

UNIVERSIDAD  
**NACIONAL**  
DE COLOMBIA

**Determinación de características  
funcionales de CtpG, una ATPasa tipo P  
transportadora de metales pesados a  
través de la membrana plasmática de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Laudy Viviana Quitian Cruz**

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

2017



**Determinación de características  
funcionales de CtpG, una ATPasa tipo P  
transportadora de metales pesados a  
través de la membrana plasmática de  
*Mycobacterium tuberculosis***

**Laudy Viviana Quitian Cruz**

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en Ciencias- Bioquímica**

Director:

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

Profesor Titular, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Interacción Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2017



*El temor de Jehová es enseñanza de sabiduría: Y delante de la honra está la humildad.  
Proverbios 15:33*

*Dedico este trabajo a mis papas y hermanos  
quienes soportaron mi ausencia durante esta etapa  
de mi vida y siempre estuvieron allí para darme  
una palabra de aliento.*

*Da al sabio, y será más sabio: Enseña al justo, y  
acrecerá su saber. Proverbios 9:9*



## **Agradecimientos**

A **Dios**, que aunque no lo vemos, muchas veces está más cerca de nosotros de lo que pensamos. En cada situación él es quien nos esfuerza, nos da la vida, la respiración, aún el palpitar de nuestro corazón. Aunque a veces nos olvidamos de él, no por eso él se olvida de nosotros, se acuerda que somos mortales y que la única esperanza que tenemos es él. Hoy le agradezco, por usar cada situación durante la maestría para formar mi carácter y ser mi mayor ejemplo de humildad y amor sincero.

A mis **Padres** Hugo Efraín Quitian Quitian y Esperanza Cruz Torres por ser ejemplo de esfuerzo, dedicación y perseverancia, por estar ahí cuando más he necesitado un consejo y una verdadera amistad.

A mis **Hermanos** Stiven y Yeison por todos los momentos compartidos, por darme su apoyo durante este proceso, por cada risa y cada oportunidad para aprender juntos.

A toda mi **Familia** por apoyarme en este proceso, en especial a mi abuela Lilia Torres que ha sido desde mi niñez un gran ejemplo y a mi tía Nancy que ha sido una de mis mejores amigas con quien he compartido muchos momentos de alegría.

A la **Universidad Nacional de Colombia**, por la formación en el área de la investigación, por todas las puertas que se abrieron durante mi estancia y por el apoyo económico recibido como auxiliar docente.

A la **DIB**, Dirección de Investigación Sede Bogotá por la financiación de la pasantía corta a la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile) avalada en la "CONVOCATORIA DEL PROGRAMA NACIONAL DE INTERNACIONALIZACIÓN DEL CONOCIMIENTO 2013 - 2015" en la Modalidad 4: Apoyo a estudiantes de maestría o doctorado en cualquier área del

conocimiento o de especialidades en el área de la salud de la UN para realizar pasantías de investigación o residencias artísticas en el extranjero.

A **COLCIENCIAS** por la financiación de los estudios de Maestría recibido en la CONVOCATORIA NACIONAL JÓVENES INVESTIGADORES E INNOVADORES 2015 – COLCIENCIAS. Este proyecto fue parcialmente financiado por el proyecto COLCIENCIA FP44842-108-2016, que hace parte de la convocatoria 712-2015 para proyectos de investigación en ciencias básicas.

Al **Departamento de Química** de la Universidad Nacional de Colombia por la formación científica y el conocimiento adquirido a través de las asignaturas de la Maestría y por facilitarme el acceso al Laboratorio de Equipos Comunes de Bioquímica donde pase muchas horas de experimentación.

Al profesor **Carlos Yesid Soto**, director del presente trabajo, por brindarme la oportunidad y las herramientas para desarrollar la Tesis de Maestría en el grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias, además de su gestión en muchas de las actividades realizadas durante mi estancia en la universidad.

A la profesora **Martha Nancy Calderón** por todos los aportes recibidos en la presente investigación, por su confianza y cariño con que me enseñó tantas cosas y por brindarme su valiosa amistad.

A la investigadora **Fanny Guzmán** por recibirme en su Laboratorio de Síntesis de Péptidos en el Núcleo de Biotecnología Curauma en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso (Chile), ya que muchas de sus enseñanzas me hicieron sin dudar una mejor investigadora.

A la investigadora **Constanza Cárdenas** por los conocimientos recibidos en la predicción de epítopes antigénicos a través de servidores bioinformáticos.

A la investigadora **Jimena Cortés** por el conocimiento recibido en biología molecular, expresión de proteínas y producción de anticuerpos policlonales.

Al investigador **Claudio Álvarez** por sus valiosas enseñanzas en biología molecular, expresión de proteínas y síntesis de péptidos.

Al profesor **Pedro de Brito** y al **Laboratorio de Microbiología Ambiental** de la Universidad Nacional de Colombia por permitirme hacer muchos de los ensayos en su laboratorio.

Al grupo de Investigación: Interacción **Hospedero-Patógeno** por la colaboración brindada.

Al **Grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias** por la formación y entrenamiento, a sus integrantes Lorena, Milena, Sandra, Andrés, Paola y Cristian, por todos los momentos compartidos y por todas las enseñanzas en el área intelectual y personal.

A **Andrés León** por su apoyo constante en la presente investigación, por todo lo que me enseñó como científico e investigador.

A mis amigos **Vanessa, Milton y Carlos** que me apoyaron y creyeron en mi desde el principio y que a pesar de las adversidades siempre estuvieron conmigo ofreciendo su valiosa y sincera amistad.

A todos aquellos que de alguna manera contribuyeron con el desarrollo de esta investigación.



## Resumen

*Mycobacterium tuberculosis (Mtb)* es el agente etiológico de la tuberculosis (TB). Actualmente, *Mtb* es el mayor causante de muertes por un agente infeccioso en el mundo. Las principales estrategias para el control de la TB incluyen la quimioterapia, el diagnóstico temprano y la vacunación con el bacilo de Calmette-Guérin (BCG). Sin embargo, el surgimiento de cepas multifármaco resistentes (MDR) y extremadamente fármaco resistentes (XDR) han dificultado el control de la TB. Por lo tanto, se hace prioritario identificar nuevos blancos terapéuticos para así poder desarrollar nuevas alternativas de control.

Una de las estrategias que utilizan los macrófagos cuando han fagocitado a *Mtb*, es aumentar la concentración de metales como hierro, cobre, zinc, potasio, calcio y manganeso, por lo que la micobacteria requiere de sistemas que permitan el eflujo y la detoxificación de metales, para mantener la homeostasis iónica. Específicamente, *Mtb* codifica 28 genes encargados del transporte de iones metálicos, de los que 12 son genes que codifican ATPasas tipo P que se expresan diferencialmente durante la infección, una amplia cantidad, respecto a otros patógenos intracelulares.

Las ATPasas tipo P son enzimas que catalizan el transporte de cationes metálicos en contra del gradiente de concentración, a partir de la hidrólisis del ATP. Su expresión es fundamental para la viabilidad celular debido a su participación en procesos de detoxificación, metalación de otras proteínas y en respuesta a estrés oxidativo. Su localización transmembranal, las hace un blanco terapéutico más accesible a los fármacos, respecto a blancos citoplasmáticos.

Se ha reportado que CtpG, una ATPasa tipo P<sub>1B</sub>, se induce durante la infección de *Mtb* en macrófagos humanos, en condiciones de hipoxia, inanición y en presencia de sustancias tóxicas como altas concentraciones de metales pesados (Cu<sup>2+</sup>-500 μM y Zn<sup>2+</sup>-500 μM) que afectan la

viabilidad de *Mtb*. Adicionalmente CmtR, el regulador transcripcional de *ctpG*, es sensado por  $\text{Cd}^{2+}$  en *Mtb* H37Rv, lo que sugiere que CtpG podría ser una bomba encargada del eflujo de este metal tóxico. Por todo lo anterior, CtpG podría ser un blanco terapéutico interesante, por lo que se hace importante conocer muchas de sus características funcionales.

En el presente trabajo se propuso determinar algunas características de CtpG como la especificidad iónica en membrana de micobacterias, y el comportamiento transcripcional en presencia de concentraciones subletales de metales pesados posiblemente transportados por esta enzima. Además, se desarrollaron herramientas para la producción de anticuerpos policlonales contra CtpG.

La expresión de CtpG recombinante se optimizó usando el sistema pBAD A Myc His, en *E. coli* LMG194. La proteína se expresó en la fracción soluble utilizando 0.3% de L- arabinosa y 8 horas de inducción a 20°C. Así mismo la mayor parte de la proteína se detectó en la fracción insoluble como cuerpos de inclusión en todas las condiciones de cultivo analizadas.

Se encontró que los iones  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Pb}^{2+}$  inducen la actividad enzimática mediada por CtpG en la membrana plasmática de micobacteria, con valores de  $6.25 \pm 1.429$ ,  $4.1266 \pm 0.914$ ,  $6.5705 \pm 1.694$  y  $6.2099 \pm 1.745$  U/mg de proteína, respectivamente. Para hacer un acercamiento a la especificidad iónica, se realizaron ensayos de tolerancia a concentraciones tóxicas de metales pesados en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando CtpG. Se encontró que CtpG genera tolerancia a  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en células completas de micobacteria. De acuerdo a estos resultados, se determinaron las constantes cinéticas de la proteína recombinante utilizando  $\text{Cd}^{2+}$  ( $V_{\text{máx}}$ :  $0,856 \pm 0,01$  y  $K_m$ :  $0,108 \pm 0,007$ ) y  $\text{Cu}^{2+}$  ( $V_{\text{máx}}$ :  $1,051 \pm 0,155$  y  $K_m$ :  $0,981 \pm 0,422$ ) como sustratos. Esto permitió apreciar que los iones  $\text{Cd}^{2+}$ , podrían ser más eficientemente transportados por CtpG

**Palabras clave:**

*Mycobacterium tuberculosis*, transporte de iones metálicos, ATPasas tipo P, CtpG, péptidos antigénicos.

## Abstract

*Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is the etiologic agent of tuberculosis (TB). *Mtb* is currently the largest cause of death by an infectious agent in the world. Key strategies for TB control include chemotherapy, early diagnosis and vaccination with the Bacillus Calmette-Guérin (BCG). However, the emergence of resistant multidrug resistant (MDR) and extremely drug resistant (XDR) strains has undoubtedly made TB control difficult. Therefore, it is a priority to identify new therapeutic targets in order to develop new control alternatives.

One of the strategies used by macrophages when they have phagocytosed *Mtb* is to increase the concentration of metals such as iron, copper, zinc, potassium, calcium and manganese, so the mycobacteria requires systems that allow efflux and detoxification of metals, to maintain ionic homeostasis. Specifically, *Mtb* encodes 28 genes responsible for the transport of metal ions, of which 12 are P-type ATPases expressing differentially during infection, a large amount, relative to other intracellular pathogens.

The P type ATPases are enzymes that catalyze the transport of metallic cations generally against the concentration gradient, from the hydrolysis of ATP. Its expression is fundamental for cell viability due to its participation in processes of detoxification, metalation of other proteins and in response to oxidative stress. Their transmembrane location makes them a therapeutic target more accessible to drugs than cytoplasmic targets.

CtpG, a P<sub>IB</sub>-type ATPase, has been reported to be induced during *Mtb* infection in human macrophages under conditions of hypoxia, starvation and in the presence of toxic substances such as high concentrations of heavy metals (Cu<sup>2+</sup> -500 μM and Zn<sup>2+</sup> -500 μM) that affect the viability of *Mtb*. In addition CmtR, the *ctpG* transcriptional regulator, is Cd<sup>2+</sup> sensitive in *Mtb* H37Rv, suggesting that CtpG could be a pump responsible for the efflux of this toxic metal. For all of the

above, CtpG could be an interesting therapeutic target, so it becomes important to know many of its functional characteristics.

In the present work it was proposed to determine some characteristics of CtpG as the membrane ionic specificity of mycobacteria, and the transcriptional behavior in the presence of sublethal concentrations of heavy metals possibly carried by this enzyme. In addition, tools were developed for the production of polyclonal antibodies against CtpG.

Expression of recombinant CtpG was optimized using the pBAD A Myc His system in *E. coli* LMG194. The protein was expressed in the soluble fraction using 0.3% of L-arabinose and 8 hours of induction at 20 ° C. Likewise, most of the protein was detected in the insoluble fraction as inclusion bodies in all culture conditions analyzed.

It was found that the  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Pb}^{2+}$  ions induce the CtpG-mediated enzyme activity in the mycobacterial plasma membrane, with values of  $6.25 \pm 1429$ ,  $4.1266 \pm 0.914$ ,  $6.5705 \pm 1.694$  and  $6.2099 \pm 1.745$  U / mg protein, respectively. To approach the ionic specificity, tolerance tests were performed at toxic concentrations of heavy metals on *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 overexpressing CtpG. It was found that CtpG generates tolerance to  $\text{Cd}^{2+}$  and  $\text{Cu}^{2+}$  in whole mycobacterial cells. According to these results, the kinetic constants of the recombinant protein were determined using  $\text{Cd}^{2+}$  ( $V_{max}$ :  $0.856 \pm 0.01$  and  $K_m$ :  $0.108 \pm 0.007$ ) and  $\text{Cu}^{2+}$  ( $V_{max}$ :  $1.051 \pm 0.155$  and  $K_m$ :  $0.981 \pm 0.422$ ) as substrates. This allowed to appreciate that the  $\text{Cd}^{2+}$  ions, could be more efficiently transported by CtpG.

**Keywords:**

*Mycobacterium tuberculosis*, metal ion transport, P-type ATPases, CtpG, antigenic peptides.

# Contenido

	<u>Pág.</u>
<b>Resumen</b> .....	<b>XI</b>
<b>Lista de figuras</b> .....	<b>XVII</b>
<b>Lista de tablas</b> .....	<b>XIX</b>
<b>Lista de Símbolos y abreviaturas</b> .....	<b>20</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>22</b>
<b>Justificación</b> .....	<b>26</b>
<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>27</b>
1.1 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> : agente etiológico de la Tuberculosis .....	27
1.2 El Género <i>Mycobacterium</i> .....	27
1.3 Envoltura celular de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	28
1.3.1 Membrana .....	29
1.3.2 Pared.....	30
1.3.3 Cápsula.....	32
1.4 La infección tuberculosa y su tratamiento.....	32
1.4.1 La lesión tuberculosa o granuloma.....	36
1.4.2 Ambiente intrafagosomal soportado por <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	38
1.5 Transporte a través de la membrana de las micobacterias .....	40
1.6 ATPasas .....	42
1.6.1 ATPasas tipo P .....	44
1.6.2 Ciclo Catalítico de las ATPasas tipo P.....	49
1.6.3 ATPasas tipo P en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	50
1.6.4 ATPasas tipo P <sub>1B</sub> en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	53
1.7 CtpG durante la infección .....	54
<b>2. PREGUNTAS DE INVESTIGACIÓN</b> .....	<b>56</b>
<b>3. HIPÓTESIS EXPERIMENTAL</b> .....	<b>57</b>
<b>4. OBJETIVOS</b> .....	<b>58</b>
4.1 Objetivo general .....	58
4.2 Objetivos específicos .....	58
<b>5. MATERIALES Y MÉTODOS</b> .....	<b>59</b>
5.1 Componente bioinformático.....	60

5.1.1	Análisis <i>in silico</i> de CtpG.....	60
5.2	Componente experimental .....	62
5.2.1	Expresión de CtpG en <i>E. coli</i> y micobacteria .....	63
5.2.2	Análisis de transcripción del gen <i>ctpG</i> mediante PCR en tiempo real.....	65
5.2.3	Expresión heteróloga de CtpG en <i>E. coli</i> : Optimización de parámetros de sobreexpresión.....	66
5.2.4	Purificación parcial de CtpG.....	69
5.2.5	Expresión heteróloga de CtpG en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 .....	71
5.2.6	Ensayos de actividad ATPasa .....	71
5.2.7	Ensayos de viabilidad celular: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC).....	73
5.2.8	Optimización de parámetros cinéticos .....	73
5.2.9	Determinación de las constantes cinéticas .....	74
5.2.10	Síntesis de posibles péptidos con capacidad antigénica .....	74
5.2.11	Purificación y caracterización de los péptidos .....	75
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....</b>	<b>77</b>
6.1	Análisis <i>in silico</i> de CtpG .....	77
6.1.1	Topología de CtpG.....	78
6.1.2	Predicción de motivos funcionales de CtpG .....	80
6.1.3	Aproximación a la especificidad iónica de CtpG.....	82
6.1.4	Estructura secundaria y terciaria de CtpG.....	84
6.2	Componente experimental .....	88
6.2.1	Análisis de la expresión génica de <i>ctpG</i> .....	89
6.2.2	Expresión de CtpG recombinante en <i>E. coli</i> .....	90
6.2.3	CtpG se expresa en la fracción soluble de <i>E. coli</i> LMG194 .....	91
6.2.4	Optimización de la concentración de inductor .....	96
6.2.5	Optimización de la temperatura de inducción.....	96
6.2.6	Optimización del tiempo de inducción.....	99
6.2.7	Purificación parcial de CtpG .....	100
6.2.8	Expresión de CtpG recombinante en micobacteria .....	103
6.2.9	Ensayos de actividad ATPasa dependiente de metales pesados.....	103
6.2.10	Efecto de la expresión de CtpG en la tolerancia de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 frente a concentraciones tóxicas de metales pesados .....	105
6.2.11	Determinación de los parámetros cinéticos.....	108
6.2.12	Determinación de las constantes cinéticas .....	110
6.2.13	Diseño de péptidos antigénicos derivados de CtpG .....	114
6.2.14	Síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS).....	116
6.2.15	Síntesis y caracterización de péptidos antigénicos derivados de CtpG.....	118
<b>7.</b>	<b>CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS .....</b>	<b>125</b>
7.1	Conclusiones .....	125
7.2	Perspectivas.....	126
<b>A.</b>	<b>Anexo: Información de marcadores de peso molecular, vectores y recombinantes.....</b>	<b>127</b>
	<b>Referencias.....</b>	<b>133</b>

## Lista de figuras

	<u>Pág.</u>
Figura 1-1. Estructura de la envoltura celular de las micobacterias.....	30
Figura 1-2. Países principalmente afectados por la tuberculosis.....	33
Figura 1-3. El ciclo de vida de TB .....	36
Figura 1-4. Estructura del granuloma.....	38
Figura 1-5. Enfermedades asociadas con ATPasas.....	43
Figura 1-6. Tipos de ATPasas.....	44
Figura 1-7. Estructura terciaria de las ATPasas tipo P.....	46
Figura 1-8. Ciclo catalítico de las ATPasas tipo P.....	50
Figura 1-9. Segmentos transmembranales de ATPasas tipo P de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	52
Figura 1-10. Regulación transcripcional del operón <i>cmtR-Rv1993c-Rv1992c</i> por CmtR.....	55
Figura 5-1. Estrategia metodológica en el desarrollo de la presente investigación.....	59
Figura 5-2. Fundamento del ensayo de actividad ATPasa.....	73
Figura 6-1. Perfil de hidrofobicidad de CtpG .....	78
Figura 6-2. Predicción de segmentos transmembranales (TMS) de CtpG mediante el servidor CCTOP.....	79
Figura 6-3. Alineamiento múltiple de CtpG con ATPasas tipo P <sub>1B</sub> de <i>Mtb</i> .....	81
Figura 6-4. Predicción de la especificidad iónica de CtpG.....	83
Figura 6-5. Topología de membrana predicha para CtpG.....	84
Figura 6-6. Predicción de estructura secundaria de CtpG.....	85
Figura 6-7. Predicción de la estructura terciaria de CtpG.....	87
Figura 6-8. Modelo de la estructura terciaria de CtpG.....	88
Figura 6-9. Cuantificación de la expresión del gen <i>ctpG</i> de <i>Mtb</i> .....	90
Figura 6-10. Regulación del promotor <i>araBAD</i> por L-arabinosa.....	92
Figura 6-11. Transformación de células competentes de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) y LMG194 con los plásmidos pML06 y pBAD.....	94
Figura 6-12. Expresión de CtpG recombinante en <i>E. coli</i> BL2 (DE3) y LMG194.....	95
Figura 6-13. Optimización de la concentración de inductor para la expresión de CtpG recombinante en <i>E. coli</i> LMG194.....	97
Figura 6-14. Optimización de la temperatura de expresión de CtpG recombinante en <i>E. coli</i> LMG194 .....	98
Figura 6-15. Optimización de la tiempo de inducción de CtpG recombinante en <i>E. coli</i> LMG194.....	99

---

Figura 6-16. Optimización de la de expresión de CtpG recombinante en <i>E.coli</i> LMG194 .....	100
Figura 6-17. Purificación de CtpG recombinante desde vesículas de membrana .....	102
Figura 6-18. Purificación de CtpG recombinante desde cuerpos de inclusión... ..	102
Figura 6-19. Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados .....	104
Figura 6-20. Ensayos de viabilidad celular en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 sobreexpresando CtpG.....	106
Figura 6-21. Efecto de la concentración de Cu <sup>2+</sup> y Cd <sup>2+</sup> en la actividad ATPasa sobre vesículas de membrana enriquecidas con CtpG.. ..	112
Figura 6-22. Predicción de regiones antigénicas de CtpG .....	116
Figura 6-23. Síntesis de péptidos en fase sólida .....	117
Figura 6-24. Estrategia Fmoc/t-butil, síntesis en fase sólida .....	118
Figura 6-25. Síntesis de péptidos en fase solida (SPFS) .....	119
Figura 6-26. Caracterización del péptido 2256 .....	122
Figura 6-27. Caracterización del péptido 2257 .....	123
Figura 6-28. Caracterización del péptido 2258 .....	123
Figura 6-29. Caracterización del péptido 2259 .....	124
Figura 6-30. Caracterización del péptido 2260 .....	124
Figura A-1. Marcadores de peso molecular utilizados a lo largo del presente estudio .....	127
Figura A-2. Información del plásmido recombinante usado en este estudio para la expresión de CtpG en micobacteria (pML01) .....	128
Figura A-3. Información del plásmido recombinante usado en este estudio para la expresión de CtpG en <i>E. coli</i> (pML06) .....	129
Figura A-4. Secuenciación de pML06 con cebador directo.....	130
Figura A-5. Secuenciación de pML06 con cebador reverso .....	132

---

## Lista de tablas

	<u>Pág.</u>
Tabla 5-1. ATPasas tipo P <sub>IB</sub> de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> H37Rv.....	61
Tabla 5-2. Algunas de las ATPasas tipo P <sub>IB</sub> actualmente caracterizadas.....	61
Tabla 5-3. Lista de cepas bacterianas empleadas en este estudio..	63
Tabla 5-4. Lista de cebadores en el desarrollo de este trabajo.....	64
Tabla 5-5. Condiciones de cada una de las PCR realizadas en este estudio..	64
Tabla 5-6. Lavados de la resina Fmoc-Rink Amida.....	74
Tabla 6-1. Predicción de segmentos transmembranales (TMS) de CtpG .....	79
Tabla 6-2. Predicción de motivos funcionales de CtpG.....	82
Tabla 6-3. Actividad ATPasa de CtpG estimulada por metales pesados .....	104
Tabla 6-4. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) en <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	107
Tabla 6-5. Péptidos antigénicos derivados de CtpG. ....	118
Tabla 6-6. Purificación de los péptidos.....	120

