P_{1B}-type ATPases is a metal-binding residue*. Biochemistry, 2006. **45**(18): p. 5923-5931.
87. Dutta, S.J., et al., *Conservative and nonconservative mutations of the transmembrane CPC motif in ZntA: effect on metal selectivity and activity*. Biochemistry, 2007. **46**(12): p. 3692-703.
88. Raimunda, D., et al., *A tetrahedral coordination of Zinc during transmembrane transport by P-type Zn²⁺-ATPases*. Biochim Biophys Acta, 2012. **1818**(5): p. 1374-1377.
89. Wang, K., et al., *Structure and mechanism of Zn²⁺-transporting P-type ATPases*. Nature, 2014. **514**(7523): p. 518-22.
90. 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. 4677-4682.
91. Drees, S.L., et al., *Distinct functions of serial metal-binding domains in the Escherichia coli P1B -ATPase CopA*. Mol Microbiol, 2015. **97**(3): p. 423-38.
92. 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.
93. Hampshire, T., et al., *Stationary phase gene expression of Mycobacterium tuberculosis following a progressive nutrient depletion: a model for persistent organisms?* Tuberculosis (Edinb), 2004. **84**(3-4): p. 228-38.
94. Betts, J.C., et al., *Evaluation of a nutrient starvation model of Mycobacterium tuberculosis persistence by gene and protein expression profiling*. Mol Microbiol, 2002. **43**(3): p. 717-31.
95. Cho, S.H., D. Goodlett, and S. Franzblau, *ICAT-based comparative proteomic analysis of non-replicating persistent Mycobacterium tuberculosis*. Tuberculosis (Edinb), 2006. **86**(6): p. 445-60.

96. 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.
97. Sherman, D.R., et al., *Regulation of the Mycobacterium tuberculosis hypoxic response gene encoding alpha-crystallin*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7534-9.
98. Leon-Torres, A., L. Novoa-Aponte, and C.Y. Soto, *CtpA, a putative Mycobacterium tuberculosis P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane*. Biometals, 2015. **28**(4): p. 713-24.
99. Argüello, J.M., T. Padilla-Benavides, and J.M. Collins, *Transport Mechanism and Cellular Functions of Bacterial Cu(I)-ATPases*, in *Metals in Cells, Encyclopedia of Inorganic and Bioinorganic Chemistry*, V. Culotta and J.A. Scott, Editors. 2013, Wiley & Sons, Ltd. p. 155-162.
100. Gonzalez-Guerrero, M., et al., *Structure of the two transmembrane Cu⁺ transport sites of the Cu⁺-ATPases*. J Biol Chem, 2008. **283**(44): p. 29753-9.
101. Ridder, I.S. and B.W. Dijkstra, *Identification of the Mg²⁺-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.
102. Padilla-Benavides, T., et al., *Mechanism of ATPase-Mediated Cu⁺ Export and Delivery to Periplasmic Chaperones: The Interaction of Escherichia coli CopA and CusF*. J Biol Chem, 2014. **289**(30): p. 20492-501.
103. Gonzalez-Guerrero, M., D. Hong, and J.M. Arguello, *Chaperone-mediated Cu⁺ delivery to Cu⁺ transport ATPases: requirement of nucleotide binding*. J Biol Chem, 2009. **284**(31): p. 20804-11.
104. de Bruijn, F.J., *Stress and Environmental Regulation of Gene Expression and Adaptation in Bacteria*. Vol. 1. 2016: Wiley-Blackwell. 1472.
105. Clark, D., *Molecular Biology*. Elsevier Academic Press, 2005: p. 141-145.
106. Osman, D. and J.S. Cavet, *Bacterial metal-sensing proteins exemplified by ArsR-SmtB family repressors*. Nat Prod Rep, 2010. **27**(5): p. 668-680.
107. Wolschendorf, F., et al., *Copper resistance is essential for virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(4): p. 1621-1626.