## Lista de Símbolos y abreviaturas

<b>Abreviatura</b>	<b>Definición</b>
ABC*	Casete de unión a ATP
AEM*	Metales alcalinos y alcalinotérreos
AG	Arabinogalactano
Amp	Ampicilina
<i>Apr</i> *	Regulador fagosomal y de acidez
ATP	Adenosin Trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	Albumina de suero bovino
cDNA*	ADN de cadena complementaria
CDR	Región de complementariedad
CMI	Concentración mínima inhibitoria
Ctp*	Proteína transportadora de cationes
Da	Dalton
DAP	Ácido meso- diamino pimérico
DC	Dicroísmo circular
DMT	Dimicolato de trehalosa
DNA*	Ácido desoxirribonucleico
ESI*	Ionización por electrospray
Fab*	Sitio de unión a antígeno
Fc	Fracción cristalizable
FPM	Fuerza protón-motriz
HM*	Metales pesados
H37Ra	Cepa de referencia atenuada H37Ra
H37Rv	Cepa de referencia virulenta H37Rv
IL	Interleuquina
INF- $\gamma$	Interferón gamma
IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-tiogalactopiranosido
$K_{cat}$	Constante catalítica
kDa	Kilodalton
$K_m$	Constante de <i>Michaelis- Menten</i>
Km	Kanamicina
LAG	Lipoarabinogalactano
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Medio Luria-Bertani
LM	Lipomanano
mAGP	Complejo micolilarabino-galactano-peptidoglicano
MAMPs*	Patrones moleculares asociados a microorganismos
MATE*	Familia de multifármacos y extrusión de compuestos tóxicos
MBD	Dominio de unión a metal citoplasmático
MDR*	Multifármacoresistente
ME	Membrana externa

MHC*	Complejo mayor de histocompatibilidad
MI	Membrana interna
min	Minuto
MMT	Monomicolato de trehalosa
MP	Marcador de peso molecular
MS*	Espectrometría de masas
MTBC*	<i>Mycobacterium tuberculosis</i> complex
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
NAG	N-acetil glucosamina
NAM	Ácido N-acetil murámico
NAAT*	Test de amplificación de ácidos nucleicos
NF- $\kappa$ B	Factor nuclear kappa-beta
NRAMP*	Proteínas de macrófago asociadas a resistencia natural
OADC	Albumina de suero bovino, dextrosa, catalasa y ácido oleico
OD	Densidad óptica
pb	Pares de bases
PBS	Buffer fosfato salino
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB*	Protein Data Bank
PG	Peptidoglicano
pI	Punto isoelectrico
Pi	Fosfato inorgánico
PI*	Fosfatidilinositol
PIM*	Fosfatidilinositol manósido
PMCA*	Calcio ATPasa de membrana plasmática
RNA*	Ácido ribonucleico
RND*	Superfamilia de nodulación-división-resistencia
RNS	Especies de estrés nitrosativo
ROS	Especies de estrés oxidativo
rpm	Revoluciones por minuto
RT-qPCR	PCR cuantitativa en tiempo real
SERCA*	Retículo sarco-endoplásmico
SEM*	Error estándar de la media
SMR*:	Familia de resistencia a drogas de pequeño tamaño molecular
SDS*	Dodecil sulfato de sodio
SDS-PAGE*	Electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS
SPFS	Síntesis de péptidos en fase solida
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multifármacoresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente fármaco resistente
Th	Células T ayudadoras
TLR*	Toll Like Receptor
Tm	Temperatura de fusión
TM	Transmembrana
TMS*	Segmento transmembranal
TNF- $\alpha$ *	Factor de necrosis tumoral alfa
$V_{m\acute{a}x}$	Velocidad máxima
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
U	Unidad de actividad enzimática
UFC	Unidades formadoras de colonia
XDR*	Extremadamente fármaco resistente

\* Las siglas provienen del inglés

## Introducción

La Tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa ocasionada por bacilos pertenecientes al complejo tuberculoso (MTBC) [1]. La TB se transmite por vía aérea desde un individuo infectado con TB activa a un huésped sano. El bacilo se aloja principalmente en los pulmones generando en condiciones particulares, TB pulmonar. En menor medida se puede alojar en órganos o tejidos diferentes al pulmón, lo que se denomina TB extrapulmonar [2].

Hacia finales del siglo XX se consideraba que la TB había sido erradicada, pero en la década de los 90's la Organización Mundial de la Salud declaró la TB como un problema de salud pública, debido a su reemergencia asociada a la expansión del virus del VIH y a la aparición de cepas resistentes a los fármacos usados en el tratamiento [1].

Se calcula que alrededor de un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) [3,4], de ellos, 5-15% desarrollará TB activa en algún momento de su vida, mientras que el restante será un reservorio del bacilo tuberculoso al presentar la infección de una manera latente [2,3,5]. En Colombia, se han confirmado 6454 casos de TB, de los que 5739 (88,9%) son casos nuevos y 715 (11,1%) habían sido previamente tratados [6]. El 82,6% de los enfermos estuvieron afectados con TB pulmonar y el 17,4% con TB extra-pulmonar, de los que 471 casos presentaron TB pleural [6]. El departamento de Amazonas muestra la mayor incidencia de TB con 30,8 casos por cada 100000 habitantes [6].

En el diagnóstico de la TB se emplean diversas técnicas de análisis como (i) la microscopía combinada con la tinción diferencial de Ziehl Neelsen, que permite observar los bacilos ácido-alcohol resistentes de *Mtb*; (ii) el cultivo de la micobacteria en medio líquido y sólido, que presenta limitaciones debido al crecimiento lento del bacilo, la necesidad de su mantenimiento en laboratorios de bioseguridad, las altas tasas de contaminación y su costo [7]; (iii) el test de tuberculina, el test de liberación de INF- $\gamma$  y el test de amplificación de ácidos nucleicos (NAAT),

los que también presentan limitaciones de especificidad, la dificultad de distinguir entre la TB activa y latente, y su alto costo [4,7].

La única vacuna activa actualmente contra la TB es el bacilo de Calmette y Guérin, o vacuna BCG, una cepa de *M. bovis* atenuada. Esta vacuna ha mostrado grandes limitaciones, como su baja protección en adultos y en los casos de TB extremadamente y multifarmacoresistente (TB-MDR y TB-XDR respectivamente) [7,8]. BCG sigue siendo la única vacuna contra la TB, debido a su función protectora durante la infancia [2].

En el tratamiento de la TB se usan inicialmente fármacos de primera línea como isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol. Estos medicamentos se utilizan en pacientes sin complicaciones clínicas, en los que un tratamiento completo asegura una tasa de curación superior al 95% [5,9]. Sin embargo, en algunos casos el tratamiento con fármacos de primera línea no es totalmente efectivo, como sucede en las cepas MDR (resistentes al menos a isoniazida y rifampicina) [7]. Los fármacos de segunda línea se medican en casos de MDR, como alternativa al tratamiento de primera línea. Entre ellos se puede mencionar etionamida, protionamida, cicloserina, ácido paraminosalicílico, tioacetazona y fluoroquinolonas, los que tienen baja potencia en comparación con los fármacos de primera línea, su toxicidad es mucho mayor y deben ser usados durante lapsos extensos de tiempo [7,9].

El desarrollo de una posible vacuna que supere todas las deficiencias de la vacuna BCG y el desarrollo de nuevos antituberculosos, son una prioridad para combatir la TB activa, latente y la coinfección TB-VIH [10]. Para conseguir este objetivo, es indispensable profundizar en el estudio de los mecanismos moleculares de infección y de defensa de *Mtb*; de esta forma, se podrían identificar nuevos blancos terapéuticos para así encontrar formas alternativas de control.

Una de las estrategias antimicrobianas utilizadas por los macrófagos cuando han fagocitado a *Mtb* es aumentar la concentración de metales en el fagosoma como hierro, cobre, zinc, potasio, calcio y manganeso [11,12], que en concentraciones viables son nutrientes para la bacteria, pero en concentraciones elevadas resultan tóxicas. Por esta razón, *Mtb* en condiciones de infección utiliza diversos mecanismos de defensa, como la expresión de enzimas de membrana que permiten el eflujo de iones metálicos para así mantener la homeostasis iónica.

*Mtb* codifica 28 genes encargados del transporte de iones metálicos [13], de estos, 12 son genes que expresan ATPasas tipo P, una cantidad inusual en comparación con otros patógenos intracelulares

[14]. Las ATPasas tipo P son proteínas transportadoras de metales pesados, alcalinos y alcalinotérreos a través de la membrana plasmática. El transporte de estas enzimas se realiza en contra del gradiente de concentración utilizando la energía obtenida por la hidrólisis de ATP.

Las ATPasas tipo P favorecen la homeostasis iónica, proveen sustratos para las metaloenzimas y median la señalización celular ( $\text{Ca}^{2+}$  ATPasas), entre otras funciones importantes [15]. Por lo tanto, son transportadores fundamentales en la viabilidad del bacilo tuberculoso. Específicamente, estas enzimas se sobreexpresan en condiciones hostiles tales como: hipoxia, estrés oxidativo, deprivación de nutrientes, tratamiento con sustancias nocivas y latencia [10,16].

El grupo Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias (BBMM) de la Universidad Nacional de Colombia, ha trabajado en los últimos años en la caracterización de estas enzimas. Se han realizado estudios que han permitido elucidar su posible especificidad iónica, y las condiciones ambientales y biológicas que conllevan a su activación, llegándose a considerar como posibles dianas terapéuticas de *Mtb* [10,16]. Hasta el momento el grupo ha incursionado en el estudio de CtpA [17], CtpE, CtpF, CtpH [18] de *Mtb*, y Pma1 [19] el homólogo de CtpF en *M. smegmatis* [10,16]. Adicionalmente está en proceso de caracterización el transportador CtpB [20].

Se ha encontrado que CtpG, CtpV y CtpC, ATPasas tipo P de *Mtb*, son fundamentales en los mecanismos de resistencia y evasión del bacilo tuberculoso en los macrófagos humanos [10,16]. Específicamente, el gen *ctpG* (*Rv1992c*) se induce en condiciones de estrés frente a sustancias tóxicas [10], en presencia de cationes de metales como de  $\text{Zn}^{2+}$  (500 $\mu\text{M}$ ) [21] y concentraciones letales de  $\text{Cu}^{2+}$  (500 $\mu\text{M}$ ); bajo esta última condición se induce 20 veces, y 60 veces en ausencia de la  $\text{Cu}^{2+}$ -ATPasa CtpV en *Mtb* H37Rv [22]. Adicionalmente, *ctpG* tiene un regulador transcripcional, CmtR, que se une cooperativamente corriente arriba al sitio de transcripción del operón *cmtR/Rv1993c/Rv1992c*. CmtR sensa  $\text{Cd}^{2+}$  y en presencia de este metal tóxico, se disocia el complejo represor-DNA, transcribiéndose el operón donde *ctpG* está ubicado, razón por lo cual se considera que la ATPasa puede estar asociada al eflujo de cadmio [23,24].

En la presente investigación se estimó el comportamiento transcripcional de *ctpG* y la actividad de la enzima en presencia de concentraciones subletales de metales que pueden ser sustratos de esta enzima. Se analizaron las condiciones de expresión de CtpG recombinante en *E. coli*. También se realizó una aproximación a la especificidad iónica y la implicación de CtpG en la tolerancia a concentraciones subletales de metales pesados mediante ensayos de actividad enzimática y viabilidad celular, respectivamente. Finalmente se predijeron regiones antigénicas de CtpG

mediante servidores bioinformáticos, así como la síntesis de péptidos antigénicos derivados de esta proteína, para producir anticuerpos policlonales que permitan reconocer el nivel de expresión de la proteína nativa.

Los resultados obtenidos podrían ser información valiosa para evaluar el potencial de CtpG en el desarrollo de nuevos compuestos antituberculosos.

## Justificación

La TB es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo. En el 2015 se reportaron 10,4 millones de personas infectadas con TB, de las cuales 1,8 murieron por esta enfermedad, de las que 0,4 millones presentaron co-infección con VIH [2]. Se registraron 480.000 casos de TB-MDR y 7579 casos de TB-XDR [2].

Encontrar dianas terapéuticas efectivas que permitan inhibir el crecimiento de poblaciones activas y latentes de *Mtb*, es actualmente un desafío para el control de la TB. Los nuevos compuestos antituberculosos deben mostrar mecanismos de acción diferentes y con el potencial de disminuir la dosis, frecuencia y duración del tratamiento, además de tener la capacidad de co-administrarse en terapia antirretroviral contra VIH [9,10,16,25]. Uno de los factores asociados a la resistencia de fármacos en *Mtb* es la reducida permeabilidad de la envoltura, debido al alto contenido de lípidos [26–28], por lo tanto son de interés las proteínas asociadas a la membrana como dianas terapéuticas, porque son más accesibles desde el espacio periplásmico respecto a otras dianas [4,29], como puede ser el caso de CtpG.

# 1. Marco Teórico

## 1.1. *Mycobacterium tuberculosis*: Agente etiológico de la Tuberculosis

*Mtb* ha acompañado a los humanos a lo largo de la civilización. Se tienen referencias de infección tuberculosa desde el periodo neolítico en Europa (8000 años a. C) y el antiguo Egipto (1000 a. C) causando más muertes que otras bacterias patógenas [30–32].

*Mtb* es un bacilo aerobio facultativo, ácido-resistente, no esporulado e inmóvil, de forma tubular, recto o ligeramente curvo, con un tamaño de 1-4 micrómetros de longitud y 0.3-0.6 micrómetros de ancho. Su duplicación puede tardar 12 a 24 horas en condiciones óptimas (a 37°C y pH neutro) y el tiempo de formación de colonias visibles se lleva a cabo de 3 a 6 semanas de cultivo *in vitro*, formando colonias de morfología rugosa en medio sólido [27,31–35]. *Mtb* es sensible al calor, la luz solar y ultravioleta, no obstante es resistente al frío, congelación y desecación [33].

## 1.2. El Género *Mycobacterium*

Las micobacterias, como se conoce a las bacterias del género *Mycobacterium*, son un grupo de eubacterias clasificadas como gram-indeterminadas, que junto a otros géneros como *Corynebacterium*, *Nocardia* y *Rhodococcus* [33] pertenecen al orden actinomycetales. Las micobacterias tienen un alto contenido de guanina y citosina (62-70%) y presentan ácido-alcohol resistencia frente a la prueba de Ziehl Neelsen debido a la elevada concentración de ácidos micólicos en su envoltura celular [13,36].

En general las micobacterias se clasifican de acuerdo a tres parámetros: (i) velocidad de crecimiento en medio sólido, (ii) pigmentación y (iii) virulencia [37]. De acuerdo a la velocidad de crecimiento, existen micobacterias de crecimiento rápido (cerca de 3 días para formar colonias), como *M. smegmatis*, *M. chelonae* y *M. parafortuitum*; y micobacterias de crecimiento lento (2-3 semanas para formar colonias), que incluye especies como *M. avium*, *M. bovis*, *M. kansasii*, entre otras. De acuerdo a la formación de color, cuando las micobacterias forman pigmentos carotenoides en

exposición a la luz, se conocen como fotocromógenas, un ejemplo es *M. kansasii*; si no necesitan luz para generar pigmentos se denominan escotocromógenas como *M. gordonae* y si no forman pigmentos se denominan no cromógenas como *M. fortuitum* [38]. En relación con la virulencia hay especies patógenas causantes de enfermedades en seres vivos como *Mtb*, *M. leprae* y *M. avium*, y especies no patógenas o ambientales que normalmente no ocasionan enfermedad como *M. smegmatis* y *M. aurum* [26]. En conclusión, *Mtb* se clasifica como una micobacteria de crecimiento lento, no cromógena y patógena [36,37].

Las especies de bacterias que producen TB en animales y humanos se agrupan dentro del complejo MTBC o complejo de *Mtb* (Figura 1). MTBC comprende las especies *M. bovis*, el agente etiológico de la enfermedad en bovinos, *M. microti* en roedores, *M. caprae* en cabras [39], *M. pinnipedi* en focas y los causantes de TB en seres humanos como *M. canetti*, *Mtb* y *M. africanum* [40]. Se incluye una especie proveniente de *M. bovis*, el bacilo de Calmette y Guérin, que por pases sucesivos en medio de cultivo ha perdido su virulencia, la actualmente conocida vacuna BCG [25,40,41].

La taxonomía del complejo MTBC y relaciones filogenéticas han sido estudiadas a partir de una zona hipervariable de 500 pb, presente en la secuencia 16S del rRNA, que se encuentra en todas las especies [27,42]. El MTBC muestra un porcentaje de identidad del 99% en su genoma, por lo que difieren en algunas características fenotípicas particulares, entre ellas la patología, inmunoreactividad y la preferencia por el hospedero [41,43,44].

Una de las estrategias de determinación molecular de las especies del complejo MTBC son los ensayos del NAAT, usados para la determinación de la secuencia de inserción *IS6110* [44–46]. Este elemento genético móvil, se transpone a lo largo del cromosoma lo que genera un polimorfismo relativo entre cepas, y de esta forma es una herramienta útil como diana para la detección del MTBC mediante la técnica de PCR [45,46]. Sin embargo, se ha encontrado que esta secuencia posee una rápida tasa de variación lo que trae como consecuencia un alto riesgo de divergencia genética [47].

### **1.3. Envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis***

La envoltura celular de *Mtb* está conformada por 3 estructuras de alta complejidad: la membrana citoplasmática, la pared celular y la cápsula, que proveen una barrera eficiente frente a compuestos

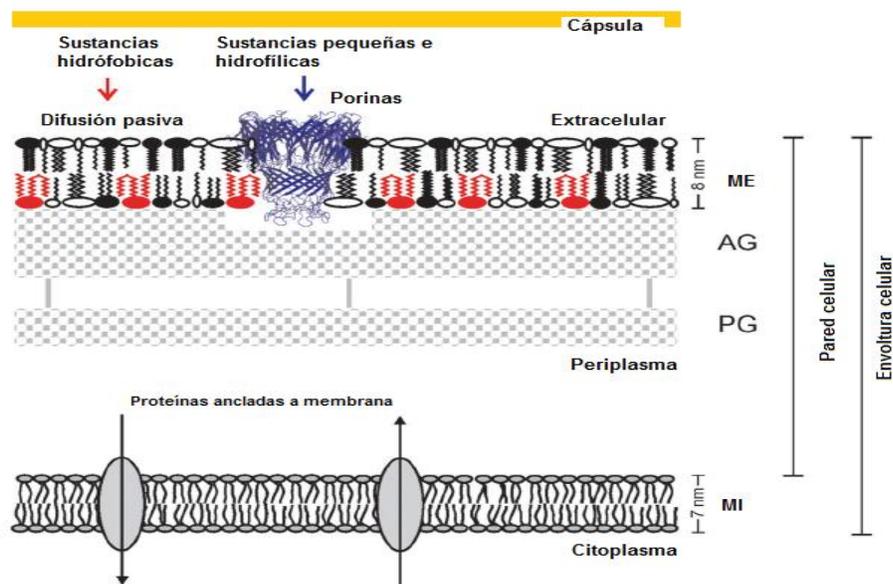
antimicrobianos [13,28,48]. En este sentido, la envoltura celular tiene una función fundamental en la fisiología y virulencia de la bacteria [49] (Ver figura 1-1).

### 1.3.1. Membrana

La membrana plasmática de *Mtb* es asimétrica y es similar a la de otras bacterias. El componente polar de sus fosfolípidos está generalmente conformado por glicerol, etanolamina o inositol, y la zona apolar de los mismos está constituida por ácidos grasos de cadena larga. En consecuencia, los fosfolípidos más comunes de las micobacterias son fosfoglicerol, difosfoglicerol, fosfatidiletanolamina, fosfatidilinositol (PI) y fosfatidilinositolmanósidos (PIM), estos últimos están exclusivamente en la membrana plasmática de la línea de actinomicetos [27]. Otros componentes asociados a la membrana son los glicosilfosfoliprenoles que pueden proteger la célula del daño proteolítico y pueden estar implicados en la síntesis de la pared celular [27].

En la membrana de las micobacterias también se encuentran proteínas integrales encargadas del transporte de sustancias. Puntualmente hay 4 familias de proteínas asociadas a la homeóstasis de metales esenciales y tóxicos, tales como: la familia RND (por sus siglas en inglés *resistance-nodulation-cell division*) implicadas en el eflujo de sustancias, la familia de ATPasas tipo ABC (por sus siglas en inglés *ATP binding cassette*), la familia de facilitadores de la difusión de cationes, CDF y las ATPasas tipo P encargadas del transporte de cationes metálicos [14,50].

A la membrana de *Mtb* se encuentran anclados algunos glicolípidos característicos del género *Mycobacterium* como el lipoarabinomanano (LAM) y lipomanano (LM). LAM es una extensión multiglicosilada que se une a la posición 6 del inositol de PIM [51,52]; este glicolípido posee moléculas de D-manosa fosfato ( $\alpha$ -1,6) que son reconocidas en los macrófagos por el receptor de manosa. Teniendo en cuenta que LAM de *Mtb* posee moléculas de manosa en los extremos (conocidos como 'caps'), se le denomina ManLAM [27,49]. Adicionalmente LAM puede contener moléculas de glicerol, inositol y fosfato, en unión a arabinosa, manosa, lactato, succinato, palmitato y tuberculestereato [27]. Por otra parte LM también contiene manosa en su estructura, reconocida por la membrana de las células a través de los receptores Toll, activando vías de señalización en la respuesta del hospedero [53].



**Figura 1-1. Estructura de la envoltura celular de las micobacterias.** La envoltura celular está conformada por tres estructuras complejas: la membrana plasmática (MI), constituida por fosfolípidos; la pared celular de peptidoglicano (PG), que se enlaza covalentemente a arabinogalactano (AG), que en los extremos distales se une a ácidos micólicos formando una pseudo-bicapa lipídica externa (ME). Finalmente se encuentra la cápsula, para especies patógenas, la cual interactúa directamente con el hospedero. *Tomado y editado de Ref[13].*

### 1.3.2. Pared

La pared limita y regula el paso de sustancias e interacciones de la célula con el ambiente exterior [9,36], sin embargo, se conoce que la composición particular de la pared de las micobacterias (alto contenido de lípidos y carbohidratos [28,49,54]), incrementa su resistencia frente algunos antibióticos por su hidrofobicidad [9,13].

La pared de las micobacterias está constituida principalmente por el complejo micoliarabinogalactanopeptidoglicano (mAGP) y LAM [13]. El complejo mAGP está formado por tres macromoléculas enlazadas covalentemente: peptidoglicano (PG), arabinogalactano (AG) y ácidos micólicos [28,51]. El PG está compuesto por moléculas alternadas de ácido N-acetil murámico (NAM) y N-acetil glucosamina (NAG) enlazados covalentemente por enlaces  $\beta$ -1,4, donde el NAM está unido al tetra péptido L-Alanina-D-isoglutamil-ácido meso diaminopimélico-D-Alanina [36,53]. El PG se enlaza covalentemente mediante un enlace fosfodiéster (enlace del disacárido de L-ramnosa [1 $\rightarrow$ 3] a N-acetilglucosamina fosfato) a la posición 6 del AG (arabinosa en forma de furanosa enlazada a D-galactano lineal) de la estructura de micolilarabinogalactano (mAG) formando la estructura mAGP [51].

En la parte externa de la estructura mAGP se ubican de forma perpendicular los ácidos micólicos, que son ácidos grasos de cadena larga (alrededor de 60 a 90 átomos de carbono) alquilados en el carbono alfa e hidroxilados en el carbono beta, que además pueden tener varios dobles enlaces y/o anillos de ciclopropano [27]. Hay dos familias de ácidos micólicos:  $\alpha$ -micolatos y micolatos oxigenados, siendo los grupos funcionales oxigenados la diferencia entre ellos. *Mtb* produce tres tipos de ácidos micólicos: los  $\alpha$ -micolatos, cetomicolatos y metoximicolatos [51]; además *Mtb* puede modificar sus ácidos por ciclopropanación, en tanto que especies saprófitas de crecimiento rápido como *M. smegmatis* no pueden hacerlo [51]. Se calcula que aproximadamente el 10% del peso seco de las células de micobacteria corresponde a los ácidos micólicos [35]. De manera funcional los ácidos micólicos tienen la propiedad de disminuir la permeabilidad de la pared, restringiendo el paso de sustancias, entre ellas antibióticos, por lo que están relacionados con mecanismos de defensa del bacilo tuberculoso [30,34,36].

En la parte superior de la pared se encuentran lípidos asociados no covalentemente con el complejo mAGP, conocidos como lípidos libres. Entre ellos, uno de los más conocidos es el 6,6'- dimicolato de trehalosa (DMT), llamado 'factor cord', un lípido asociado a la patogénesis de *Mtb*. DMT es sintetizado por el antígeno 85 (Ag85), una familia de micolil transferasas que participan en la micolización de AG a partir de dos moléculas de monomicolato de trehalosa (MMT) [55].

En la misma zona también se encuentran ubicadas una serie de moléculas interpuestas, tales como proteínas de la pared, PIM, LM, LAM y lípidos que contienen tiocerol (expuesto en la superficie), formando una región altamente hidrofóbica que constituye una especie de segunda bicapa lipídica [51,53].

Cuando la pared de las micobacterias se extrae con solventes orgánicos, se obtiene una gran cantidad de componentes lipídicos; sin embargo, el complejo mAGP permanece como un residuo sólido, lo que sugiere que los componentes solubles como los lípidos, proteínas y glicolípidos participan como moléculas efectoras y en vías de señalización, mientras que el complejo mAGP es fundamental para la estructura y viabilidad del bacilo tuberculoso [53]. Una afectación en la biosíntesis de ácidos micólicos repercute en la permeabilidad de la pared y la virulencia. Esto remarca la importancia de la integridad de la pared celular en la supervivencia intracelular de *Mtb* [13].

### 1.3.3. Cápsula

La cápsula es la capa más externa de la envoltura micobacteriana, cuya función principal en muchas bacterias es mantener la célula en un estado hidratado con fines protectivos [56]. Entre las micobacterias sólo especies patógenas como *Mtb* y *M. avium* desarrollan cápsula, mientras que especies no patógenas como *M. smegmatis* y *M. aurum* no la generan dentro de su envoltura [26]. En *Mtb* los componentes de la pared y la cápsula son los que principalmente contribuyen a la resistencia antibiótica [57].

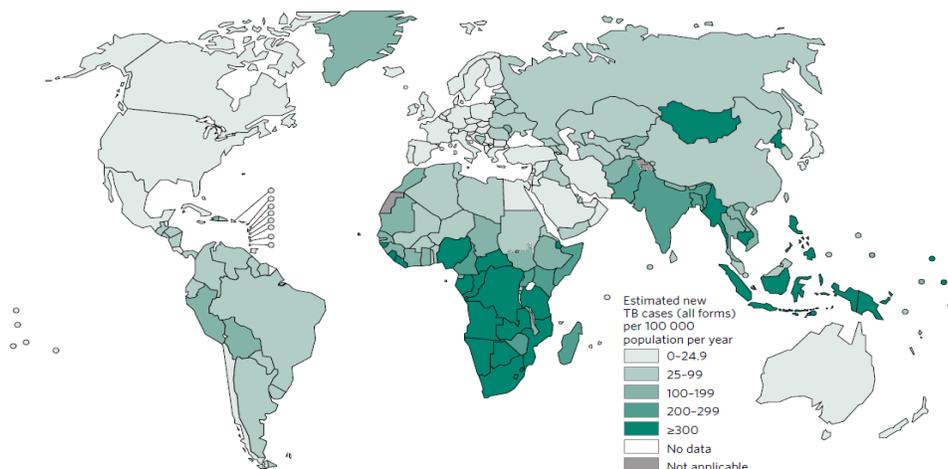
La cápsula está conformada por ácidos micólicos, proteínas, glicolípidos y polisacáridos tales como  $\alpha$ -1,4 glucano, D-arabinomanano y D-manano encontrados en el exterior celular [26,27]. El glucano es el constituyente mayoritario de los polisacáridos de la cápsula; el que posee una masa molecular de 100 kDa y está formado de 5 ó 6 unidades repetitivas de 4- $\alpha$ -D-glucosil sustituidos en la posición 6 con residuos mono o diglucosil [26].

El arabinomanano de la cápsula tiene una cadena de manano compuesta de unidades de 6- $\alpha$ -D-manosil sustituidas en el centro con unidades de  $\alpha$ -D-manosil. El manano es semejante al encontrado en LAM en la pared, con una masa aproximada de 4 kDa. Las cadenas de LAM capsular presentan en los extremos no reductores unidades de oligomanósidos [26].

## 1.4. La infección tuberculosa y su tratamiento

Al comenzar el siglo XXI, la TB, SIDA y malaria se reconocieron como las 3 enfermedades infecciosas asociadas a la pobreza, además de causar la mayor cantidad de muertes por agentes infecciosos en todo el mundo. Con el descubrimiento del bacilo tuberculoso por Robert Koch en 1882, nacieron las estrategias de higiene, prevención, detección de pacientes infectados y tratamiento en los establecimientos sanitarios para prevenir y curar la TB. A partir de ese momento, la lucha organizada contra la TB permitió disminuir considerablemente a finales del siglo XIX y principios del siglo XX el número de muertes por TB en los países industrializados. Lastimosamente, a finales del siglo anterior cuando hubo una aparente disminución del número de casos, empezaron a aparecer cepas de *Mtb* con resistencia a los fármacos antituberculosos más usados del momento. Adicional a esto, la co-infección con VIH conllevó a agudizar la situación que hoy afecta muchos países en todo el mundo (Figura 1-2) [45].

La vacuna BCG ha presentado relativa eficacia contra los tipos más graves de TB: meníngea y diseminada; sin embargo, hoy se conoce que esta vacuna solo ofrece protección durante la infancia. Además la vacuna BCG muestra graves limitaciones frente a cepas multi-fármaco resistentes y extremadamente fármaco resistentes (MDR y XDR) [9,45].



**Figura 1-2. Países principalmente afectados por la tuberculosis.** Los países que se muestran en verde, presentan mayor incidencia de TB. Tomado de Ref [2].

La transmisión de la infección tuberculosa se da por vía aérea; la respuesta inmune innata conlleva a fagocitar el bacilo por macrófagos alveolares y a reclutar otras células fagocíticas como neutrófilos y células dendríticas [58–60]. Estas últimas ayudan a presentar antígenos micobacterianos (lípidos y algunos péptidos) a linfocitos T CD4+, lo que implica el desarrollo de una respuesta adaptativa [60]. La interacción hospedero-patógeno conduce a la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias (INF- $\gamma$ , TFN- $\alpha$  e IL-12) que inducen reclutamiento celular en el sitio de infección, ocasionando proliferación y acumulación de macrófagos, neutrófilos, linfocitos T y fibroblastos, formando una conglomerado celular que recibe el nombre de tubérculo o granuloma (Figura 1-3) [59,61].

La resolución de la enfermedad sucede exitosamente en un 95% de la población infectada que accede al tratamiento quimioterapéutico completo [9]. Este se fundamenta principalmente en la inhibición de moléculas clave para la supervivencia del bacilo tuberculoso, y se realiza inicialmente con fármacos de primera línea: isoniazida, etambutol, rifampicina, pirazinamida y estreptomina; cepas de TB-MDR son resistentes al menos a isoniazida y rifampicina [5]. Los fármacos de segunda línea son una alternativa al tratamiento de la TB, cuando no son efectivos los de primera línea, los que incluyen la kanamicina/ amicacina, capreomicina, etionamida, cicloserina, ácido para-aminosalicílico, ofloxacina y fluoroquinolonas [9,25,45]; cepas de TB-XDR además de ser

resistentes a isoniazida y rifampicina, son resistentes a una fluoroquinolona y a kanamicina, amicacina y capreomicina [5]. Entre los fármacos que actualmente se han desarrollado se encuentran las diarilquinolinas y benzotiazinas, cuyas dianas son proteínas integrales de membrana involucradas en la síntesis de ATP y arabinano de la pared celular respectivamente, lo que afecta la viabilidad celular [31]. Las dificultades presentadas por el tratamiento con fármacos de primera línea es que su acción es sobre bacilos metabólicamente activos, por lo que no pueden eliminar el bacilo tuberculoso en estado de quiescencia, a excepción de rifampicina y pirazinamida. Otro limitante es su alto grado de toxicidad, por ejemplo el etambutol es sustituido por estreptomina, ya que este fármaco puede generar problemas de agudeza visual en niños [9,31].

El progreso de la infección puede tomar dos rutas, (i) desarrollo de la infección latente y (ii) desarrollo de la enfermedad activa- reactivación

(i) En el desarrollo de la infección latente, el hospedero no tiene manifestaciones clínicas de la enfermedad activa, pero presenta sensibilización inmune a proteínas micobacterianas, lo que puede dar falsos positivos en individuos inmunizados con vacuna BCG durante la prueba de tuberculina ó PPD [4]. Esta consiste en determinar si ha habido sensibilización de linfocitos T de memoria, por el reconocimiento de antígenos de *Mtb*.

*Mtb* posee la capacidad de entrar en estado de quiescencia, en el cual la micobacteria muestra una actividad metabólica limitada, dificultando de ésta manera la acción de los medicamentos antituberculosos, cuyo mecanismo está dirigido a actuar en una fase replicativa y un estado metabólico diferente al mostrado durante la quiescencia [9]. Algunos estudios en modelo murino y primates no humanos, evidencian que el bacilo tuberculoso no es erradicado, pero se atenúa su proliferación al ser confinado por fagocitos, seguido de la formación del granuloma [58,59,62]. En esta estructura algunas subpoblaciones pueden replicarse progresivamente y adicionar mutaciones, evidenciándose por algunos síntomas como fiebre y erupciones cutáneas, conocidas como eritemas nodosos [59], sugiriendo que la latencia no es un estado estático, sino más bien un moderación del sistema inmune frente al bacilo tuberculoso [59].

*Mtb* puede también contribuir con dicho equilibrio inmunológico durante la latencia, pues en condiciones de hipoxia y presencia de sustancias tóxicas comunes del ambiente intrafagosomal (CO, NO<sub>2</sub> y pH bajo), se expresa un regulón bacteriano controlado por el sistema de regulación denominado DosR-DosS, el que permite cada uno de los siguientes fenómenos: activación de vías

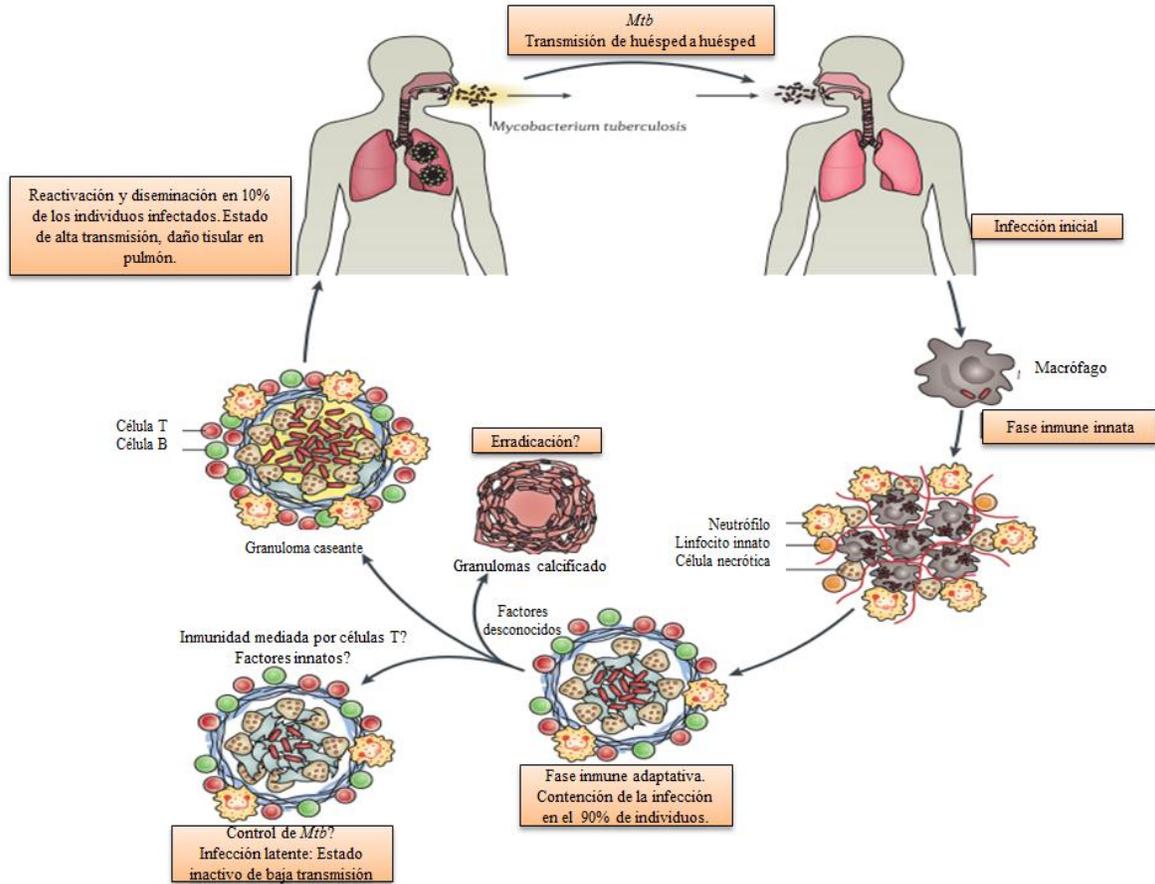
alternas de recursos energéticos (lípidos principalmente), la expresión de genes asociados al aprovechamiento energético (como los que codifican isocitratos liasas), el mantenimiento del balance redox y los niveles adecuados de ATP [4,59,63]. Además, *Mtb* también codifica cinco proteínas del tipo Rpf, que al ser secretadas le permiten reactivarse a partir del estado latente [59].

(ii) El desarrollo de la enfermedad activa presenta síntomas bien establecidos: fiebre, fatiga, pérdida de apetito y de peso, y cuando la enfermedad es avanzada se produce tos persistente y con sangre (Hemoptisis) [64]. Los síntomas entre algunos individuos afectados puede variar y generar más efectos adversos que en otros, especialmente las personas que presentan TB pulmonar o cavitaria, las que son mucho más infecciosas. La TB cavitaria es producto del grave daño tisular, seguido por formación de espacios macroscópicos que contienen millones de bacilos tuberculosos, que por vía aérea pueden ser expectorados y transmitirse fácilmente a un individuo sano [59]. Los bacilos que se replican en cavidades pulmonares lo hacen en condiciones aeróbicas, los que viven dentro de macrófagos sobreviven en condiciones microaerófilas y aquellos que subsisten dentro de granuloma se replican muy ocasionalmente en condiciones de hipoxia [4,9,59].

*Mtb* cuenta con los mecanismos para modular la maduración del fagosoma y la apoptosis en el hospedero [58], en consecuencia, puede sobrevivir a la respuesta inmune innata iniciada por el mismo. Entre ellos, las células fagocíticas reconocen estructuras específicas de *Mtb*, por ejemplo, los receptores tipo toll TLR (*del inglés Toll-like receptors*). TLR2 reconoce lípidos de la pared celular como PIM y LAM. Así mismo TLR9 detecta ADN micobacteriano y junto con TLR2 inducen el reclutamiento de fagocitos, activación de macrófagos y células dendríticas, secreción de citoquinas y quimioquinas, y expresión de receptores de adhesión celular por parte de las células infectadas [59]. TLR6 reconoce el complejo mAGP y por vía MyD88 induce el factor nuclear kappa- beta ( $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ) [33], estimulando la producción de citoquinas pro inflamatorias tales como IL-12 y TNF-  $\alpha$  [65]. El receptor de lectina tipo C que incluye al receptor de manosa, también reconoce las moléculas de manosa en el LAM de la envoltura celular de *Mtb* activando vías de señalización [53].

La reactivación de la TB puede ocurrir después de años de infección latente, lo que está asociado generalmente a la disminución o afectación de linfocitos T  $\text{CD4}^+$ , como es el caso de las inmunodeficiencias ocasionadas por VIH. La neutralización del factor de necrosis tumoral (TNF), en el tratamiento de algunas enfermedades inflamatorias, también conlleva a la reactivación de la TB debido a su función de proliferación y activación de macrófagos [4,59].

Las condiciones ambientales y genéticas también favorecen la reactivación de la TB; las más comunes incluyen: afectación por diabetes mellitus, bajo peso corporal y/o malnutrición, recibir tratamiento con glucocorticoides, quimioterapia contra cáncer y la edad avanzada (son más susceptibles de infección los niños y los ancianos), así mismo presentan mayor susceptibilidad aquellas personas afectadas con cepas resistentes TB-MDR y TB-XDR [1,4,59].



**Figura 1-3. El ciclo de vida de TB.** El ciclo de vida de TB inicia por la inhalación del bacilo tuberculoso, el que se puede albergar en los alvéolos pulmonares constituyendo lo que se conoce como infección primaria. Si el sistema inmune logra erradicar la micobacteria, la persona queda libre de la enfermedad, si no, se genera un equilibrio inmunológico, en el que la bacteria queda en un estado de latencia, con mínima replicación celular; si el sistema inmune recae, el bacilo se reactiva, generando la enfermedad y una alta tasa de transmisión, que en su desarrollo conlleva a un grave daño tisular. Tomado y adaptado de Ref [59,60].

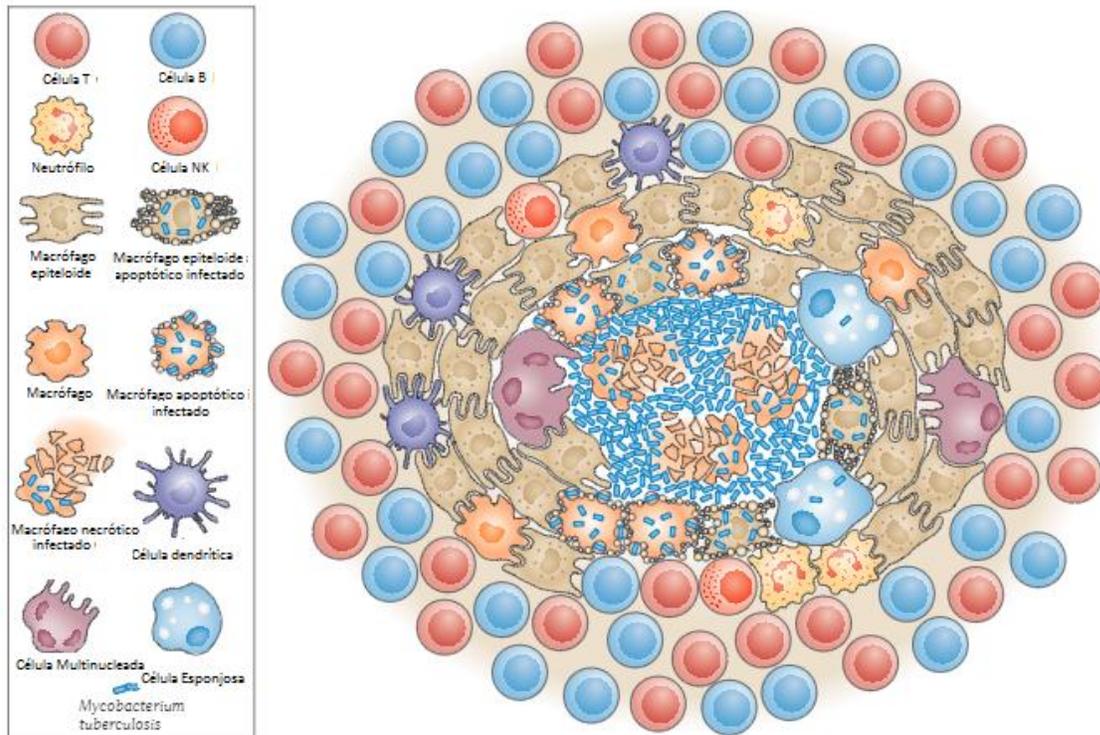
### 1.4.1. La lesión tuberculosa o granuloma

Durante la interacción hospedero-patógeno se producen citoquinas pro-inflamatorias y quimioquinas que sirven de señal de la infección, lo que lleva a la proliferación y reclutamiento de monocitos, neutrófilos y linfocitos ( $CD4^+$  y  $CD8^+$ ) que migran al sitio de infección [59,62,66]. Las células T  $CD4^+$  cumplen funciones muy importantes en la regulación del granuloma porque se

diferencian en células Th1, reconocen fagocitos infectados y los activan por la secreción de INF- $\gamma$ , siendo esta interleuquina una molécula central en la inmunidad protectora [59,62]. Las células dendríticas también fagocitan a *Mtb* y las células Th1 que han reconocido antígenos micobacterianos, se dirigen a nodos linfáticos regionales acarreado la infiltración de diversas células en el foco de infección, tales como macrófagos, linfocitos, y otros hospederos como células dendríticas, fibroblastos, células endoteliales y estromales que posteriormente conformarán la estructura del granuloma (Figura 1-4), cuyo microambiente se caracteriza por la baja concentración de O<sub>2</sub>, pH ácido, presencia de CO y N<sub>2</sub>O<sub>5</sub> [72].