108. Krithika, R., et al., *A genetic locus required for iron acquisition in Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006. **103**(7): p. 2069-74.
109. 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.
110. Manabe, Y.C., et al., *Attenuation of virulence in Mycobacterium tuberculosis expressing a constitutively active iron repressor*. PNAS, 1999. **96**(22): p. 12844-12848.
111. Maciag, A., et al., *Global analysis of the Mycobacterium tuberculosis Zur (FurB) regulon*. J Bacteriol, 2007. **189**(3): p. 730-40.
112. TB-Alliance, *Global Alliance for TB Drug Development*. 2012 Annual Report, 2012.
113. Vashishtha, V.M., *WHO Global Tuberculosis Control Report 2009: Tuberculosis elimination is a distant dream*. Indian Pediatr, 2009. **46**(5): p. 401-2.
114. Fine, P.E., *Variation in protection by BCG: implications of and for heterologous immunity*. Lancet, 1995. **346**(8986): p. 1339-45.
115. Wayne, L.G. and L.G. Hayes, *An in vitro model for sequential study of shutdown of Mycobacterium tuberculosis through two stages of nonreplicating persistence*. Infect Immun, 1996. **64**(6): p. 2062-9.
116. Chomczynski, P. and N. Sacchi, *Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction*. Anal Biochem, 1987. **162**(1): p. 156-9.
117. Untergasser, A., et al., *Primer3--new capabilities and interfaces*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(15): p. e115.
118. Pfaffl, M.W., et al., *Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper--Excel-based tool using pair-wise correlations*. Biotechnol Lett, 2004. **26**(6): p. 509-15.

119. Kapopoulou, A., J.M. Lew, and S.T. Cole, *The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes*. Tuberculosis (Edinb), 2011. **91**(1): p. 8-13.
120. Du, P., C.D. Sohaskey, and L. Shi, *Transcriptional and Physiological Changes during Mycobacterium tuberculosis Reactivation from Non-replicating Persistence*. Front Microbiol, 2016. **7**: p. 1346.
121. Turkarslan, S., et al., *A comprehensive map of genome-wide gene regulation in Mycobacterium tuberculosis*. Sci Data, 2015. **2**: p. 150010.
122. Tsirigos, K.D., et al., *The TOPCONS web server for consensus prediction of membrane protein topology and signal peptides*. Nucleic Acids Res, 2015. **43**(W1): p. W401-7.
123. Jones, P., et al., *InterProScan 5: genome-scale protein function classification*. Bioinformatics, 2014. **30**(9): p. 1236-40.
124. 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.
125. Sievers, F., et al., *Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega*. Mol Syst Biol, 2011. **7**: p. 539.
126. Zhang, Y. and J. Skolnick, *TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score*. Nucleic Acids Res, 2005. **33**(7): p. 2302-9.
127. Kelley, L.A., et al., *The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis*. Nat Protoc, 2015. **10**(6): p. 845-58.
128. 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.
129. 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.
130. 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.
131. Ray, A., E. Lindahl, and B. Wallner, *Improved model quality assessment using ProQ2*. BMC Bioinformatics, 2012. **13**: p. 224.
132. Lomize, M.A., et al., *OPM database and PPM web server: resources for positioning of proteins in membranes*. Nucleic Acids Res, 2012. **40**(Database issue): p. D370-6.
133. Pettersen, E.F., et al., *UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis*. J Comput Chem, 2004. **25**(13): p. 1605-12.
134. Dolinsky, T.J., et al., *PDB2PQR: an automated pipeline for the setup of Poisson-Boltzmann electrostatics calculations*. Nucleic Acids Res, 2004. **32**(Web Server issue): p. W665-7.
135. Allen, J.L., *A modified Ziehl-Neelsen stain for mycobacteria*. Med Lab Sci, 1992. **49**(2): p. 99-102.
136. D'Amico, S., et al., *Activity-stability relationships in extremophilic enzymes*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 7891-6.