A medida que se desarrolla el granuloma, parte de la población de bacilos tuberculosos están en un estado no replicativo, mientras que una mínima población de bacilos que aún se replican son atacados por células NK [30,67]. Aun en un estadio temprano del granuloma este es altamente vascularizado, lo que es mediado por el factor de crecimiento endotelial-vascular. Como el granuloma prosigue en su desarrollo, los macrófagos se diferencian en varios morfotipos como la formación de células grandes multinucleadas, que son producto de la unión de varios macrófagos; células epiteliales y macrófagos esponjosos que contienen cuerpos lipídicos en su interior [67].

Cuando el granuloma presenta un incremento del caseum (región de células necróticas con apariencia blanquecina que rodean los bacilos tuberculosos [68]), este colapsa y los bacilos tuberculosos se liberan por vía aérea. En el tejido queda solamente la parte externa del granuloma, precedido por un grave daño tisular y una fuerte tos en el individuo afectado, que expulsa miles de células de *Mtb* completando así el ciclo de infección. La transmisión es muy efectiva pues una dosis de una a diez células inhaladas es suficiente para que un individuo sano sea infectado [67]. Se puede corroborar que el estado de desarrollo del granuloma determina el grado de progresión de la enfermedad en el sitio de infección, ya que en el estado maduro los macrófagos son aislados por una capa fibrosa de los linfocitos y las células dendríticas [30,67].



**Figura 1-4. Estructura del granuloma.** El granuloma es un conglomerado celular que se forma como parte de la respuesta inmune celular, contra *Mtb*. El bacilo tuberculoso es rodeado principalmente de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos, entre otras líneas celulares importantes. Tomado y editado de Ref [61].

### 1.4.2. Ambiente intrafagosomal soportado por *Mycobacterium tuberculosis*

Una de las características más importantes de *Mtb* como patógeno intracelular, es que durante su internalización puede modular la maduración y acidificación del fagosoma (impide la fusión con el endosoma tardío y los lisosomas) [33,58,66,69,70]. El pH ácido intrafagosomal es mediado, entre otros, por una ATPasa tipo V del hospedero, la que transporta protones al interior fagosomal disminuyendo su pH (6.1-6.5) y alterando las condiciones mínimas de supervivencia del bacilo tuberculoso [30,70].

En el fagosoma, el bacilo tuberculoso también es expuesto a condiciones adversas tales como una baja disponibilidad de iones y nutrientes [13]; sustancias nocivas como péptidos antimicrobianos, hidrolasas, RNS y ROS [58,62,71] (con sus respectivos intermediarios reactivos: óxido nítrico, dióxido de nitrógeno, ácido nitroso, anión superóxido, radicales hidroxilo y peróxido de hidrógeno, además de hipoclorito), hipoxia [72] y un alto contenido de cationes de metales pesados [13].

Específicamente, se ha reportado que en las primeras horas de infección (1-24 horas), el interior fagosomal es cargado de concentraciones de metales como potasio 19,5-51 mM; calcio 0-0,25 mM; manganeso 14,7-16,9  $\mu\text{M}$ ; hierro 135-2680  $\mu\text{M}$ ; cobre 426  $\mu\text{M}$  y zinc 37,8-456,8  $\mu\text{M}$  [12].

*Mtb* posee dos superóxido dismutasas, SodA y SodC, ubicadas en el citoplasma y en el espacio periplásmico respectivamente; estas transforman el muy tóxico y perjudicial radical superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) en peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) y oxígeno diatómico ( $\text{O}_2$ ) [50,70,73]. El radical superóxido puede conllevar a la reducción de algunas proteínas oxidadas como citocromo C, la que hace parte del complejo de la cadena de transporte de electrones [73]. El primer superóxido dismutasa, SodA, cuyos cofactores son Mn/Fe, actúa en contra del estrés oxidativo generado por la fosforilación endógena dentro del fagosoma. SodC, cuyos cofactores son  $\text{Cu}^{2+}/\text{Zn}^{2+}$ , detoxifica radicales libres en el periplasma generando resistencia al estrés oxidativo en cultivo líquido y macrófagos activados [50,74].

La capacidad de sobrevivir en el ambiente intrafagosomal es fundamental en la patogénesis de *Mtb* [74]. Otras metaloenzimas que emplean hierro como cofactor y que también están asociadas a la respuesta de estrés oxidativo en *Mtb* son: una catalasa-peroxidasa KatG [70,74], una alquil hidropoxidoreductasa AhpC y las proteínas tiorredoxinas TrxA y TrxB [74], las que favorecen la detoxificación de especies reactivas como el anión peroxinitrito, el cual se forma por la reacción entre el radical superóxido con el óxido nítrico [30].

El transporte iónico dentro del fagosoma está relacionado con una familia de proteínas de macrófago asociadas a la resistencia natural NRAMP (del inglés *Natural Resistance Associated Macrophage Protein*), las que a partir del gradiente protónico permiten el transporte de cationes divalentes a través de la membrana del fagosoma en pro del proceso de la fagocitosis de varios patógenos intracelulares tales como *Mycobacteria*, *Leishmania* y *Salmonella* [70]. En mamíferos NRAMP1 permite el transporte de  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$  y  $\text{Fe}^{2+}$ ; NRAMP2 es el mayor transportador de  $\text{Fe}^{2+}$ , al mismo tiempo que la ATPasa humana ATP7A transporta  $\text{Cu}^{2+}$  a través de la membrana fagosomal incrementado su concentración e intoxicando al bacilo tuberculoso [75].

El cobre es un micronutriente esencial en el crecimiento bacteriano y además de ser cofactor de SodC, también lo es de la Citocromo oxidasa C en *Mtb*, enzima fundamental en la respiración aeróbica. El cobre en altas concentraciones es tóxico [22,50,76] porque puede competir con cofactores de otras enzimas, desestabilizar la membrana y favorecer especies ROS (mediante la reacción de Fenton) que promueven el daño de las macromoléculas, entre ellas el ADN [50,77,78].

Cobalto y níquel son indispensables para las células ya que hacen parte del 25% del total de cofactores de las proteínas, por ejemplo níquel es el cofactor de una ureasa de *Mtb* y cobalto es necesario para la biosíntesis de la vitamina B12. El exceso de estos metales puede ser tóxico, por lo que *Mtb* posee dos sensores de Co/Ni: KmtR y NmtR [78]. El cadmio se almacena en macrófagos alveolares por la polución, donde puede ser usado como parte de arsenal bactericida inhibiendo enzimas que reparan el ADN dañado y ocasionando supresión de la apoptosis [79].

El manganeso es primordial en la viabilidad y virulencia de muchos patógenos, por favorecer la resistencia al estrés oxidativo producido por el hospedero y porque es útil en la adaptación de patógenos en hospederos humanos. Una de las estrategias que usa el hospedero para atacar el patógeno, es secuestrar el manganeso, generando deprivación de nutrientes esenciales para la bacteria [78].

Teniendo en cuenta que  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  [12] se acumulan intrafagosomalmente durante la infección tuberculosa, *Mtb* requiere sobreexpresar proteínas asociadas a la membrana, específicas para el transporte de metales pesados, entre ellas, las ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  como CtpV y CtpC [75], que en determinado momento funcionan como bombas de eflujo de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  respectivamente [21,22].

## 1.5. Transporte a través de la membrana de las micobacterias

El transporte en las micobacterias permite a la célula obtener sustancias como lípidos, carbohidratos, nitrógeno, amoníaco, nitratos y cationes inorgánicos, entre otros, que son útiles como fuente energética y de carbono, esenciales para el funcionamiento de proteínas y ácidos nucleicos, componentes de la pared celular y como sustratos para las metaloenzimas [13,15]. Como en otras células, las micobacterias poseen varios mecanismos de transporte en sus formas pasiva y activa. El transporte pasivo de las sustancias es a favor del gradiente de concentración y dependiente de la hidrofobicidad o lipofilidad de las sustancias que atraviesan la envoltura. Debido a que la envoltura de las micobacterias es altamente lipídica y la pared celular es particularmente gruesa, solo se permite el paso de sustancias con características lipofílicas y pequeñas moléculas, generalmente no electrolitos, los que se difunden con facilidad a través de las bicapas lipídicas micobacterianas [13]. Las sustancias hidrofílicas no pueden atravesar la envoltura por difusión pasiva y requieren otros medios de transporte como las proteínas formadoras de canal y porinas. Por esto mismo, muchos de los fármacos hidrofílicos pueden no ser muy efectivos para las micobacterias, en comparación con sus homólogos hidrofóbicos, por ejemplo las fluoroquinolonas [48].

Las sustancias de carácter hidrofílico atraviesan la envoltura celular solo a través de grandes proteínas que forman canales que permiten el influjo de este tipo de solutos [13]. Por ejemplo las porinas (en la micromembrana) que permiten el paso de pequeñas moléculas sin gasto energético. La velocidad en este tipo de transporte está determinada por el gradiente de concentración, la carga, tamaño e hidrofobicidad de las sustancias transportadas, además de la longitud y el diámetro de los canales. *Mtb* expresa la porina OmpATb, codificada por el gen *rv0899* [48], implicada en el eflujo del ión amonio, lo que puede ayudar a neutralizar el pH ácido que la micobacteria debe soportar dentro del fagosoma [48,80].

De acuerdo a análisis comparativos que se han realizado de proteínas de transporte codificadas por el genoma de *Mtb*, se ha encontrado que el bacilo tuberculoso presenta un total de 285 proteínas de transporte clasificadas de la siguiente manera: 8 proteínas de canal de las cuales 6 son canales tipo  $\alpha$  y 2 porinas con barras  $\beta$ ; 82 cargadores secundarios asociados a la fuerza protón motriz (FPM), donde se encuentran uniporters, symporters y antiporters; 132 transportadores activos primarios; 1 grupo traslocador acoplado al transporte de Acyl CoA ligasa; 8 cargadores transmembranales de electrones; 1 proteína de transporte auxiliar y 53 proteínas de las cuales se desconoce el mecanismo bioquímico de transporte [81].

En el transporte activo hay presencia de proteínas de influjo y eflujo. En *Mtb* son escasos los importadores, entre ellos se conoce el importador de fosfato, también las ATPasas tipo ABC que cumplen función de eflujo e influjo [48]. En 1998 cuando el genoma completo de *Mtb* fue secuenciado se encontraron 14 proteínas de la familia de facilitadores principales (MFS) y 4 ATPasas tipo ABC para el transporte de carbohidratos [13]. El sistema de transporte de ATPasa tipo ABC para azúcar es fundamental en la virulencia de *Mtb* en ratones [48].

Diferentes análisis han mostrado la presencia en *Mtb* de 27 bombas de transporte completas y 11 incompletas de la familia de las ATPasas tipo ABC que corresponde al 3% de su genoma (*Mtb*) y se expresan principalmente en la membrana celular [48,82]. También se han categorizado otras proteínas de eflujo como: familia de multifármacos y extrusión de compuestos tóxicos (MATE), familia de resistencia a fármacos pequeños (SMR) y la superfamilia de nodulación-división-resistencia (RND), esta última es importante en la extrusión de lípidos y componentes de la envoltura celular. En general las bombas de eflujo anteriormente nombradas, se han caracterizado como transportadoras de antibióticos y al parecer se asocian con una reducción en la sensibilidad de la micobacteria hacia isoniazida, fluoroquinolonas, tetraciclina y aminoglicósidos [48].

Por otra parte, existen 28 marcos de lectura abierta que codifican para transportadores de metales, de las que 8 familias corresponden a transporte activo secundario y 3 familias de proteínas de transporte primario que incluyen 12 ATPasas tipo P, una cantidad inusual de estas bombas en comparación con otras bacterias [14], las que transportan:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $AsO_2^-$  y  $AsO_4^{2-}$  [74,83], y en algunas condiciones están asociadas a la supervivencia intracelular [13,74].

## 1.6. ATPasas

Las ATPasas son proteínas que se encuentran localizadas en las membranas biológicas y facilitan el transporte de iones y moléculas pequeñas en contra del gradiente de concentración a expensas de la hidrólisis del ATP [83], estas favorecen la viabilidad celular [84,85] y pertenecen a los sistemas de transporte activo [86]. Deficiencias en el funcionamiento de las ATPasas en humanos han sido asociadas con ciertas patologías como cáncer, enfermedades mitocondriales, adrenoleucodistrofia, osteoporosis, degeneración macromolecular, deficiencia inmune, fibrosis quística, diabetes, úlceras, nefrotoxicidad, pérdida de la audición, enfermedades de la piel y lupus [84,85,87] (Figura 1-5).

Estas bombas se clasifican de acuerdo a su localización celular y a los productos que transportan, como tipo P, F, V y superfamilia ABC [85] (Figura 1-6). Las ATPasas tipo P se encuentran en la membrana plasmática y transportan protones y cationes de metales pesados, alcalinos y alcalinotérreos [84]. Estas enzimas se caracterizan por presentar un intermediario covalente fosforilado que no está presente en los demás tipos de ATPasas [84]. En la TB latente se evidencia una disminución del contenido intracelular de ATP, lo que limita la actividad de las ATPasas en general, sin embargo, estas siguen funcionando de forma activa, por lo que se les atribuye una gran importancia en la persistencia de la infección latente cuando el bacilo tuberculoso se encuentra en un estado no replicativo [10]. En un estudio anterior realizado por el grupo BBMM se encontró que DosR, un regulador global de la latencia en *Mtb*, es estimulado en condiciones de hipoxia llevando a la expresión en *M. smegmatis* de un homólogo del gen *ctpF*, el que codifica para una ATPasa tipo P transportadora de metales alcalinos y alcalinotérreos a través de la membrana plasmática [88].

Las ATPasas tipo F son transportadores que se encuentran en la membrana interna de las mitocondrias, en la membrana tilacoide de los cloroplastos, en la membrana plasmática bacteriana y en la superficie de las células endoteliales [84]. Estas enzimas funcionan como una ATPsintasa, utilizando un gradiente protónico para producir ATP a partir de ADP, fosfato inorgánico y  $Mg^{2+}$  como cofactor. Las ATPasas tipo F están constituidas por dos estructuras fundamentales: un

componente catalítico citoplasmático ( $F_1$ ), y un componente transmembranal ( $F_0$ );  $F_1$  actúa como un nanomotor, que al girar circularmente permite la entrada del ADP y  $P_i$ ; y la salida de ATP [84,86].

Las ATPasas tipo V se encuentran principalmente en la membrana de las vacuolas y lisosomas, transportando protones al interior de estos organelos para mantener un pH ácido respecto al del citosol. Su función es reversible pues tiene la capacidad de hidrolizar ATP o sintetizar ATP, lo que las hace muy similar a las ATPasa tipo F, sin embargo, en su importancia fisiológica su función principal es de ATPasa. Además, las ATPasas tipo V están asociada a varios procesos intra e intercelulares como: endocitosis mediado por receptor, tráfico de proteínas, transporte activo de metabolitos, homeostasis y liberación de neurotransmisores [84].

La superfamilia de ATPasas tipo ABC, (del inglés *ATP binding cassette* o casett de unión a ATP) está constituida por cadenas polipeptídicas que poseen dos dominios o sitios de unión del nucleóide donde se cataliza la hidrólisis de ATP [84,85]. Las ATPasas tipo ABC favorecen el transporte de iones y moléculas pequeñas tales como mono y polisacáridos, péptidos, proteínas, colesterol, retinal y fármacos, entre otros [84,86]. En el ser humano existen alrededor de 50 variedades de ATPasa tipo ABC [84].

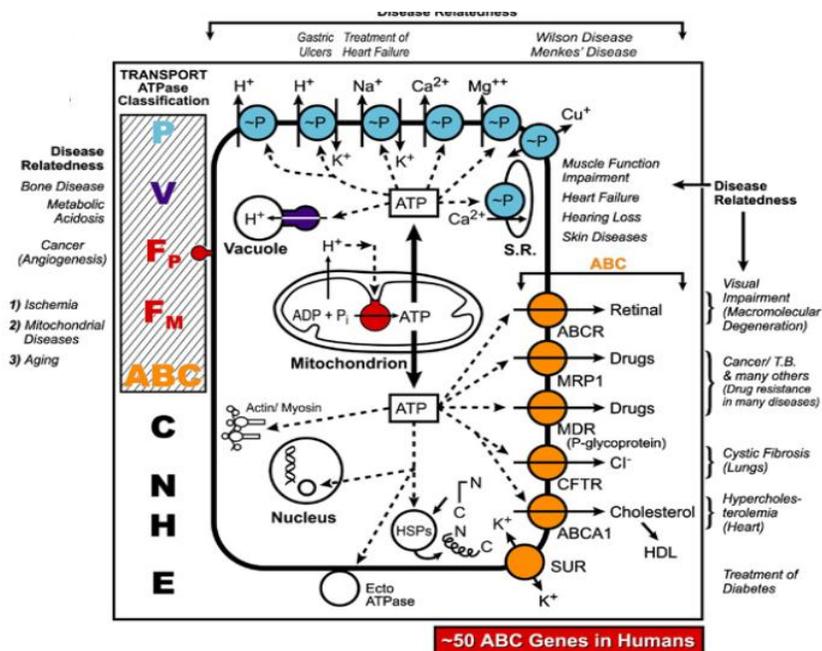
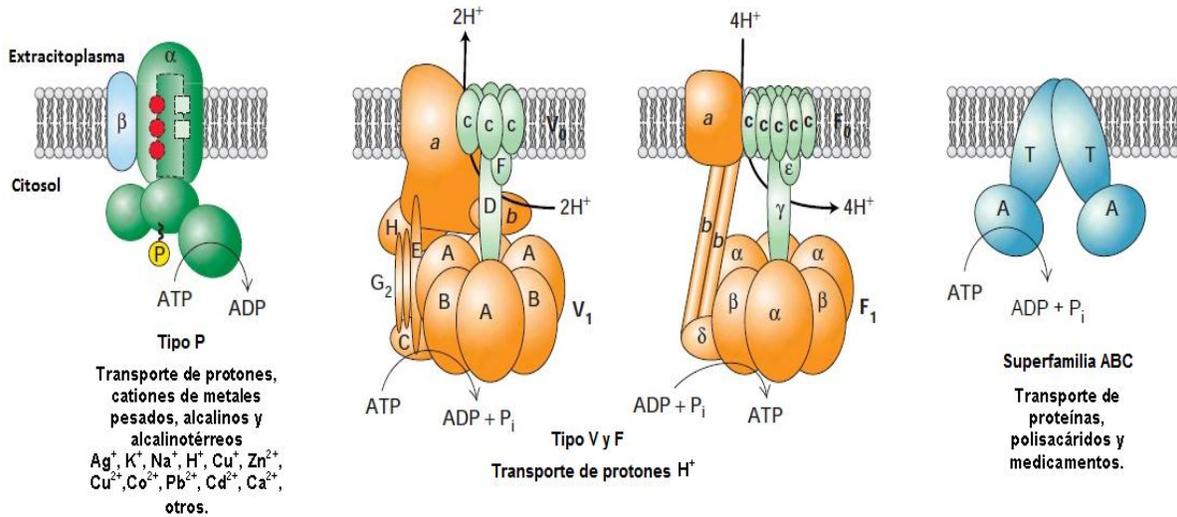


Figura 1-5. Enfermedades asociadas con ATPasas. Tomado de Ref [84].



**Figura 1-6. Tipos de ATPasas.** Las ATPasas son proteínas embebidas en membranas biológicas, que transportan sustancias en contra del gradiente de concentración a partir de la hidrólisis de ATP. Según su especificidad por sustrato y ubicación celular se denominan P, V, F y superfamilia ABC. Tomado y editado de Ref [86].

### 1.6.1. ATPasas Tipo P.

Las ATPasas tipo P son una superfamilia de proteínas integrales de membrana con una masa molecular que oscila entre 70-150 kDa, que se encuentran en todas las formas de vida [83,89], y que permiten el transporte de iones y lípidos a través de la membrana celular en procesos energéticos no favorables a partir de la hidrólisis de ATP [83–85,89]. Estas proteínas pueden ser inhibidas por orto-vanadato [10,16,89]. La importancia de estas bombas radica en que convierten la energía metabólica en gradientes electroquímicos, median la señalización celular (en el caso de las  $Ca^{2+}$  ATPasas), suministran ligandos a las metaloenzimas y participan en la homeóstasis iónica al remover iones tóxicos de la célula [15,83,89]. Así mismo, permiten el transporte de sustancias y protegen a la célula de sustancias tóxicas dentro del fagosoma [10,90]. Desde el punto de vista funcional, las ATPasas tipo P favorecen muchos procesos biológicos en animales tales como: secreción y reabsorción de solutos en el riñón, relajación muscular, acidificación en el estómago, absorción de nutrientes en el intestino y transducción de señales dependientes de  $Ca^{2+}$  [91,92]. La denominación de ATPasas tipo P, es debido a la formación de un intermediario fosforilado en un residuo conservado de aspartato durante el proceso catalítico [83,91].

Las ATPasas tipo P presentan 5 dominios con funciones específicas en el transporte de iones, tres de estos se encuentran en el citoplasma: el dominio N o de unión a nucleótido, el dominio A o actuador y el dominio P de fosforilación. Los otros dos dominios se encuentran embebidos en la

membrana citoplasmática: el dominio T de transporte y el dominio S de soporte específico de clase [15].

Un loop citoplasmático de las ATPasas tipo P está ubicado en el amino terminal muy próximo al dominio actuador A y otro ubicado en el carboxi terminal cerca del dominio de soporte. El dominio N se encuentra como una inserción dentro del dominio de fosforilación P. Por ejemplo en la  $\text{Ca}^{2+}$  ATPasa de retículo sarco-plásmico SERCA, se encuentran 10 segmentos helicoidales (M1-M10) en la zona transmembranal, de los que los primeros 6 estructuran el dominio T y los 4 restantes estabilizan el dominio S [15]. Cada uno de estos dominios tienen un papel fundamental en el proceso catalítico: el dominio N se une temporalmente a ATP y tiene la función de una quinasa, por lo que fosforila un residuo conservado de aspartato en el dominio P. Por otra parte, el dominio A actúa como una fosfatasa que defosforila el dominio P. El ión transportado pasa a través del dominio T desde el interior hacia el exterior celular. Generalmente se puede encontrar un cuarto dominio citoplasmático denominado R o regulador [15]. La especificidad en cada dominio se describe a continuación (Figura 1-7):

**Dominio A (actuador):** este dominio cumple la función de una fosfatasa a través de un motivo característico de treonina, glicina y glutamato (TGE) y posee dos o tres secuencias extensas de unión a los 3 primeros segmentos transmembranales (M1, M2, M3) en el dominio de transporte T, lo que le confiere cierta flexibilidad y facilitan la rotación del dominio A [15,89].

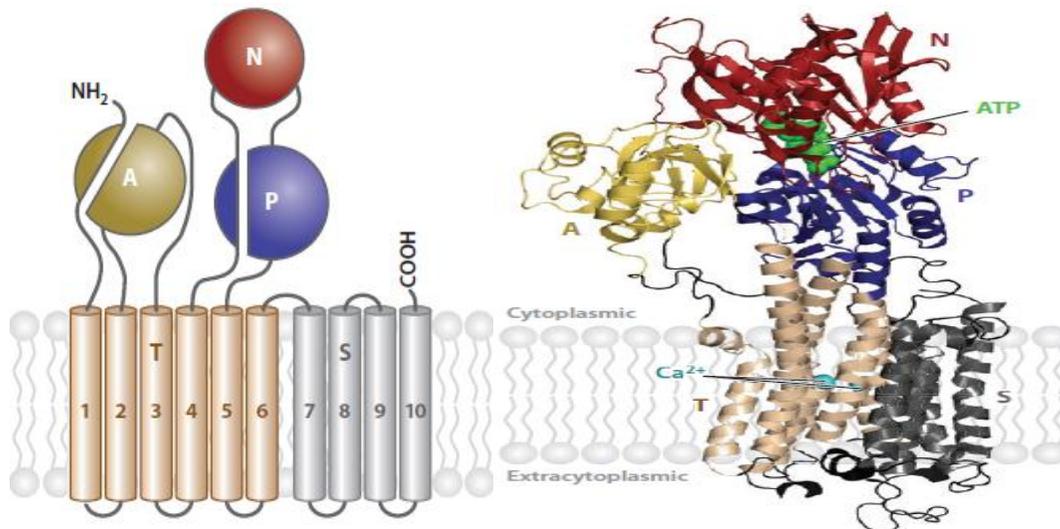
**Dominio N (de unión a nucleótido):** Presenta un motivo conservado donde se encuentra un residuo de lisina en la posición 515 que se une a la adenosina del ATP, dejando expuesto los tres grupos fosfato desde el sitio de unión para fosforilar el dominio P; teniendo en cuenta que el dominio N es una inserción dentro del dominio P, donde estos se unen a través de una delgada bisagra. Este dominio es el más variable de los dominios citoplasmáticos, sin embargo, la parte funcional es conservada [15,89].

**Dominio P (de fosforilación):** En él se encuentra un motivo conservado en todas las ATPasas tipo P, constituido por la secuencia aspartato-lisina-treonina-glicina (DKTG), en el que se realiza la fosforilación en el residuo de aspartato por el dominio N. Otras dos secuencias asociadas a la unión de ATP en el sitio de fosforilación presentan este aminoácido: aspartato-glutamato-leucina-arginina (DELR) y metionina-leucina-treonina-glicina-aspartato (MLTGD), el que necesita  $\text{Mg}^{2+}$  como cofactor. Se ha observado que este dominio es muy conservado en esta familia de proteínas, por lo que presenta muy pocas deleciones e inserciones [15,89].

**Dominio T (de transporte):** Posee de 6-10 alfa-hélices transmembranales que forman los canales donde se une el ión que va a ser transportado. Este dominio es muy flexible y se mueve durante el proceso catalítico durante la translocación del ión. Permite el transporte de distintos tipos de iones que se ubican en la parte media de la membrana [15,89].

**Dominio S (de soporte):** Funciona como una unidad auxiliar para el dominio T, ya que a diferencia de este dominio, generalmente no es muy flexible y no se mueve durante el proceso catalítico. Esto permite que sea un soporte para el dominio T, pero también puede presentar sitios adicionales de unión para los iones transportados. No es muy conservado entre las ATPasas tipo P y puede variar la posición de sus segmentos transmembranales, que a su vez pueden estar insertadas dentro del amino-terminal (P1B) y/o dentro del carboxilo terminal (P2, P3, P4); las ATPasas P5 presentan ambas condiciones [15,89].

**Dominio R (regulatorio):** Se puede encontrar en el amino terminal o en el carboxilo terminal y procede como un auto inhibidor de la proteína al interactuar con el resto de la molécula, por ejemplo al inhibir el movimiento de algunos dominios, como regulador de la afinidad de los cationes que atraviesan la bomba y como sensor para cationes transportados [15,89].



**Figura 1-7. Estructura terciaria de las ATPasas tipo P.** En la parte transmembranal se encuentran los dominios S y T, relacionados con el transporte de los cationes. En el citoplasma se encuentran los dominios N, A y P, donde ocurre la hidrólisis del ATP. El dominio R se encuentra a menudo ubicado en el carboxi o amino terminal o en ambos. Tomado de Ref [15].

De acuerdo al análisis de las secuencias genómicas, la especificidad iónica y la función que realizan las ATPasas tipo P, se han clasificado en 5 grupos con sub-clasificaciones en A, B, C, D, E, F, G, H, I, J y V [15,83].

Las ATPasas **P<sub>1A</sub>** agrupan las ATPasas del complejo KdpFABC, encargadas del transporte de K<sup>+</sup> en eubacterias y en menor proporción archaeas, en donde KdpB es una subunidad catalítica, mientras que KdpA presenta el sitio de unión a K<sup>+</sup>, y KdpC estabiliza la unión de KdpA y KdpB. La subunidad KdpB posee un segmento adicional junto al dominio de transporte (7 segmentos transmembranales en dominio T) [15,89].

Las ATPasas **P<sub>1B</sub>** son bombas de metales pesados que se encuentran en todos los seres vivos, pero son las más frecuentes en archaea y bacteria. Suministran metales pesados (principalmente Zn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup>) que son necesarios para la maduración de metaloenzimas, lo que ocurre en el espacio periplásmico en procariontes y en el lumen de vesículas secretoras en eucariotas. Estas enzimas también tienen el papel de bomba de eflujo, eliminando concentraciones elevadas de metales pesados que pueden ser perjudiciales para la célula. Este tipo de ATPasas también se clasifica filogenéticamente, de acuerdo al metal que transporta, el que puede ser monovalente (Ag<sup>+</sup> y Cu<sup>+</sup>) o divalente (Zn<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Cd<sup>2+</sup>). En esta clasificación se conocen algunas de las bombas de metales pesados bien caracterizadas: CadA, ZntA y CopA que transportan respectivamente Cd<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> en bacterias. HMA4 es una bomba transportadora de Zn<sup>2+</sup> en plantas, ATP7A y ATP7B son bombas transportadoras de Cu<sup>+</sup> y Cu<sup>2+</sup> respectivamente en seres humanos [15,89].

ATPasas **P<sub>2A</sub>**: Pertenecen a las Ca<sup>2+</sup>/H<sup>+</sup>-ATPasa transportadoras de calcio en el retículo sarcoplasmático (SERCA), cuya función principal es liberar 2 iones Ca<sup>2+</sup>, a cambio del ingreso de menos de 4 protones al citoplasma [84], desde el retículo sarcoplásmico de las células de músculo liso, en contra de un gradiente de concentración. La actividad de estas enzimas es fundamental para la división y señalización celular. Un inhibidor de esta ATPasa es la taspigargina [83,89,93], un sesquiterpeno lactona derivado de la planta *Thapsia garganica*; este inhibidor se introduce en el dominio de transporte T de la proteína e imposibilita el movimiento de las hélices transmembranales, de manera que impide el transporte de calcio el que se acumula intracelularmente ocasionando apoptosis y bloqueando SERCA. Esta bomba posee dos sitios de unión a calcio [93].

ATPasas **P<sub>2B</sub>**: Transportadores que pertenecen a las Ca<sup>2+</sup>-ATPasa, los que se encuentran situados en la membrana plasmática (PMCA) de células animales, y además en hongos y plantas localizados en las membranas vacuolares y en la envoltura plastida del retículo endoplásmico. Las ATPasas **P<sub>2B</sub>** poseen un solo sitio de unión a calcio en el dominio T, el que se une a una larga extensión (en animales dicha extensión se ubica en el carboxilo terminal y en plantas en el amino terminal) enlazada a calmodulina unida al dominio R, la que aumenta la afinidad de calcio a la bomba. Esta

ATPasa presenta auto inhibición. Se conoce que  $La^{3+}$  incrementa su estado relajado en los niveles de fosforilación, mientras que en  $P_{2A}$  lo disminuye. El calcio que transporta esta bomba es importante como mensajero intracelular, cuya concentración aumenta en respuesta a un estímulo extracelular [15].

**ATPasas  $P_{2C}$ :** En esta clasificación se encuentran las  $Na^+/K^+$  ATPasa y  $H^+/K^+$  ATPasa que presentan una subunidad alfa y una subunidad beta asociada a la regulación y ensamblaje de estas ATPasas. Por la acción de esta bomba pueden salir 3  $Na^+$  e ingresar 2  $K^+$  a la célula [85]. Esta bomba es fundamental en la homeostasis de sodio intracelular, formación del potencial, señalización y regulación del volumen. La ouabaina es un inhibidor de estas ATPasas por que se introduce en los segmentos transmembranales de transporte de potasio en el dominio T, impidiendo su entrada. En seres humanos 4 genes codifican para esta enzima. En el caso de la  $H^+/K^+$  ATPasa los 3 sitios de unión a sodio de las  $Na^+/K^+$  ATPasa, son reemplazados por 2 sitios de unión para hidrógeno. Esta bomba es electroneutra y secreta ácido en alta proporción en el lumen gástrico, también está presente en la membrana de células parietales [15,89]. Se tiene referencia de una ATPasa  $P_{2D}$ , que es una bomba de sodio y calcio en hongos [15,83,91].

**ATPasas  $P_{3A}$ :** Corresponden a las protón-ATPasas ( $H^+$ -ATPasa) de membrana plasmática presente en hongos y plantas menores que transporta  $H^+$  en contra del gradiente electroquímico, a través de la hidrólisis de ATP, sin transportar un contra ión como ocurre generalmente en otras ATPasas [15,83,89]. Tiene una región extendida en el carboxi terminal que funciona como un regulador auto inhibitorio de la proteína.  $P_{3B}$  es una bomba de  $Mg^{2+}$  en algunas pocas especies bacterianas como *Salmonella typhimurium* [15,91].

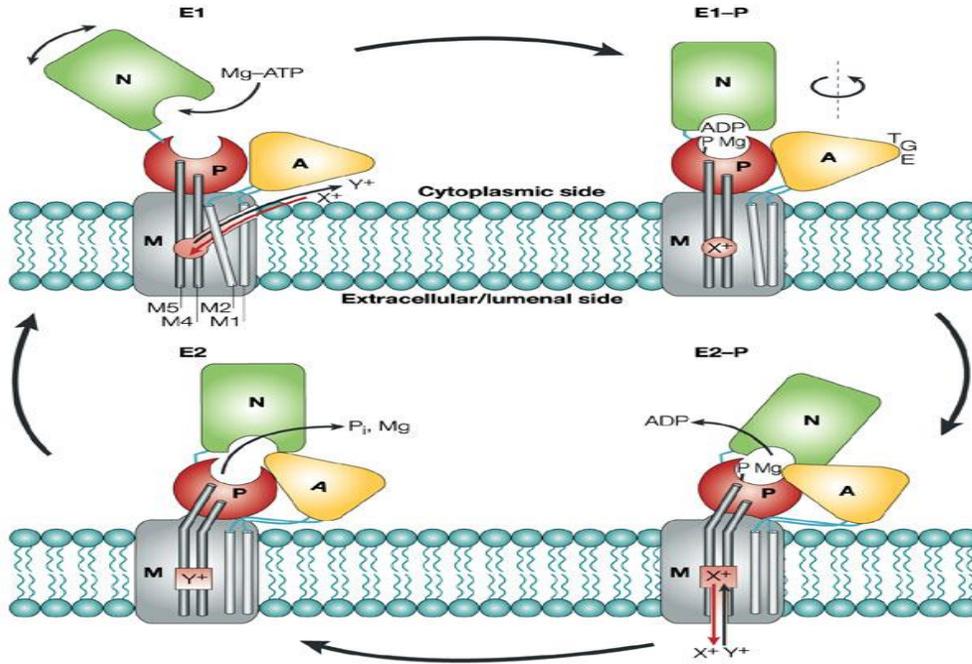
**ATPasas  $P_4$ :** A este subgrupo pertenecen las flipasas o aminofosfolípidos translocasas de fosfolípidos de eucariotas [91], que se localizan en membrana plasmática, complejo de Golgi y endosomas, siendo ausentes en procariontas. Pueden transportar fosfolípidos como fosfatidilserina y fosfatidiletanolamina en algunos microorganismos [74,91]. Estas bombas establecen asimetría de los fosfolípidos de la bicapa lipídica por el movimiento de “flipping”. También puede ayudar al transporte de vesículas en la vía endocítica y secretora. La actividad flipasa es dependiente de la hidrólisis de ATP. En el ser humano 14 genes codifican para esta enzima [15].

**ATPasas tipo  $P_5$ :** Se conocen algunos motivos característicos pero se desconoce su función y especificidad [91]. Se ha clasificado en dos bombas  $P_{5A}$  y  $P_{5B}$ , que difieren en el número de segmentos transmembranales (12 y 11 respectivamente), la localización celular, ya que  $P_{5A}$  se

encuentra solamente en retículo endoplasmático, en tanto que  $P_{5B}$  se encuentra en el lisosoma de seres humanos, las vacuolas de levaduras y en la membrana plasmática de *C. elegans*. Lesiones genéticas en este subgrupo de enzimas ocasiona problemas neurológicos en seres humanos [15].

### 1.6.2. Ciclo Catalítico de las ATPasas Tipo P

El ciclo catalítico en las ATPasas tipo P, por el que son transportados cationes a través de la membrana celular, ocurre en 4 etapas o estadios fundamentales de acuerdo al modelo de Post-Albers (Figura 1-8). Inicialmente se encuentra la enzima libre constituyendo el estadio 1 ( $E_1$ ); posteriormente el ATP y  $Mg^{2+}$  (cofactor), ingresan al sitio catalítico en el dominio N, el que a su vez cumple la función de una quinasa al fosforilar el dominio P, en un residuo conservado de aspartato, lo que genera alta afinidad por un primer catión en el dominio T. La fosforilación de la enzima, conlleva a un cambio conformacional de la misma, generando el estadio 1 fosforilado ( $E_1P$ ). El enlace del ión al sitio de unión en el dominio T genera un rearrreglo en las hélices, lo que permite que una señal sea transmitida al dominio P acercando el  $Mg^{2+}$  al residuo de aspartato. El dominio A gira  $90^\circ$ , quedando expuesto al aspartato fosforilado. El giro del dominio A ocasiona que se destruya la alta afinidad por el ión en el sitio de unión en el dominio T, debido a la acción fosfatasa del motivo TGE, provocando en el estadio 2 fosforilado ( $E_2P$ ) que el ión pase al otro lado de la membrana hacia la zona extracitoplasmática. La tensión generada en la proteína en la etapa anterior proporciona la fuerza suficiente para llevar a cabo la reacción de defosforilación y conlleva a la liberación de ADP al medio citoplasmático. Finalmente, cuando el ión es transportado al otro lado de la membrana, el fosfato pierde afinidad por el residuo de aspartato en el dominio P, por lo que el fosfato inorgánico y el  $Mg^{2+}$  salen de bomba. Esto conlleva a que el dominio A retorne a su lugar inicial y el dominio T quede libre para transportar otro catión [15,89]. En consecuencia, la enzima recupera su conformación inicial [16].



**Figura 1-8. Ciclo catalítico de las ATPasas tipo P.** La apertura y cierre de los canales de las ATPasas tipo P junto con los cambios conformacionales en los dominios citoplasmáticos por la unión al ATP, conduce a dos estadios de fosforilación (E1P y E2P) y posterior defosforilación (E1 y E2) en la cual se libera fosfato inorgánico, lo que permite el transporte de un ión de un lado al otro de la membrana y el co-transporte de un segundo ión. Cada estadio es reversible [83,89]. Tomado de Ref [89].

### 1.6.3. ATPasas Tipo P en *Mycobacterium tuberculosis*

Las ATPasas tipo P además de realizar funciones muy importantes en muchos organismos son cruciales en el papel regulador de los iones metálicos de *Mtb* dentro de las células hospederas, designándoseles una acción fundamental en la supervivencia del bacilo tuberculoso [74]. Los iones que pueden ser transportados por estas bombas incluyen:  $K^+$ ,  $Na^+$ ,  $Cu^+$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $Hg^{2+}$ ,  $AsO_2^-$  y  $AsO_4^{2-}$  [74,83], varios de estos metales se consideran activos biológicamente como el hierro, cobre, zinc y magnesio que son utilizados como micronutrientes y sirven como cofactores para varias proteínas. El hierro se une a la transferrina y lactoferrina expresadas en la membrana de macrófagos y cobre es el cofactor de las oxidasas y superóxido dismutasas, sin embargo son tóxicos en concentraciones altas [22].

*Mtb* es uno de los microorganismos que presenta mayor número de genes que codifican para ATPasas tipo P, comparado con otros miembros del género *Mycobacterium*; además presenta una mayor expresión de ATPasas tipo P en comparación con cualquier otro transportador de metales. Por ejemplo *M. leprae* expresa cuatro bombas de este tipo con un porcentaje total de transportadores de metales en el genoma del 21%, de las que tres son del tipo  $P_{1B}$  y una  $P_2$ . En el

caso de *Mtb*, este presenta un porcentaje total de transportadores de metales en el genoma del 24%, y un total de 12 ATPasas tipo P de las que probablemente siete son P<sub>1B</sub> (CtpA, B, C, D, G, J y V) o bombas de metales pesados, tres del tipo P<sub>2A</sub> (CtpF, H e I), una del tipo P<sub>1A</sub> o transportador del tipo KdpB y una que no ha sido clasificada (CtpE) [74], lo que sugiere un importante rol de estos transportadores en la supervivencia intracelular.

Las ATPasas tipo P en *Mtb*, se han agrupado de acuerdo a los porcentajes de identidad de los primeros 100 aminoácidos en el amino terminal de estas proteínas:

- 1) CtpA y CtpB presentan 47,2% de identidad y transportan Cu<sup>2+</sup>.
- 2) CtpC, CtpG y CtpV con 40-50% de identidad.
- 3) CtpD y CtpJ con 40,7% de identidad.

Estos tres grupos tienen 3,7-16,7% de identidad entre sí, lo que se asocia a la adaptación de la variedad de sustratos que son transportados. Conocer la expresión de genes de transportadores durante la infección en *Mtb* provee información muy útil para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas [74]. Además, se conoce que las ATPasas tipo P son mucho más conservadas en la estructura terciaria que en su secuencia de aminoácidos [10,83], lo que debe considerarse en el diseño de inhibidores [83].

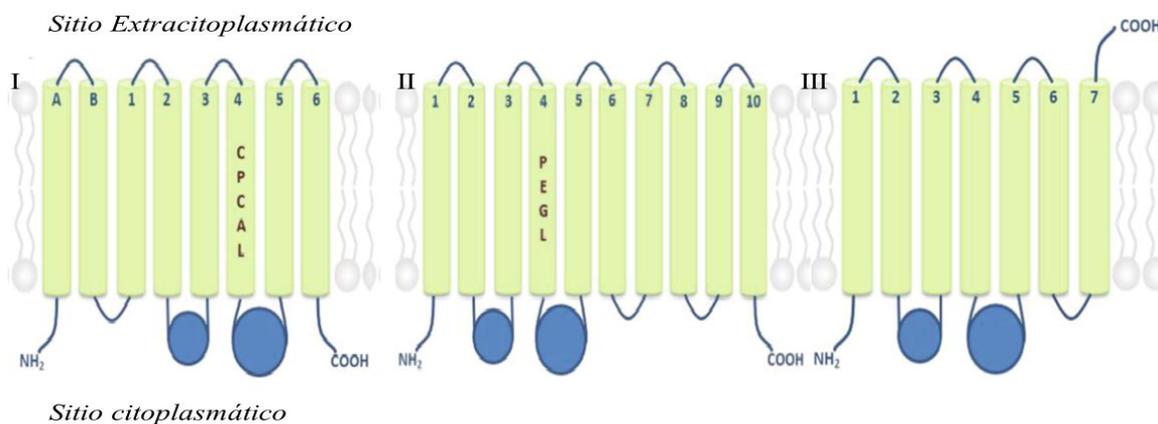
Recientemente nuestro grupo de investigación BBMM, realizó un análisis *in silico* que permitió hacer una aproximación funcional y contrastar la especificidad iónica para las ATPasa tipo P en *Mtb* H37Rv, o cepa virulenta. Como se decía anteriormente, existen 7 ATPasas tipo P de transporte de metales pesados (del inglés *Heavy Metal* HM), que incluye a CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV, las que pueden transportar Cu<sup>2+</sup>, Cu<sup>+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ag<sup>+</sup>, Hg<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup>, bombas que están altamente implicadas en la supervivencia intrafagosomal de *Mtb* [10,16]. También se han agrupado a CtpE, CtpF, CtpH y CtpI, como bombas de transporte de metales alcalinos y alcalinotérreos (del inglés *Alkalines Earth Metals* AEM), con posible especificidad para Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup>, H<sup>+</sup> y Mg<sup>2+</sup>. Es probable que algunas de estas enzimas sean bombas Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa y H<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPasa [10,16].

De acuerdo a su topología, las ATPasas tipo P se han organizado en 3 tipos (Ver figura 1-9):

- I) Bombas de metales pesados HM, que poseen 8 segmentos transmembranales (TMS), enumerados como A, B y de 1-6.

- II) Bombas de metales alcalinos y alcalinotérreos AEM, que poseen 10 TMS enumerados del 1-10.
- III) Bomba de potasio. KdpB. Posee 7 TMS.

En todos los grupos las ATPasas tipo P presentan dos loops citoplasmáticos, uno de menor tamaño que el otro, en el que el más pequeño se encuentra localizado en TMS2 y TMS3 (Figura 1-9), mientras que el loop de mayor tamaño se ubica en TMS4 y TMS5, asociados al sitio de fosforilación y sitio de unión del ATP [16]. Para el tipo I y II el amino y carboxilo terminal está localizado en el citoplasma, mientras que para el tipo III el amino terminal se ubica intramembranalmente y el carboxilo terminal está en la parte externa del citoplasma.



**Figura 1-9. Segmentos transmembranales de ATPasas tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*.** Topología de membrana I pertenece a bombas de metales pesados (HM), estas poseen 8 TMS (A,B y 1-6); Topología de membrana II corresponde a bombas de metales alcalinos y alcalinotérreos (AEM), posee 10 TMS y el Topología de membrana III corresponde a una bomba de potasio, tiene 7 TMS. Tomado y editado de Ref [16].