137. *Catalogo ATCC*. 2015; Available from: <https://www.atcc.org/>.
138. Snapper, S.B., et al., *Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol, 1990. **4**(11): p. 1911-9.
139. 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.
140. Hastings Software, I., *Gene Runner*, in Serial Number 39209065. 1994: New York.
141. Davis, M.W., *ApE - A Plasmid Editor*. 2003-2008.
142. 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.
143. Somerville, W., et al., *Extraction of Mycobacterium tuberculosis DNA: a question of containment*. J Clin Microbiol, 2005. **43**(6): p. 2996-7.

144. Studier, F.W., *Protein production by auto-induction in high density shaking cultures*. Protein Expr Purif, 2005. **41**(1): p. 207-34.
145. Bredeston, L.M. and F.L. Gonzalez Flecha, *The promiscuous phosphomonoesterase activity of Archaeoglobus fulgidus CopA, a thermophilic Cu⁺ transport ATPase*. Biochim Biophys Acta, 2016. **1858**(7 Pt A): p. 1471-8.
146. Yang, Y., et al., *Activation of Archaeoglobus fulgidus Cu⁺-ATPase CopA by cysteine*. Biochim Biophys Acta, Biomembr, 2007. **1768**(3): p. 495-501.
147. Padilla-Benavides, T., C.J. McCann, and J.M. Argüello, *The mechanism of Cu⁺ transport ATPases: Interaction with Cu⁺ chaperones and the role of transient metal-binding sites*. J Biol Chem, 2013. **288**(1): p. 69-78.
148. Fiske, S.H.a.S., Y. , *The Colorimetric Determination of Phosphorus*. Journal of Biological Chemistry, 1925. **66**(2): p. 375-400.
149. 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.
150. León-Torres, A., *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*, in Departamento de Química. 2013, Universidad Nacional de Colombia. p. 146.
151. González-Guerrero, M., et al., *Distinct functional roles of homologous Cu(+) efflux ATPases in Pseudomonas aeruginosa*. Mol. Microbiol., 2010. **78**(5): p. 1246-1258.
152. van Kessel, J.C. and G.F. Hatfull, *Recombineering in Mycobacterium tuberculosis*. Nat Methods, 2007. **4**(2): p. 147-52.
153. Andrews, J.M., *Determination of minimum inhibitory concentrations*. J Antimicrob Chemother, 2001. **48 Suppl 1**: p. 5-16.
154. Voskuil, M.I., et al., *The response of mycobacterium tuberculosis to reactive oxygen and nitrogen species*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 105.
155. Tullius, M.V., G. Harth, and M.A. Horwitz, *High extracellular levels of Mycobacterium tuberculosis glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism*. Infect Immun, 2001. **69**(10): p. 6348-63.
156. Sartain, M.J. and J.T. Belisle, *N-Terminal clustering of the O-glycosylation sites in the Mycobacterium tuberculosis lipoprotein SodC*. Glycobiology, 2009. **19**(1): p. 38-51.
157. D'Orazio, M., et al., *Lipid modification of the Cu,Zn superoxide dismutase from Mycobacterium tuberculosis*. Biochem J, 2001. **359**(Pt 1): p. 17-22.
158. Shi, L., et al., *Expression of Th1-mediated immunity in mouse lungs induces a Mycobacterium tuberculosis transcription pattern characteristic of nonreplicating persistence*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2003. **100**(1): p. 241-6.
159. Rowland, J.L. and M. Niederweis, *A multicopper oxidase is required for copper resistance in Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol, 2013. **195**(16): p. 3724-33.
160. Solomon, E.I., U.M. Sundaram, and T.E. Machonkin, *Multicopper Oxidases and Oxygenases*. Chem Rev, 1996. **96**(7): p. 2563-2606.
161. Quintanar, L., et al., *Shall we dance? How a multicopper oxidase chooses its electron transfer partner*. Acc Chem Res, 2007. **40**(6): p. 445-52.
162. Galli, I., G. Musci, and M.C. Bonaccorsi di Patti, *Sequential reconstitution of copper sites in the multicopper oxidase CueO*. J Biol Inorg Chem, 2004. **9**(1): p. 90-5.
163. Bruckner, A., et al., *Yeast two-hybrid, a powerful tool for systems biology*. Int J Mol Sci, 2009. **10**(6): p. 2763-88.
164. Preisig, O., R. Zufferey, and H. Hennecke, *The Bradyrhizobium japonicum fixGHIS genes are required for the formation of the high-affinity cbb(3)-type cytochrome oxidase*. Arch Microbiol, 1996. **165**(5): p. 297-305.
165. Kahn, D., et al., *Rhizobium meliloti fixGHI sequence predicts involvement of a specific cation pump in symbiotic nitrogen fixation*. J Bacteriol, 1989. **171**(2): p. 929-39.

166. Patel, S.J., et al., *Functional diversity of five homologous Cu⁺-ATPases present in Sinorhizobium meliloti*. Microbiology, 2014: p. 1237-1251.
167. Osman, D., et al., *The copper supply pathway to a Salmonella Cu,Zn-superoxide dismutase (SodCII) involves P(1) (B) -type ATPase copper efflux and periplasmic CueP*. Mol Microbiol, 2012. **87**(3): p. 466-477.
168. Voskuil, M.I., et al., *Inhibition of respiration by nitric oxide induces a Mycobacterium tuberculosis dormancy program*. J Exp Med, 2003. **198**(5): p. 705-13.
169. Boshoff, H.I. and C.E. Barry, 3rd, *Tuberculosis - metabolism and respiration in the absence of growth*. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(1): p. 70-80.
170. Braunstein, M., et al., *SecA2 functions in the secretion of superoxide dismutase A and in the virulence of Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol, 2003. **48**(2): p. 453-64.
171. Quitian, L.V., *Determinación de características funcionales de CtpG, una ATPasa tipo P transportadora de metales pesados a través de la membrana plasmática de Mycobacterium tuberculosis*, in Departamento de Química. 2017, Universidad Nacional de Colombia. p. 144.
172. Cavet, J.S., et al., *A cadmium-lead-sensing ArsR-SmtB repressor with novel sensory sites. Complementary metal discrimination by NmtR AND CmtR in a common cytosol*. J Biol Chem, 2003. **278**(45): p. 44560-6.
173. Chauhan, S., et al., *CmtR, a cadmium-sensing ArsR-SmtB repressor, cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in Mycobacterium tuberculosis*. FEBS J, 2009. **276**(13): p. 3428-39.
174. Leon-Torres, A., L. Novoa-Aponte, and C.Y. Soto, *CtpA, a putative Mycobacterium tuberculosis P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane*. Biometals, 2015.
175. Zufferey, R., et al., *Assembly and function of the cytochrome cbb3 oxidase subunits in Bradyrhizobium japonicum*. Journal of Biological Chemistry, 1996. **271**(15): p. 9114-9.
176. Hirayama, T., et al., *RESPONSIVE-TO-ANTAGONIST1, a Menkes/Wilson disease-related copper transporter, is required for ethylene signaling in Arabidopsis*. Cell, 1999. **97**(3): p. 383-393.
177. Abdel-Ghany, S.E., et al., *Two P-type ATPases are required for copper delivery in Arabidopsis thaliana chloroplasts*. Plant Cell, 2005. **17**(4): p. 1233-51.
178. La Fontaine, S. and J.F. Mercer, *Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: role in copper homeostasis*. Arch Biochem Biophys, 2007. **463**(2): p. 149-67.
179. Rodrigue, S., et al., *The sigma factors of Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev, 2006. **30**(6): p. 926-41.
180. Giedroc, D.P. and A.I. Arunkumar, *Metal sensor proteins: nature's metalloregulated allosteric switches*. Dalton Trans, 2007(29): p. 3107-20.