De las bombas de transporte de cationes metálicos que expresa *Mtb*, aproximadamente 60% pertenecen a cationes de metales pesados, sugiriendo que estos transportadores podrían cumplir un papel muy importante en la habilidad de *Mtb* de sobrevivir como patógeno intracelular, puesto que una de las estrategias que emplea el macrófago cuando ha fagocitado a la micobacteria, es incrementar la concentración intrafagosomal de metales pesados [16] creando un ambiente tóxico, por ejemplo la concentración intrafagosomal de Cu<sup>2+</sup> después de incorporar a *Mtb* puede ser de hasta 500µM [22].

En el diseño de antituberculosos se debe considerar la inhibición de aquellas ATPasa Tipo P que se sobreexpresan durante la infección, lo que afectaría la viabilidad celular. También se debe considerar la inducción las ATPasas tipo P que se reprimen, con el fin de generar un detrimento de

las reservas energéticas por el gasto innecesario de ATP, llevando a la célula a un shock energético y posteriormente a la muerte, o conducir a la reactivación del bacilo haciéndole susceptible a los fármacos antituberculosos. En los macrófagos humanos, las ATPasas tipo P de *Mtb* que se sobreexpresan son: CtpA, CtpC, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI y CtpV [10]. Se ha sugerido que CtpF y CtpG conllevan a un desperdicio de reservas energéticas, por lo que su inducción podría considerarse un posible mecanismo de control sobre la infección tuberculosa. CtpE es la única ATPasa que se reprime durante la infección tuberculosa y en CtpJ no varía el nivel de expresión en exposición a sustancias tóxicas, o cuando el bacilo se encuentra en estado activo o de latencia [10].

El nivel de expresión de CtpF y CtpC aumenta cuando *Mtb* es expuesto a compuestos antimicrobianos generando resistencia propia del bacilo tuberculoso frente a fármacos. CtpA, CtpC, CtpG, CtpV y CtpF son inducidas cuando *Mtb* ha sido fagocitado por los macrófagos. Así mismo en condiciones de hipoxia, CtpF se sobre expresa *in vitro* por la adición de S-nitroglutation GSNO, etanol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y óxido nítrico, conjuntamente se sobre expresa aproximadamente 60 veces cuando es expuesto a RNS [10,16]. CtpG, CtpV y CtpC responden a intoxicación por metales pesados [10].

#### 1.6.4. ATPasas Tipo P<sub>1B</sub> en *Mycobacterium tuberculosis*

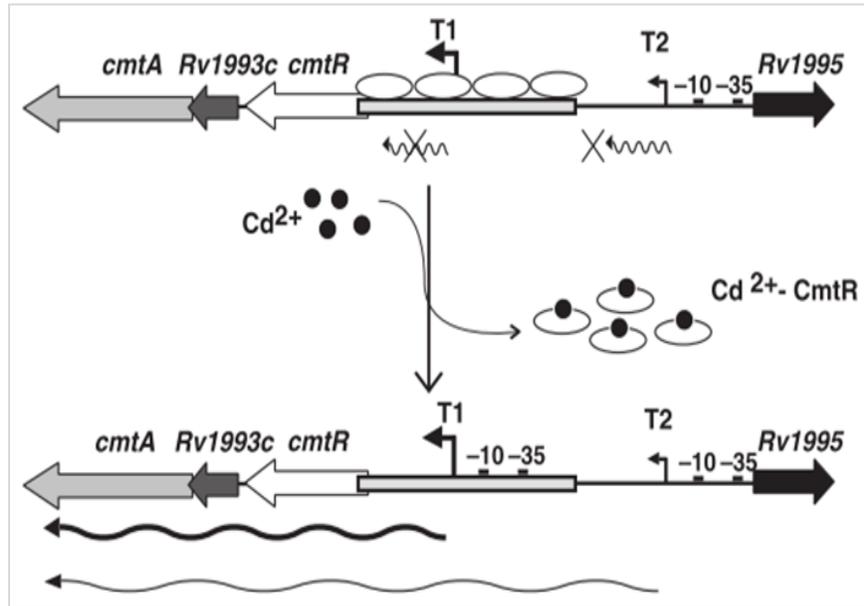
Las ATPasas P<sub>1B</sub>, transportadoras de metales pesados también se han organizado filogenéticamente teniendo en cuenta motivos conservados en los segmentos transmembranales 6, 7 y 8, formando cinco grupos (1-5) de bombas así: P<sub>1B-1</sub> agrupa a CtpA, CtpB y CtpV, las que transportan específicamente a Cu<sup>+</sup>, P<sub>1B-2</sub>, incluye a CtpC la que transporta a Zn<sup>2+</sup>, P<sub>1B-3</sub> transporta a Cu<sup>2+</sup>, pero no se ha determinado la bomba con esta especificidad, P<sub>1B-4</sub> comprende las bombas CtpD y CtpJ que transportan Co<sup>2+</sup>. Finalmente, P<sub>1B-5</sub> es un grupo filogenético del que no se ha determinado el metal que transporta ni las bombas implicadas en el transporte [10].

Las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> se sobreexpresan en condiciones hostiles durante la infección tuberculosa, como por ejemplo a concentraciones letales de metales pesados. Específicamente, la concentración intrafagosomal de Cu<sup>2+</sup> aumenta de 25 μM hasta 426 μM durante las primeras 24 horas post-infección, lo que conlleva a la denaturación de las proteínas principalmente aquellas con grupos tiol, o se puede inactivar alguna enzima por inhibición competitiva. Un exceso de cobre genera estrés y desestabilización de la membrana; se ha comprobado experimentalmente que CtpV funciona como una bomba de eflujo fundamental para la homeostasis iónica de Cu<sup>2+</sup> [10,22]. La delección de CtpV de *Mtb* disminuye la resistencia de la micobacteria a niveles nocivos de cobre y la capacidad de afectar el pulmón en ratones, por lo que esta bomba es necesaria para la virulencia de *Mtb*.

## 1.7 CtpG durante la infección

CtpG es una de las ATPasas tipo P de *Mtb* cuya especificidad iónica no ha sido corroborada experimentalmente. El gen que la codifica se induce en una amplia variedad de condiciones, como alto contenido de sustancias tóxicas y durante el estado de infección en macrófagos humanos [10,18,22]. CtpG es además sobreexpresado, junto con CtpC, en modelos de inanición que imitan el bajo contenido de nutrientes en localizaciones caseosas [10,22]. Así mismo, CtpG se expresa en respuesta a la intoxicación con metales pesados que soporta *Mtb* en el interior del fagosoma, específicamente desde 50 $\mu$ M de Zn<sup>2+</sup> [21] y concentraciones letales de Cu<sup>2+</sup> (500 $\mu$ M), condición en la que se induce 20 veces y 60 veces en ausencia de la Cu<sup>2+</sup> ATPasa, CtpV [22].

CtpG es regulado transcripcionalmente por CmtR, el que pertenece a la familia SmtB/ArsR. SmtB/ArsR es una familia de represores transcripcionales que son inducidos por estrés debido a la toxicidad de metales pesados, esto genera disociación del complejo proteína represora-ADN, por lo que la ARN polimerasa inicia la transcripción de genes ubicados corriente abajo del promotor, los que codifican proteínas encargadas del eflujo de metales tóxicos [95]. *Mtb* posee dos reguladores de esta familia, NmtR y CmtR. En presencia de Co<sup>2+</sup>/Ni<sup>2+</sup>, NmtR regula la transcripción del gen que codifica la ATPasa tipo P, CtpJ (Rv3743c) [96]; mientras que en presencia de Cd<sup>2+</sup>/Pb<sup>2+</sup>, CmtR regula la transcripción del gen que codifica CtpG (Rv1992c/ *cmtA*) [23,24]. Para esto el Cd<sup>2+</sup> disocia el complejo proteína-ADN derrepresando la transcripción del operón *cmtR-Rv1993c-Rv1992c* en *Mtb* H37Rv, por lo que se cree que CtpG puede ser una bomba de eflujo de Cd<sup>2+</sup> [24] (Ver figura 1-10).



**Figura 1-10. Regulación transcripcional del operón *cmtR-Rv1993c-Rv1992c* por CmtR.** CmtR (óvalos) se une cooperativamente a sitios promotores (T1 y T2), impidiendo la transcripción del operón *cmtR-Rv1993c-Rv1992c*. En presencia de cadmio (círculos negros), CmtR pierde afinidad por el ADN, al unirse con el metal, por lo que se disocia el complejo CmtR-ADN, en consecuencia, la transcripción inicia [24]. Tomado de Ref [24].

## 2. Preguntas de investigación

Conocer la especificidad iónica de CtpG podría ser relevante para entender su rol biológico en *Mtb* al estar expuesto en condiciones hostiles durante la infección. Para lograr este objetivo sería imprescindible responder a las siguientes preguntas de investigación

1. ¿Qué cationes divalentes de metales pesados inducen la expresión del gen *ctpG*?
2. ¿Qué condiciones experimentales garantizan un alto grado de transcripción de *ctpG* en la membrana plasmática de las micobacterias?
3. ¿Qué efecto en la viabilidad celular tiene el sobreexpresar la proteína CtpG en un sistema heterólogo a diferentes concentraciones de cationes divalentes de metales pesados?

### 3. Hipótesis experimental

La familia de ATPasas tipo P son nanomáquinas que transportan cationes y lípidos a través de membranas biológicas obteniendo su energía de la hidrólisis de ATP, cuya importancia radica en su papel regulador de la homeostasis iónica, los gradientes electroquímicos, los procesos de señalización y la asimetría de la bicapa lipídica celular [15,93,97].

Las ATPasas P<sub>1B</sub> son transportadoras de metales pesados fundamentales para regular y eliminar niveles elevados de Cu<sup>+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Co<sup>2+</sup>, entre otros, lo que resulta crucial para la viabilidad celular [97]. CtpG, una ATPasa P<sub>1B</sub> y posible transportadora de Zn<sup>2+</sup>, se expresa más de 20 veces durante la infección tuberculosa debido a los elevados niveles de Cu<sup>2+</sup> y Zn<sup>2+</sup> encontrados en el ambiente intrafagosomal de los macrófagos [21,22].

El análisis detallado de CtpG, ayudará a elucidar su importancia biológica durante el proceso de infección y brindará ideas sobre la homeostasis de los cationes de metales pesados transportados por la enzima en *Mtb*, lo que será útil para la identificación de nuevas dianas terapéuticas [74,97].

## 4. Objetivos

### 4.1 Objetivo general

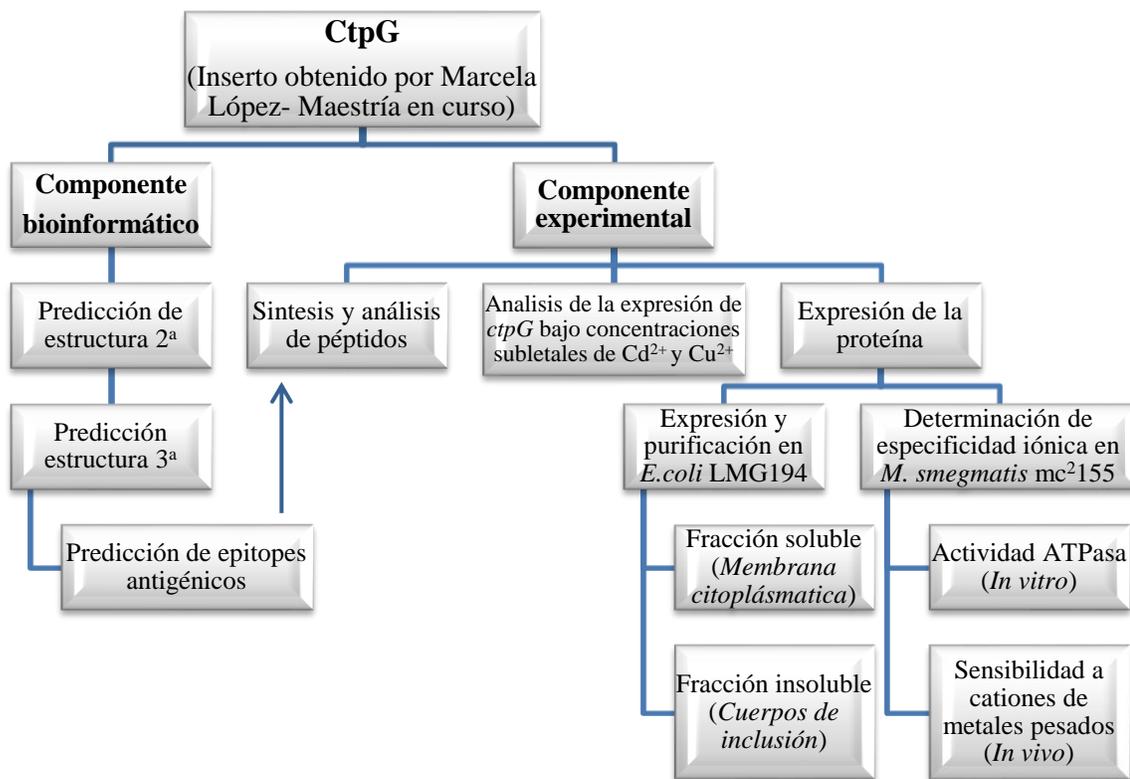
Determinar características funcionales como especificidad iónica y actividad ATPasa del transportador de metales pesados CtpG de *Mycobacterium tuberculosis* expresado en la membrana plasmática de micobacterias.

### 4.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la respuesta transcripcional del gen *ctpG* de *Mtb* bajo concentraciones sub-letales de cationes de metales pesados
2. Optimizar los parámetros de sobreexpresión y purificación de la proteína CtpG de *Mtb* en *Escherichia coli*.
3. Determinar la posible especificidad iónica de CtpG expresado en la membrana plasmática de *Mtb* H37Ra.
4. Diseñar y sintetizar péptidos antigénicos derivados de CtpG por la técnica de síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS).

## 5. Materiales y métodos

La presente investigación se inició con un análisis bioinformático de CtpG, además de un componente experimental que incluyó la expresión de CtpG *in vitro* en un sistema heterólogo, y el análisis de algunas características funcionales de CtpG expresada en la membrana plasmática de las micobacterias. Por último se hizo una predicción y síntesis de péptidos antigénicos derivados de CtpG (Figura 5-1).



**Figura 5-1. Estrategia metodológica en el desarrollo de la presente investigación.** Se realizó un acercamiento bioinformático que permite conocer algunas características de CtpG, una ATPasa P<sub>1B</sub>, como estructura secundaria, terciaria, topología de membrana y zonas de alta antigenicidad de la proteína, también se realizó un acercamiento experimental para determinar el posible catión transportado por CtpG.

## 5.1 Componente bioinformático

En estudios previos realizados en el grupo, se confirmó que *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv tiene 12 marcos de lectura abierta que codifican la expresión de ATPasas tipo P, de las cuales 7 pertenecen a transportadores de cationes de metales pesados: ATPasas tipo P<sub>1B</sub> [16,98], las que se expresan diferencialmente durante la infección [10]. CtpG es una de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb* de las que se desconoce su especificidad iónica, lo que llevo al desarrollo de este trabajo.

### 5.1.1 Análisis *in silico* de CtpG

La secuencia del gen *ctpG* (*Rv1992c*) se encuentra reportada en la base de datos del Genoma del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y en la base de datos específica para *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv Tuberculist [99] (<http://tuberculist.epfl.ch/>). En la determinación del punto isoeléctrico, peso molecular e hidrofobicidad se emplearon los servidores *Compute pI/Mw*, *ProtParam* y *ProtScale* de Expasy (<http://www.expasy.org/tools/>); el primero genera un valor teórico a partir de una secuencia dada por el usuario, el segundo se basa en parámetros fisicoquímicos de la proteína y el último hace uso de la escala de hidrofobicidad de “Kyte y Doolittle”, la cual asigna valores positivos a residuos hidrofóbicos y valores negativos a aquellos que son hidrofílicos [100].

#### ▪ Predicción de la topología de membrana

En la determinación de la topología de membrana, basado en la estructura primaria, se empleó el servidor *Phyre<sup>2</sup>* y *CCTOP Constrained Consensus TOPology prediction server* (<http://cctop.enzim.ttk.mta.hu/>), este último recopila información desde bases de datos disponibles usando modelos ocultos de Markov, evaluando la exactitud y disponibilidad de 10 métodos de predicción de segmentos transmembranales (TMS) con al menos 80% de cobertura de la secuencia y como mínimo un 40% de similitud en un método consenso [101]. Adicionalmente se revisó la organización topológica empleando *TMDet* y *PPM server* que usan modelos 3D en formato PDB ubicando los TMS en las bicapas lipídicas.

#### ▪ Alineamiento múltiple de ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *M. tuberculosis* y predicción de motivos funcionales

Las secuencias codificantes de las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> aparecen en la base de datos del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *Tuberculist* (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) y su

código esta reportado en el GenBank ([www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/)) como se muestra en la siguiente tabla:

ATPasa Tipo PIB	Gen	Código GenBank	Número de nucleótidos	Código Uniprot	Número de aminoácidos
CtpA	Rv0092	CCP42817.1	2286	P9WPU1	761
CtpB	Rv0103c	KBJ41209.1	2259	P9WPT9	752
CtpC	Rv3270	AFN51276.1	2157	P9WPT5	718
CtpD	Rv1469	CCP44228.1	1974	P9WPT3	657
CtpG	Rv1992c	AFN49932.1	2316	P9WPS7	771
CtpJ	Rv3743c	AFN51766.1	1983	P9WPT7	660
CtpV	Rv0969	CCP43718.1	2313	P9WPS3	770

**Tabla 5-1. ATPasas tipo PIB de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv.**

Se realizó la búsqueda de secuencias homólogas en BLASTP (Protein BLAST) de NCBI (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) a cada una de las secuencias obtenidas, limitando a la especie *Mtb*. El alineamiento múltiple se realizó usando los servidores CLUSTAL OMEGA [102] de EMBL-EBI y COBALT [103] de NCBI para analizar su grado de homología y destacar motivos funcionales conservados, los que fueron seleccionados manualmente a lo largo de la secuencia de aminoácidos y corroborados con la literatura [16,92]. Además los motivos funcionales fueron analizados usando el servidor *InterPro* de EMBL-EBI.

Adicionalmente con la finalidad de hacer una aproximación a la especificidad iónica de CtpG se realizó un alineamiento múltiple de los segmentos transmembranales (TMS) asociados a metal de CtpG (TMS 6-8), con ATPasas tipo P bien caracterizadas, reportadas en el Protein Data Bank: CopA de *L. pneumophila* (PDB ID 3RFU), CopA de *A. fulgidus* (PDB ID 3j09) y ZntA de *S. sonnei* (PDB ID 3UMV). (Ver tabla 2).

PDB ID	ATPasa	Organismo	Técnica	Resolución	Referencia
<b>3RFU</b>	CopA (Cu <sup>+</sup> ATPasa)	<i>L. pneumophila</i>	Difracción de rayos X	3.2 Å	Gourdon, et al. (2011) [97]
<b>3j09</b>	CopA (Cu <sup>+</sup> ATPasa)	<i>A. fulgidus</i>	Microscopia electrónica	2.7 Å	Allen GS, et al. (2011) [104]
<b>3UMV</b>	ZntA (Zn <sup>2+</sup> ATPasa)	<i>S. sonnei</i>	Difracción de rayos X	10 Å	Wang, et al. (2014) [105]

**Tabla 5-2. Algunas de las ATPasas tipo PIB actualmente caracterizadas**

### ▪ Predicción de estructura secundaria

La estructura secundaria fue determinada con el servidor *JPred4* [106], el que realiza la predicción con base a estructuras similares reportadas en el Protein Data Bank, con un 82% de exactitud;

paralelamente calcula la accesibilidad al disolvente (> 0%, > 5% y > 25%) usando la red neural Jnet v.2.3.1 [106,107].

### ▪ **Predicción de estructura terciaria**

La estructura terciaria de CtpG fue modelada usando los predictores del *Protein Model Portal* ([www.proteinmodelportal.org](http://www.proteinmodelportal.org)). Para la validación del modelo se usó el paquete de herramientas ofrecido por *What If Web Interface*, iniciando con una evaluación general en el *Protein model check*, el que valora las longitudes y ángulos de enlace, así como hidrofobicidad y posición de los aminoácidos. Posteriormente se corrigieron los errores detectados con *Complete a structure*. Por último se analizó el *Z-score*, el cual es una medida de la calidad del modelo, corroborando la posición de los aminoácidos en *Ramachandran plot evaluación*, donde valores iguales a cero expresan alta calidad del modelo y valores inferiores a -4 indican problemas en la estructura [108].

### ▪ **Predicción de Epítopes Antigénicos**

La predicción de regiones antigénicas se realizó sometiendo la secuencia de aminoácidos de CtpG a la herramienta que ofrece *Immunomedicine Group Tools* ([imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl](http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl)), un predictor de epítopes antigénicos que está basado en un método semi-empírico creado por Kolaskar y Tongaonkar [109] que selecciona las regiones de mayor antigenicidad empleando algoritmos que asocian la hidrofiliidad, flexibilidad y exposición a los solventes, características importantes en la respuesta humoral. Este método tiene un 75% de exactitud. Adicionalmente, se sobrepusieron los modelos 3D predichos de la proteína y manualmente se seleccionaron regiones expuestas (mayor flexibilidad y exposición a solventes) y se comparó con la lista de posibles epítopes entregada por el predictor.

## **5.2. Componente experimental**

El componente experimental aborda el análisis de la expresión génica de *ctpG* bajo concentraciones subletales de metales pesados, ensayos de sobreexpresión y purificación de la proteína recombinante en *E. coli*, ensayos de viabilidad celular y actividad ATPasa en células completas y vesículas de membrana, respectivamente, de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sobreexpresando la proteína recombinante; finalmente, la síntesis de péptidos antigénicos derivados de CtpG.

## 5.2.1 Expresión de CtpG en *E. coli* y micobacteria

### ▪ Cepas, medios y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas en el desarrollo de este estudio se muestran en la tabla 5-3. Estas fueron almacenadas como stocks glicerizados a  $-80^{\circ}\text{C}$  y las micobacterias fueron revisadas usando la tinción de Ziehl- Neelsen.

Las cepas de *E. coli* se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB), caldo o agar, desde  $20-37^{\circ}\text{C}$  durante 12-20 horas, con agitación constante (180 rpm). Para la expresión de CtpG en *E. coli* se empleó Medio autoinductor [110]. *M. smegmatis* se cultivó en LB caldo o agar durante 3-5 días a  $37^{\circ}\text{C}$  y 80 rpm. *Mtb* fue cultivado durante 3-4 semanas a  $37^{\circ}\text{C}$  y 80 rpm en medio líquido 7H9 suplementado con OADC (albumina 0.5%, dextrosa 0.2%, catalasa 0.004% y ácido oleico 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), o medio sólido se empleó 7H10-OADC. El crecimiento de micobacterias en medio mínimo se realizó medio Sauton ( $\text{MgSO}_4$  0.05%,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0.05%, ácido cítrico 0.2%, glicerol 6%, L-asparagina 0.4%, citrato férrico amónico 0.005%, Tween 80 0.05% y  $\text{ZnSO}_4$  0.0001%).