181. Rengarajan, J., B.R. Bloom, and E.J. Rubin, *Genome-wide requirements for Mycobacterium tuberculosis adaptation and survival in macrophages*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(23): p. 8327-32.
182. Cavet, J.S., et al., *A nickel-cobalt-sensing ArsR-SmtB family repressor. Contributions of cytosol and effector binding sites to metal selectivity*. J Biol Chem, 2002. **277**(41): p. 38441-38448.
183. Liu, T., et al., *CsoR is a novel Mycobacterium tuberculosis copper-sensing transcriptional regulator*. Nat Chem Biol, 2007. **3**(1): p. 60-68.
184. Peterson, E.J., et al., *A high-resolution network model for global gene regulation in Mycobacterium tuberculosis*. Nucleic Acids Res, 2014. **42**(18): p. 11291-303.
185. Balazsi, G., et al., *The temporal response of the Mycobacterium tuberculosis gene regulatory network during growth arrest*. Mol Syst Biol, 2008. **4**: p. 225.
186. Kuo, M.H. and C.D. Allis, *In vivo cross-linking and immunoprecipitation for studying dynamic Protein:DNA associations in a chromatin environment*. Methods, 1999. **19**(3): p. 425-33.
187. Williams, K.J., et al., *Deciphering the metabolic response of Mycobacterium tuberculosis to nitrogen stress*. Mol Microbiol, 2015. **97**(6): p. 1142-57.
188. Cuthbertson, L. and J.R. Nodwell, *The TetR family of regulators*. Microbiol Mol Biol Rev, 2013. **77**(3): p. 440-75.

189. Rodrigue, S., et al., *Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays*. J Bacteriol, 2007. **189**(5): p. 1505-13.
190. Mac Aogain, M., et al., *The non-classical ArsR-family repressor PyeR (PA4354) modulates biofilm formation in Pseudomonas aeruginosa*. Microbiology, 2012. **158**(Pt 10): p. 2598-609.
191. Galagan, J.E., et al., *The Mycobacterium tuberculosis regulatory network and hypoxia*. Nature, 2013. **499**(7457): p. 178-83.
192. Mehra, S. and D. Kaushal, *Functional genomics reveals extended roles of the Mycobacterium tuberculosis stress response factor sigmaH*. J Bacteriol, 2009. **191**(12): p. 3965-80.
193. Raman, S., et al., *The Alternative Sigma Factor SigH Regulates Major Components of Oxidative and Heat Stress Responses in Mycobacterium tuberculosis*. J. Bacteriol., 2001. **183**(20): p. 6119-6125.
194. Manganelli, R., et al., *Role of the extracytoplasmic-function sigma factor sigma(H) in Mycobacterium tuberculosis global gene expression*. Mol Microbiol, 2002. **45**(2): p. 365-74.
195. Liu, G.S., et al., *Targeted alterations in iron homeostasis underlie plant defense responses*. Journal of Cell Science, 2007. **120**(4): p. 596-605.
196. Gonzalo-Asensio, J., et al., *PhoP: a missing piece in the intricate puzzle of Mycobacterium tuberculosis virulence*. PLoS One, 2008. **3**(10): p. e3496.
197. Betts, M.J.R., R.B., *Amino-Acid Properties and Consequences of Substitutions*, in *Bioinformatics for Geneticists: A Bioinformatics Primer for the Analysis of Genetic Data*, M.R. Barnes, Editor. 2007, John Wiley & Sons, Ltd. p. 311–342.
198. Argüello, J.M., *Identification of ion selectivity determinants in heavy metal transport P1B-type ATPases*. J. Membr. Biol., 2003. **195**: p. 93-108.
199. Andersson, M., et al., *Copper-transporting P-type ATPases use a unique ion-release pathway*. Nat Struct Mol Biol, 2014. **21**(1): p. 43-8.
200. Bublitz, M., *P-Type ATPases Methods and Protocols*. 1 ed. Methods in Molecular Biology, ed. M. Bublitz. 2016, New York: Humana Press. XIV, 544.