Las cepas bacterianas transformadas con plásmidos fueron suplementadas con las siguientes concentraciones de antibióticos: ampicilina (Amp)  $100\mu\text{g}/\text{mL}$ , kanamicina (Km)  $25\mu\text{g}/\text{mL}$  e higromicina (Hyg)  $60\mu\text{g}/\text{mL}$ .

Cepa	Características	Fuente
<b><i>E. coli</i></b>		
<b>DH5a</b>	Deficiente en RecA y endA, permite selección Blanco/Azul sin necesidad de IPTG (lacZ $\Delta$ M15). Metaboliza L-arabinosa.	Thermo Fisher Scientific catalog [111]
<b>LMG194</b>	Cepa $\Delta$ ara714, que corresponde a gran parte del operón araBAD, por lo que puede transportar L-arabinosa, pero no metabolizarla. Asegura bajo nivel de expresión basal de genes tóxicos.	Thermo Fisher Scientific catalog, Guzman et al. 1995 [111,112]
<b>BL21(DE3)</b>	Expresión de proteínas inducidas por IPTG (No expresa proteasas OmpT y Ion)	Thermo Fisher Scientific catalog [111]
<b><i>M. smegmatis</i></b>		
<b>mc<sup>2</sup>155</b>	Micobacteria no patógena de crecimiento rápido, amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup> , km <sup>S</sup> .	Snapper et al. 1990 [113]
<b><i>M. tuberculosis</i></b>		
<b>H37Ra</b>	Micobacteria no virulenta de crecimiento lento, amp <sup>R</sup> , chx <sup>R</sup> , cb <sup>R</sup> .	Zheng et al. 2008 [114]

**Tabla 5-3. Lista de cepas bacterianas empleadas en este estudio.** Abreviaturas: RecA- Recombinasa A, endA-endonucleasa A, chx- cicloheximida, cb- carbenicilina, R-resistente, S-sensible

### ▪ Útiles génicos y cebadores

En estudios previos [115] se generaron dos útiles génicos para la expresión de CtpG en micobacteria (**pML01**) y en *E. coli* (**pML06**). pML01 es producto de la clonación de *ctpG* en el vector lanzadera **pMV261**, el que tiene un origen de replicación en *E. coli* y otro de micobacteria, además de un casete de resistencia a kanamicina; el vector también contiene el promotor *hsp60* que es inducible por calor. pML06 es el producto de la clonación de *ctpG* en el vector **pBAD A Myc His**, el que adiciona un tag de 6 histidinas en el carboxi terminal de la proteína y tiene un casete de resistencia a ampicilina, además presenta el promotor *araBAD* que es inducido por L-arabinosa. Adicionalmente en estudios previos [18] se diseñaron los cebadores que fueron usados en este estudio, para hacer PCR de comprobación, secuenciación y PCR en tiempo real (Tabla 5-4 y 5-5).

Cebador	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Fuente
<b>RTsigAdir</b>	CCTACGCTACGTGGTGGATT	Análisis qPCR gen Housekeeping <i>sigA</i> de <i>Mtb</i>	Novoa Aponte, L. (2016) [120]
<b>RTsigArev</b>	TGGATTTCCAGCACCTTCTCC		
<b>G-RT-Dir</b>	GGTCCAGCTGACCGTTGTAT	Análisis qPCR de <i>ctpG</i> de <i>Mtb</i>	
<b>G-RT-Rev</b>	ATTGCGCGTGAATACCAGAT	Análisis qPCR de <i>ctpG</i> de <i>Mtb</i> y comprobación <i>ctpG</i>	
<b>pBAD Comp Up</b>	TTTTTTGGGCTAACAGGAGG	Comprobación pBAD y <i>ctpG</i> . Secuenciación pML06	
<b>pBAD Comp down</b>	GCTGGAGACCGTTTAAACTC	Comprobación pBAD y secuenciación pML06	
<b>Tm903 A</b>	CTCGTGAAGAAGGTGTTGCT	Comprobación casete Km <sup>R</sup>	
<b>Tm903 B</b>	CCGACCATCAAGCATTTTAT	Comprobación casete Km <sup>R</sup>	
<b>PMV comp up</b>	CAGCGAGGACAACCTTGAGC	Comprobación pMV261 y secuenciación pML01	
<b>PMV comp down</b>	TATTTGATGCCTGGCAGTCG	Comprobación pMV261 y secuenciación pML01	

Tabla 5-4. Lista de cebadores en el desarrollo de este trabajo

Producto	ADN Molde	Cebadores	Denat inicial	Ciclos			# Ciclos	Elong final	Tamaño (pb)
				Denat	Anill	Elong			
<b>Comprobaciones</b>									
<i>ctpG</i>	pML06	pBAD comp Up- G RT Rev	94°C x 9 min	94°C x 30 s	55°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min	249
<b>pBAD</b>	pBAD	pBAD comp Up- pBAD comp down-	94°C x 9 min	94°C x 30 s	54°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min	172
<i>ctpG</i>	pML01	pMV comp Up- G RT Rev	94°C x 9 min	94°C x 1 min	58°C x 30 s	72°C x 30 s	35	72°C x 10 min	357
<b>Km<sup>R</sup></b>	pMV261	Tm903 A- Tm903 B	94°C x 9 min	94°C x 1 min	58°C x 1 min	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min	845
<b>PCR en tiempo real</b>									
<i>sigA</i>	cDNA	RTsigAdir- RTsigArev	95°C x 5 min	95°C x 10 s	58°C x 10 s	72°C x 15 s	39	---	208
<i>ctpG</i>	cDNA	G RT Dir- G RT Rev	95°C x 5 min	95°C x 10 s	58°C x 10 s	72°C x 15 s	39	---	180

Tabla 5-5. Condiciones de cada una de las PCR realizadas en este estudio

## 5.2.2 Análisis de transcripción del gen *ctpG* mediante PCR en tiempo real

Con el propósito de evaluar el efecto de iones metálicos en la expresión de *ctpG*; cultivos de *Mtb* H37Ra se sometieron a concentraciones subletales de cationes de metales pesados. Posteriormente, se extrajo el mRNA y se realizó la síntesis de cDNA para ensayos de PCR en tiempo real.

### ▪ Cultivos de *Mtb* H37Ra en presencia de sales de metales pesados

Inicialmente se cultivaron 400mL de *Mtb* H37Ra cepa silvestre en medio 7H9OADC hasta fase exponencial ( $OD_{595nm} \approx 0.4-0.6$ ). Se colectó el pellet celular por centrifugación a 8500 rpm por 15 minutos. El pellet se lavó dos veces con medio Sauton y se repartió en tubos falcón de 50mL. A cada tubo se adicionó 30 mL de medio Sauton y se suplementó separadamente con las siguientes sales:  $CuSO_4$  0.02 mM,  $CdCl_2$  0.04 mM y un blanco en ausencia de estos cationes. Bajo esta condición se realizó inducción por 3 horas a 37 °C. Posteriormente, el pellet celular se colectó el pellet celular por centrifugación.

### ▪ Extracción de RNA

La extracción del ARN se realizó con el método de *single-step* [116], el que consiste en separar el ARN del ADN después de una extracción en solución ácida que contiene tiocianato de guanidinio, acetato de sodio, fenol (Reactivo de TRIzol®) y cloroformo, seguido de centrifugación. En condiciones ácidas, el ARN total permanece en la fase acuosa, mientras que en la interfase o fase inferior orgánica permanece la mayor parte del ADN y proteínas. El ARN puede ser recuperado mediante precipitación con isopropanol (IPA) [116].

Para esto, inicialmente el pellet de las células cultivadas en presencia de sales de metales pesados, se lavó en  $H_2O$ -DEPC (0.1%) (dietilpirocarbonato) con el fin de inhibir ARNasas remanentes. Consecutivamente, se resuspendió el pellet en 1 mL del reactivo de TRIzol® (Invitrogen, USA) con adición de inhibidor de ARNasas (Ribolock). Para llevar a cabo la lisis celular, se transfirió la suspensión celular a tubos O-ring conteniendo 500  $\mu$ L de perlas de zirconio. Las células se lisaron mediante 3 pulsos de 2 minutos en Mini Beadbeater-16 (Biospec) con 1 minuto de reposo intermedio en hielo. Posteriormente, se adicionó 300  $\mu$ L 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. La fase acuosa resultante se precipitó toda la noche en presencia de isopropanol (IPA). Los pellet que corresponde al ARN precipitado, fueron secados al aire y resuspendidos en 50  $\mu$ L de  $H_2O$ -DEPC. Se confirmó la

integridad del ARN extraído en gel de agarosa al 2% en buffer TE 0.5X-DEPC. El RNA fue tratado con DNasa I de Thermoscientific, USA, durante 30 minutos a 37°C, para eliminar DNA genómico contaminante. La integridad del ARN se confirmó en gel de agarosa al 2% en buffer TE 0.5X-DEPC.

### ▪ Síntesis de cDNA

Después de comprobar la ausencia de DNA contaminante, se realizó la síntesis de cDNA a partir de 2 µg de ARN extraído usando el kit RevertAid First Strand cDNA Synthesis (Thermoscientific, USA) y 2 µL de oligonucleótidos aleatorios. El cDNA se alícuotó y almacenó a -20°C hasta su uso.

### ▪ PCR en tiempo Real

La PCR en tiempo real se realizó para cuantificar la transcripción de *ctpG* bajo concentraciones subletales de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y un blanco en ausencia de catión. Para esto se llevó a cabo la reacción utilizando el kit EXPRESS SYBR® GreenER™ qPCR SuperMix (Invitrogen, USA), con los cebadores G-RT-Dir y G-RT-Rev, en un termociclador CFX-96 (Biorad, USA). Los cebadores RTSigAdir y RTSigArev fueron usados para amplificar un segmento del gen (*sigA*) que codifica el factor sigma de la RNA polimerasa en *Mtb*, como gen de referencia interna. La cuantificación relativa se realizó determinando la eficiencia de los cDNA extraídos mediante el método de *Fit point* [117], usando cuadruplicados técnicos.

## 5.2.3 Expresión heteróloga de CtpG en *E. coli*: Optimización de parámetros de sobreexpresión.

La expresión de la proteína CtpG en el sistema heterólogo *E. coli* se realizó usando el vector pBAD A Myc His construido en un estudio previo [115]. Considerando que este estudio tenía como propósito obtener la proteína activa para caracterizar su actividad *in vitro*, las condiciones de sobreexpresión se evaluaron inicialmente en la fracción asociada a membrana, que a lo largo del estudio denominaremos también como fracción soluble (fracción de membrana y citoplasmática), para lo cual se tuvo en cuenta la cepa de *E. coli* que permitiera la expresión en dicha fracción. Consecutivamente, se llevó a cabo la preparación de células electrocompetentes, las que se transformaron con los plásmidos de interés. A partir de estas, se realizó un ensayo preliminar de expresión para determinar la cepa que permitiría expresar la proteína en la fracción soluble. Además se evaluó la cantidad de L-arabinosa como inductor, la temperatura y el tiempo de inducción

### ▪ **Preparación de células electrocompetentes**

Para seleccionar la cepa de *E. coli* que permitiera la expresión adecuada de CtpG recombinante en la fracción soluble, se emplearon las cepas BL21 (DE3) y LMG194, las que son cepas de expresión que por sus características genotípicas son ampliamente usadas [111].

Inicialmente, fue necesario preparar células electrocompetentes de cada cepa mediante el siguiente procedimiento [118]: en primer lugar se preparó un cultivo de 50 mL en medio LB, de cada cepa silvestre hasta fase exponencial ( $OD_{595nm} \approx 0.35-0.4$ ). Después se colectó el pellet celular de cada cultivo por separado, centrifugando por 10 minutos a 8500 rpm y 4°C. En adelante siempre se mantuvo el pellet celular en hielo y el fungible se pre-enfrió mínimo 30 minutos para ser utilizado. Posteriormente, se realizaron lavados del pellet celular con una solución estéril de glicerol al 10%, al inicio se usó 1 volumen de la solución para lavar, después se descartó el sobrenadante y se procedió a lavar nuevamente con la mitad del volumen inicial, y se realizaron 2 lavados más, cada vez usando la mitad del volumen anterior. Finalmente, las células competentes se disolvieron en 1mL de glicerol al 10%, y se alicuotaron adicionando 50  $\mu$ L a cada tubo. En ese momento se almacenaron a -80°C y fueron usadas en el menor tiempo posible.

### ▪ **Transformación de *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194 con pML06**

Los plásmidos pML06 y pBAD A Myc His, provenientes de la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$ , fueron purificados usando el Kit FavorPrep Plasmid Extraction mini kit de Favorgen Biotech corp y disueltos en 70  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O desionizada estéril, después fueron cuantificados en equipo Nanodrop a 280/260 nm.

Con el fin de seleccionar la cepa de *E. coli* que permitiera obtener la proteína recombinante CtpG en la fracción soluble se llevó a cabo la transformación de células electrocompetentes de las cepas *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194 con 100 ng de cada uno de los plásmidos, por la técnica de electroporación, mediante un pulso de 25 $\mu$ F, 2.5kV, 200 $\Omega$  y 4-5ms en celdas de 0.2 mm en equipo BIORAD. Inmediatamente después de la transformación se adicionaron 200 $\mu$ L de medio SOC a las células transformadas, las que se incubaron a 37°C con agitación por 2 horas. Seguidamente se plaqueó el producto de la transformación en medio sólido LB-agar suplementado con Amp 100 $\mu$ g/mL y se incubó toda la noche a 37°C hasta la aparición de colonias. 5 colonias fueron seleccionadas por placa, las que se confirmaron por PCR. De las colonias seleccionadas se hicieron stocks glicerinados y se almacenaron a -80 °C.

- **Ensayo preliminar de expresión de CtpG recombinante en *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194**

De manera aleatoria se seleccionó una de las colonias de cada cepa transformada con pML06, estas se cultivaron en 10 mL de medio LB, suplementado con Amp 100µg/mL hasta fase exponencial ( $OD_{595nm} \approx 0.35-0.4$ ). Seguidamente se realizó una dilución 1/10 en medio autoinductor con 0.05% de L-arabinosa y Amp 100µg/mL manteniendo la incubación a 25°C por 18 horas con agitación constante. Después de la inducción, se colectó el pellet celular por 5 minutos a 13000 rpm y 4°C, se realizaron dos lavados para retirar residuos del medio de cultivo con buffer de lavado (MOPS 10mM-tris pH 7.4, sacarosa 250 mM). Los pellets se resuspendieron en buffer de lisis (MOPS 10mM-tris pH 7.4, EDTA 1Mm, PMSF 0.3mM) y se trasvasaron a tubos O-ring conteniendo 100 µL de perlas de zirconio, y se sometieron a 10 pulsos de 1 minuto en Mini Beadbeater-16 (Biospec) y un reposo intermedio de 1 minuto en hielo. El lisado se centrifugó a 25000 g por 30 minutos y 4°C, las fracciones solubles fueron cuantificadas por el método de Bradford [119], mientras que las fracciones insolubles que están asociadas a cuerpos de inclusión fueron tratadas con buffer de solubilización (MOPS 10mM-tris pH 7.4, fluoruro de fenilmetilsulfonilo-PMSF 0.3mM, SDS 1% ) agitando en un rotor de tubos (Select BioProducts) por 18 horas a 4°C con agitación. Es importante resaltar, que el uso de SDS en esta parte del protocolo, fue con el único fin de solubilizar la proteína de la fracción insoluble y así apreciar la expresión de CtpG.

El material solubilizado se centrifugó a 25000 g por 30 minutos y 4°C, tomando únicamente el sobrenadante. Esta fracción fue cuantificada por el método de ácido bicinonínico (BCA). Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

- **Optimización de concentración de inductor, temperatura y tiempo de inducción**

A partir de la cepa *E. coli* LMG194, que expresó la proteína en la fracción soluble, se optimizaron los parámetros de sobreexpresión. Para cada ensayo de optimización se llevó a cabo el siguiente procedimiento de cultivo: se hicieron pre-inóculos de *E. coli* LMG194 transformada con el vector (pBAD) y transformada con pML06, en medio líquido LB suplementado con Amp 100µg/mL. Estos fueron cultivados toda la noche hasta fase exponencial ( $OD_{595nm} \approx 0.6$ ). Consecutivamente, se hizo una dilución 1/100 de los pre inóculos anteriores en 10 mL de medio autoinductor, sin L-arabinosa, manteniendo la incubación a 37°C hasta alcanzar un  $OD_{595nm} \approx 0.4-0.6$  (2-3h aproximadamente).

Para optimizar la concentración del inductor en *E. coli* LMG194::pML06, se evaluó cada una de las siguientes concentraciones de L-arabinosa: 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75 y 1%. La inducción se realizó durante 4 horas a 25°C. El pellet celular se colectó y se realizó la lisis como se describió con anterioridad.

Para optimizar la temperatura de inducción, se evaluaron cuatro temperaturas separadamente: 20°C, 25°C, 30°C y 37°C, con la adición de 0.3% de inductor, por 4 horas a 25°C, se continuó con el mismo protocolo de lisis.

Por último, para optimizar el tiempo de inducción se probaron tiempo desde 0 a 22h, realizando la incubación en presencia de 0.3% de inductor a 20°C y 180 rpm. Al finalizar cada tiempo se colectó el pellet celular, se lavó con buffer de lavado y se incubó el pellet seco a -20°C hasta que se completaran todos los cultivos. Finalmente, se realizó el protocolo de lisis.

Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

#### **5.2.4 Purificación parcial de CtpG**

Un litro de Medio auto inductor fue suplementado con 0.3% de L- arabinosa e inoculado con 25mL de pre inculo de *E. coli* LMG194::pML06 en fase exponencial, de acuerdo a los protocolos anteriormente descritos. Después de 18 horas de inducción a 20°C, se colectó el pellet celular y se realizó la lisis celular obteniéndose las fracciones soluble e insoluble. Todo el procedimiento de purificación se realizó a 4°C para evitar la degradación de la proteína. La fracción soluble se centrifugó a 100000 g por 60 minutos a 4°C (Sorvall™ WXFloor Ultra Centrifuge, Thermoscientific, USA); el sobrenadante se descartó, mientras que el pellet que corresponde a la fracción de membrana se homogenizó en buffer A (Tris 25mM, sacarosa 100 mM y 1mM PMSF; pH 7), se cuantificó la proteína por Bradford y se ajustó a una concentración de 3mg/mL, las fracciones de membrana se almacenaron a -20°C hasta su uso. Adicionalmente, las fracciones de membrana se solubilizaron en 0.75% de dodecil maltosido (DDM) por 1 hora con agitación a 4°C y fueron tratadas de acuerdo al método de purificación de Mandal A K. et al, 2001 [120].

Con la finalidad de purificar la proteína por cromatografía de afinidad, la proteína solubilizada se centrifugó a 100000 g por 60 minutos a 4°C y el sobrenadante se incubó por 1 hora a 4°C con resina de Ni-NTA (Qiagen, USA). Posteriormente, la cromatografía se desarrolló utilizando 10 volúmenes

de imidazol 5mM en buffer (Tris 25mM, sacarosa 100 mM, NaCl 500mM, DDM 0.01%, DTT 1mM, lecitina de soya 0,01% y 1mM PMSF; pH 8) y a continuación la columna se lavó con 10 volúmenes de imidazol 20 mM en buffer B. Finalmente la proteína se eluyó con 10 volúmenes de imidazol 150 mM en buffer C (Tris 25mM, sacarosa 100 mM, NaCl 50mM, DDM 0.01%, DTT 1mM, lecitina de soya 0,01% y 1mM PMSF; pH 8) y 10 volúmenes de imidazol 300 mM en buffer C. Las fracciones de elución de 150mM de imidazol se concentraron en centricon (Amicon® Ultra 2mL Ultracel® 50 kDa. Merck millipore) y se diluyó el imidazol hasta 1 mM con buffer C.

Alternativamente, la fracción insoluble fue solubilizada en condiciones denaturantes en presencia del buffer D (Tris 50 mM, urea 2 M, DTT 5mM, Tritón X-100 1%, EDTA 5mM, PMSF 1mM pH 7.4 y urea 8 M; pH 7.4). Las fracciones solubilizadas se incubaron en resina de Ni-NTA (Qiagen, USA) por 24 horas, para después eluir la proteína con 150mM de imidazol en buffer D.

Todas las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot.

#### ▪ **SDS-PAGE e Inmunoblot**

Las fracciones de proteína total fueron analizadas por SDS-PAGE y Western blot, usando 20-50 µg de proteína por pozo. La electroforesis se realizó con geles de poliacrilamida al 10% con buffer de corrido (Tris 25mM, glicina 192 mM y SDS 0.1%, pH 8.3) a 100 V constante por 1 hora y media. Los geles se tiñeron en solución de azul de Coomassie coloidal al 0.002% por 2-16 horas.

Por otra parte, se realizó la transferencia usando membrana de nitrocelulosa (MicronSep, MSI) durante 1 hora a 150 mA constante o toda la noche a 40 V constante a 4°C, en buffer de transferencia (CAPS 10mM, metanol 10%, pH 11). Posteriormente, se verificó el procedimiento, incubando las membranas en solución rojo ponceau al 0.1%. El bloqueo de la membrana se realizó con buffer PBS 1X- leche en polvo descremada al 5%, durante 1 hora a temperatura ambiente con agitación o toda la noche a 4°C. Posteriormente, se incubó la membrana con anticuerpo primario contra la etiqueta de histidinas (6x-His Epítipo Tag Antibody Rabbit, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:1000, durante 2 horas con agitación. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffer PBS 1X- Tween 20 al 0.05% para retirar residuos de anticuerpo no unido y se incubó nuevamente con anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate, Thermo Fisher Scientific) en una dilución 1:1000. Se realizaron 3 lavados de 5 minutos con buffer PBS 1x- Tween 20 al 0,05% y se procedió a revelar la membrana con reactivo 3-amino-9

etilcarbazol (Sigma-Aldrich) disuelto en DMF y en buffer acetato de sodio (0,1 M y pH 5,2), usando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> como sustrato.

### 5.2.5 Expresión heteróloga de CtpG en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155

Para determinar la especificidad iónica de CtpG, se evaluó el efecto de su expresión en las cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformadas con pML01 y el vector vacío (pMV261). Para esto, se realizaron ensayos de viabilidad celular en células completas y ensayos de actividad ATPasa en membranas enriquecidas con CtpG.