201. Mignaco, J.A., H. Barrabin, and H.M. Scofano, *ATPase and phosphatase activities are differentially inhibited by photo-oxidation of the sarcoplasmic reticulum Ca(2+)-ATPase*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1321**(3): p. 252-8.
202. Mandal, A.K., W.D. Cheung, and J.M. Argüello, *Characterization of a thermophilic P-type Ag⁺/Cu⁺-ATPase from the extremophile Archaeoglobus fulgidus*. J. Biol. Chem., 2002. **277**: p. 7201-7208.
203. Copeland, R.A., *Enzymes*. 2 ed. 2000, New York, NY: Wiley-VCH.
204. Raimunda, D., et al., *Role in metal homeostasis of CtpD, a Co(2+)-transporting P(1B4)-ATPase of Mycobacterium smegmatis*. Molecular microbiology, 2012. **84**(6): p. 1139-49.
205. 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. 569-579.
206. Nies, D.H. and M. Herzberg, *A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria*. Mol Microbiol, 2013. **87**(3): p. 447-54.
207. Raimunda, D., et al., *The transport mechanism of bacterial Cu(+)-ATPases: distinct efflux rates adapted to different function*. Biometals, 2011. **24**(3): p. 467-475.
208. Rensing, C., et al., *CopA: An Escherichia coli Cu(I)-translocating P-type ATPase*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2000. **97**(2): p. 652-656.
209. Van Kessel, J.C., *Recombineering in Mycobacteria using Mycobacteriophage proteins*, in *Faculty of Arts and Sciences*. 2008, University of Pittsburgh. p. 286.
210. Wards, B.J. and D.M. Collins, *Electroporation at elevated temperatures substantially improves transformation efficiency of slow-growing mycobacteria*. FEMS Microbiol Lett, 1996. **145**(1): p. 101-5.
211. Invitrogen, *pBAD TOPO TA Expression Kit (Manual)*. 2009.
212. Ayala-Torres, C., *Clonación, sobreexpresión y determinación de la especificidad iónica de Pma1, una posible Na⁺/K⁺ ATPasa de Mycobacterium smegmatis*, in *Departamento de Química*. 2014, Universidad Nacional de Colombia. p. 227.

213. Murphy, D.J. and J.R. Brown, *Novel drug target strategies against Mycobacterium tuberculosis*. *Curr Opin Microbiol*, 2008. **11**(5): p. 422-7.
214. Singh, R., A. Singh, and A.K. Tyagi, *Deciphering the genes involved in pathogenesis of Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis (Edinb)*, 2005. **85**(5-6): p. 325-35.
215. Vandal, O.H., C.F. Nathan, and S. Ehrt, *Acid resistance in Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol*, 2009. **191**(15): p. 4714-21.
216. Cosma, C.L., D.R. Sherman, and L. Ramakrishnan, *The secret lives of the pathogenic mycobacteria*. *Annu Rev Microbiol*, 2003. **57**: p. 641-76.
217. van der Wel, N., et al., *M. tuberculosis and M. leprae translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells*. *Cell*, 2007. **129**(7): p. 1287-98.
218. Heras, B., M.J. Scanlon, and J.L. Martin, *Targeting virulence not viability in the search for future antibacterials*. *Br J Clin Pharmacol*, 2015. **79**(2): p. 208-15.
219. Hingley-Wilson, S.M., V.K. Sambandamurthy, and W.R. Jacobs, Jr., *Survival perspectives from the world's most successful pathogen, Mycobacterium tuberculosis*. *Nat Immunol*, 2003. **4**(10): p. 949-55.
220. Gil-Cruz, L.A., *Desarrollo de útiles génicos para la construcción de un mutante de M. smegmatis defectivo en el gen MMSMEG_5014*, in *Departamento de Química*. 2016, Universidad Nacional de Colombia. p. 21.