#### ▪ Extracción de vesículas de membrana

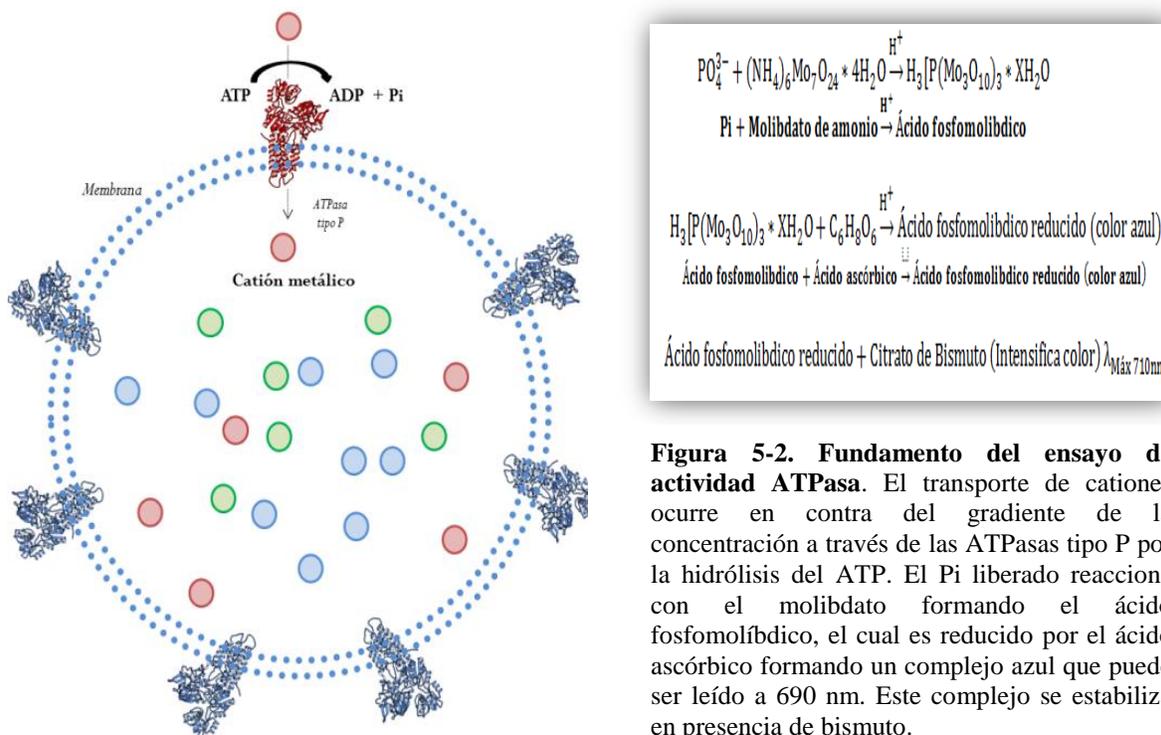
La extracción de membrana plasmática se realizó desde cultivos de 1 L de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en fase exponencial, individualmente expresando CtpG (pML01) y el vector vacío (pMV261), estos se indujeron por 3 horas a 45°C; seguidamente se colectó el pellet celular a 8500 rpm por 10 minutos a 4°C, este se lavó dos veces con buffer de lavado (MOPS 10mM-KOH pH 7.4, 0.08g/mL sacarosa). Cada gramo de pellet seco se disolvió en 2 mL de buffer de lisis (MOPS 10mM-KOH pH7.4, 0.3mM EDTA, 1mM PMSF, lisozima 1 mg/mL) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación moderada. Seguidamente, se realizaron 4 pulsos de 2 minutos en Minibeat Beater, con 2 minutos de reposo intermedio en hielo. La fracción soluble que está asociada a la membrana fue separada de la insoluble centrifugando a 25000 g por 30 minutos a 4°C. Posteriormente, las membranas presentes en el sobrenadante se colectaron mediante centrifugación diferencial por 1 hora a 100000 g y 4°C. Las membranas fueron resuspendidas en buffer de lavado con adición de PMSF y cuantificadas por el método de Bradford [119] usando albumina de suero bovino como patrón. Las membranas se disolvieron a una concentración final de 1 µg/µL, fueron alicuotadas y almacenadas a -80°C hasta su uso.

### 5.2.6 Ensayos de actividad ATPasa

Los ensayos de actividad enzimática se realizaron sobre vesículas de membrana extraídas de dos cepas: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformadas con pML01 (expresa CtpG) y el vector pMV261.

El ensayo de actividad enzimática consiste en evaluar la cantidad de PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> o Pi que se libera de la hidrólisis del ATP durante el ciclo catalítico. Para esto se usó el método de Fiske-Subbarow [121] con las modificaciones de Cariani [122]. Esta técnica se fundamenta en la formación de ácido fosfomolibdico por interacción del Pi liberado con molibdato, en medio ácido. El producto es reducido en presencia de ácido ascórbico formando el ácido fosfomolibdico reducido, el que es un

complejo de color azul que puede ser leído a 690 nm. Posteriormente se adiciona citrato de bismuto para estabilizar el complejo formado y secuestrar el molibdato restante, que puede reaccionar con el Pi liberado por hidrólisis espontánea del ATP, después de la reacción enzimática [122].



**Figura 5-2. Fundamento del ensayo de actividad ATPasa.** El transporte de cationes ocurre en contra del gradiente de la concentración a través de las ATPasas tipo P por la hidrólisis del ATP. El Pi liberado reacciona con el molibdato formando el ácido fosfomolibdico, el cual es reducido por el ácido ascórbico formando un complejo azul que puede ser leído a 690 nm. Este complejo se estabiliza en presencia de bismuto.

El ensayo se realizó con 8-10  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana en un volumen de reacción de 50  $\mu\text{L}$ , en presencia de cada uno de los cationes a evaluar:  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  a una concentración final de 10  $\mu\text{M}$ , en el buffer de reacción (40 mM MOPS pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM KCl, 3 mM  $\text{MgCl}_2$ , 5 mM  $\text{NaN}_3$ , 0.25 mM  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  y 0.02% Brij-58). Las reacciones se iniciaron mediante la adición de ATP (3 mM), luego se incubaron por 30 minutos a 37°C. La reacción se finalizó por adición de 100  $\mu\text{L}$  de la solución de parada (3% ácido ascórbico, 0.5% molibdato de amonio y 3% SDS en medio ácido) incubando nuevamente por 20 minutos a -20°C. Para aumentar la sensibilidad del método añadieron 150  $\mu\text{L}$  de citrato de bismuto y citrato de sodio al 3.5% en medio ácido y se incubó por 10 minutos a 37°C. La absorbancia del complejo formado fue leída a 690nm usando un lector de elisa iMark™ Microplate Absorbance Reader (Bio-Rad). Se usó una curva de calibración de Pi de 0-33  $\mu\text{M}$  de Pi a partir de un stock 1mM de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ . Una unidad de actividad enzimática (U) se reportó como nmol de Pi liberado/ (mg de proteína\*minutos de reacción).

### 5.2.7 Ensayos de viabilidad celular: Determinación de la concentración mínima inhibitoria (MIC)

Los ensayos de viabilidad celular consisten en analizar el efecto en el crecimiento bacteriano en presencia de concentraciones variables de cationes metálicos, para lo que se determinan cambios en el crecimiento por medidas de absorbancia a OD<sub>590nm</sub>.

En este estudio se evaluó el efecto en la viabilidad celular, frente a diferentes concentraciones de cationes divalentes de metales pesados, en cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformadas con pML01 y el vector vacío (pMV261). Para este efecto, se emplearon cada una de las siguientes sales CuSO<sub>4</sub> (0.75-4 mM), CdCl<sub>2</sub> (0.035-0.3 mM), NiSO<sub>4</sub> (0.4-2 mM), MnSO<sub>4</sub> (10-100 mM), ZnSO<sub>4</sub> (1-4 mM), CoCl<sub>2</sub> (0.4-1.2 mM) y Pb (CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub> (1-3.5 mM), esta última se usó a pH 5.5 para prevenir su precipitación [123], las demás sales se usaron a pH 7.4.

El ensayo se realizó en placas de elisa de 96 pozos, partiendo de precultivos crecidos hasta fase exponencial, los que se diluyeron a un OD<sub>590nm</sub>≈0.05 en medio LB con adición de Km (25µg/mL) y Tween 80 al 0.05%. De esta dilución se adicionaron 100 µL a cada pozo y 100 µL de cada sal estéril previamente disuelta en el mismo medio. Como control positivo de crecimiento se usó la dilución bacteriana en ausencia del catión, mientras que el control negativo fue la dilución bacteriana en presencia de isoniazida. Las placas se incubadas a 37°C por 72 horas, posteriormente, se midió el crecimiento bacteriano a OD<sub>590nm</sub>.

### 5.2.8 Optimización de parámetros cinéticos

Se evaluaron los parámetros cinéticos para la estimulación de CtpG con Cd<sup>2+</sup>. Se determinaron cinéticas enzimáticas para la variación de la cantidad de proteína, pH y temperatura de reacción. Inicialmente, se evaluó la concentración de proteína de membrana desde 0-20 µg. Para evaluar el efecto del pH de la reacción se empleó 20 µg de proteína y cada uno de los siguientes buffers: MES-KOH pH 5.5; MES-KOH pH 6.2; MOPS-KOH pH 6.8; MOPS-KOH pH 7.4; TRIS-Cl pH 8 y TRIS-Cl pH 9. Por último, se optimizó la temperatura de reacción para lo cual se usó 20 µg de proteína. Las temperaturas evaluadas fueron 4, 18, 37 y 60 °C. Todas las reacciones de optimización se realizaron por 30 minutos y se bloquearon por adición de la solución de parada (3% ácido ascórbico, 0.5% molibdato de amonio y 3% SDS en medio ácido).

### 5.2.9 Determinación de las constantes cinéticas

Para determinar las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$ , para  $Cd^{2+}$  y  $Cu^{2+}$ , se llevó a cabo la reacción enzimática con variaciones de la concentración del metal desde 0-10  $\mu M$ . La reacción se realizó con 10  $\mu g$  de proteína a pH 7.4 a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, se bloqueó la reacción por adición de la solución de parada. La actividad enzimática de CtpG fue estimada por la sustracción de la actividad del recombinante frente a la actividad del vector, esto se hizo por triplicado técnico, en dos muestras independientes.

### 5.2.10 Síntesis de posibles péptidos con capacidad antigénica

Los péptidos antigénicos derivados de CtpG fueron sintetizados por la técnica de Síntesis de Péptidos en Fase Sólida (SPFS) de manera manual o automática, usando la estrategia Fmoc/t-butil en resina Rink Amida con sustitución 0,6mmol/g (Fmoc-Rink Amide AM resin, Iris Biotech GMBH, tamaño de partícula 100-200mesh, 75-150 $\mu m$ ), para lo que se usaron L- $\alpha$ - aminoácidos.

La síntesis manual se llevó a cabo mediante el siguiente procedimiento: se pesaron 200 mg de resina y se depositó en jeringa plástica conectada a un colector de residuos al vacío. Se realizaron pasos de desprotección, lavado y acople, a continuación se describen los dos primeros:

Procedimiento	Solución/Solvente	Numero de lavados	Tiempo de lavado (min)	Función
<b>Desprotección</b>	Piperidina 20%- Tritón X-100 1% en dimetilformamida (DMF)	2	7	Desprotección de la resina o aminoácido
<b>Lavados</b>	DMF	3	1	Eliminación de posibles contaminantes
	Isopropanol (IPA)	1	1	
	Azul de Bromofenol 1%	1	2	Interactúa de forma no destructiva con los aminos libres siendo un indicador cualitativo del porcentaje de acoplamiento
	DMF	2	1	Eliminación de posibles contaminantes
	Diclorometano (DCM)	1	1	Hincha la resina y elimina restos de solventes

**Tabla 5-6. Lavados de la resina Fmoc-Rink Amida**

Seguidamente se hizo el acople del primer aminoácido empleando como activadores del grupo carboxilo: HBTU, TBTU y TCTU, para acople sencillo, doble y triple respectivamente, y en caso

de ser necesario se empleó DIC como cuarto aditivo de acople, usando siempre 3 excesos de activador y del aminoácido correspondiente. Adicionalmente, se usó OXIMA como aditivo para evitar racemizaciones y DIPEA como base. Después del acople de cada aminoácido se realizó test de Ninhidrina, prueba que es destructiva, por lo que se tomó 1 µg de resina-péptido en tubo de polipropileno de 750 µL y se incubó a 100°C por 5 minutos; una coloración amarilla indicó que el acople se había realizado exitosamente, contrariamente una coloración azul indicaba que aún habían aminos libres, por lo que era necesario reforzar el acople cambiando de activador como se describió con anterioridad. Para aminoácidos que estuvieran acoplados a prolina se realizó test de cloranilo que permite detectar aminas primarias libres, una coloración marrón indicó aminos libres, mientras que una coloración amarilla indicó acople completo.

La síntesis automática se realizó en sintetizador Liberty Blue<sup>™</sup> Automated Microwave Peptide Synthesizer (CEM Corp., Matthews, NC, USA) siguiendo los mismos parámetros de desprotección y usando como activador DIC y OXIMA como aditivo.

Los péptidos obtenidos fueron separados de la resina en solución de clivaje A (TFA 95%, TIS 2,5% y agua desionizada 2,5%) para aquellos péptidos que no presentaban triptófano, cisteína o metionina en su secuencia; para los que sí los presentaban, se empleó la solución de clivaje B (92,5%, TIS 2,5% y agua desionizada 2,5%, y DOT 2,5%) para evitar su oxidación. Se incubó a temperatura ambiente, durante 1 hora con agitación en la solución de clivaje. Los péptidos fueron precipitados con 4 lavados de éter frío y se centrifugaron a 3500 rpm por 5 min, dejando evaporar el sobrenadante dentro de la cabina. Inmediatamente, se resuspendió la masa del péptido en agua desionizada para su análisis.

### 5.2.11 Purificación y caracterización de los péptidos

#### ▪ Cromatografía de alta resolución en fase reversa RP-HPLC

Los péptidos sintéticos se disolvieron en agua desionizada, se congelaron y liofilizaron para su análisis por cromatografía de alta resolución en fase reversa RP-HPLC (JASCO Corp., Tokyo, Japan) en una columna XBridge<sup>™</sup> BEH C18 (100 × 4.6 mm, 3.5 µm) (Water Corp., Milford, MA, USA) empleando solvente B (Acetonitrilo con 0,05% TFA) frente a solvente A (agua con 0.05% TFA), usando un programa de gradiente de 0–70 % con una tasa de flujo de 1 mL/min durante 8 minutos. Péptidos que dieron un solo pico en el cromatograma fueron desalinizados en columnas de Sephadex G-10 basados en el principio de exclusión molecular, en tanto que aquellos que presentaron más de un pico fueron purificados en columnas Sepak C-18 (Clean-Up<sup>®</sup> CEC18153

extraction columns, UCT, Bristol, PA, USA) en fase reversa usando acetonitrilo como solvente de 0-100%, para ambos procedimientos se empleó 10mg de péptido. Los productos obtenidos fueron nuevamente analizados por RP-HPLC para determinar la fracción en la que se encontraba el péptido y verificar su pureza. Este análisis se realizó con 100  $\mu$ L de muestra (5  $\mu$ L de péptido a una concentración de 2mg/mL y 95  $\mu$ L de agua desionizada).

#### ▪ **Espectrometría de masas ESI-MS**

La masa de los péptidos se analizó por Espectrometría de Masas y el método de ionización por electrospray (LCMS-2020 ESI-MS, Shimadzu Corp., Kyoto, Japan), este análisis se realizó con 100  $\mu$ L de muestra (10  $\mu$ L de péptido a una concentración de 2mg/mL y 90  $\mu$ L de agua desionizada). Para esto se usó un Programa de 5-100 % de acetonitrilo durante 14 minutos con detector MS PDA 75 mm.lcm.

#### ▪ **Dicroísmo circular**

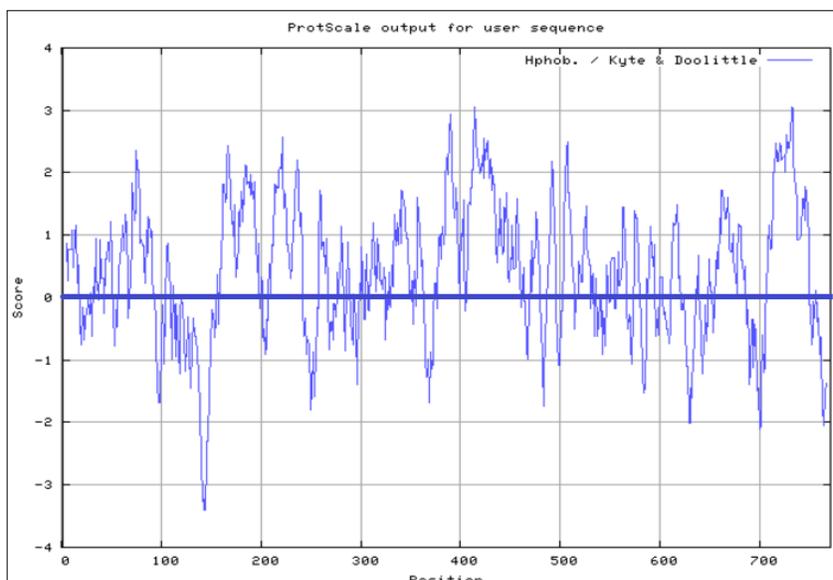
Con la finalidad de determinar la estructura secundaria de los péptidos se hicieron diluciones de 2mg/mL de péptido y se mezcló 35  $\mu$ L de la solución anterior con 215  $\mu$ L con Trifluoroetanol TFE al 30%, cuya función es eliminar moléculas de agua en la estructura peptídica, forzando la reconstitución de los puentes de hidrógeno intramoleculares y generando la conformación de estructura secundaria correspondiente que puede ser  $\alpha$ -hélice, hoja  $\beta$ , poliprolina II, giro  $\beta$  o no determinado. El equipo usado fue un espectrofotómetro de dicroísmo circular JASCO (J-815 Jasco Corporation, Japan) acoplado a un controlador Peltier CDF4265/15 para control de temperaturas. Adicionalmente, el equipo requiere de los programas SpectraMeasurement® y SpectraAnalysis®. En la medición se usaron cubetas de cuarzo de 1 mm, tiempo de respuesta de 2 segundos con intervalos de 0,5nm, con un ancho de banda de 1nm, sensibilidad estándar, velocidad de barrido de 100nm/min y 3 acumulaciones del registro, obteniendo elipticidades molares de 190nm a 250nm a 20°C, el software hace la predicción usando el algoritmo Contin y la base de datos SP37A.

## 6. Resultados y discusión

En estudios bioinformáticos realizados previamente en nuestro grupo de investigación BBMM, se predijo que CtpG, una ATPasa tipo P<sub>1B</sub>, es transportadora de metales pesados, cuyos posibles sustratos pueden ser Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>+2+</sup> y/o Co<sup>2+</sup> [16]. Teniendo en cuenta que varios de estos sustratos son micronutrientes para la micobacteria, genera interés conocer la función biológica que desempeña CtpG, puesto que se conoce su inducción en respuesta a condiciones de latencia e infección [10]. En un trabajo de investigación previo desarrollado por nuestro grupo [115], se generaron dos plásmidos recombinantes para la expresión de CtpG en *E. coli* y micobacterias, también se realizó análisis de expresión génica en *Mtb* H37Ra y ensayos de viabilidad celular y actividad ATPasa en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, estudiando los cationes divalentes: Zn<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>. En la presente investigación se propuso continuar con este estudio, adicionando el análisis con Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, cationes que antes no habían sido estudiados para CtpG y que son sensados por CmtR, el regulador transcripcional de CtpG [23].

### 6.1 Análisis *in silico* de CtpG

El gen *ctpG* o *cmtA* está anotado como *rv1992c* en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv [99], el que está constituido por 2316 pares de bases entre las posiciones 2'234.991 y 2'237.306. *ctpG* codifica una proteína de membrana de masa molecular de 79.277 kDa conformada por 771 aminoácidos, cuyo punto isoelectrico predicho es 5.56. Se clasifica como una enzima hidrolasa de anhídrido ácido 3.6.3, del tipo de ATPasas tipo P, específicamente transportadora de cationes de metales pesados (P<sub>1B</sub>). El perfil de hidrofobicidad obtenido mediante el servidor *ProtScale* (Figura 6-1), muestra que gran parte de los residuos de aminoácidos son hidrofóbicos (con valores positivos) ya que la secuencia de CtpG está constituida por un alto porcentaje de residuos apolares como lo son alanina (A), valina (V), leucina (L) y glicina (G), lo que es coherente teniendo en cuenta que es una proteína con varios dominios hidrofóbicos embebidos en la membrana plasmática.



**Figura 6-1. Perfil de hidrofobicidad de CtpG.** Escala de hidrofobicidad de Kyte y Doolittle donde los aminoácidos hidrofóbicos tienen un puntaje positivo y aminoácidos hidrofílicos un puntaje negativo, mediante el servidor ProtScale de Expasy.

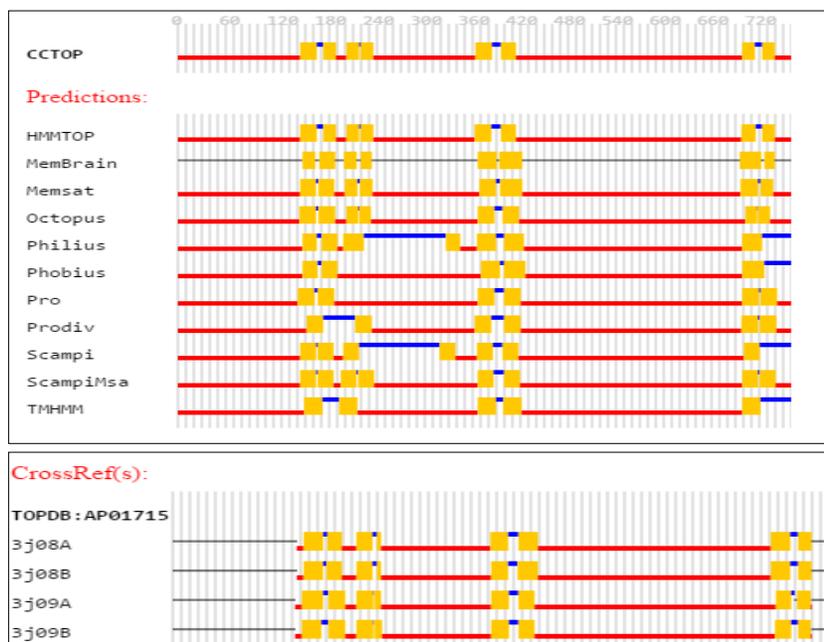
### 6.1.1 Topología de CtpG

La topología de membrana para CtpG fue predicha a partir de la estructura primaria mediante los servidores bioinformáticos *CCTOP* (10 métodos consenso) [101] y *Phyre*<sup>2</sup> [124], y la estructura terciaria con *TMDet* y *PPM server* (desde modelos 3D en formato pdb) (Ver Tabla 6-1). Se predijeron 8 segmentos transmembranales (TMS), además el servidor *CCTOP* comparó la secuencia primaria con secuencias homólogas reportadas en la base de datos de topología de proteínas de membrana *TOPDB* [125,126], encontrando que CtpG posee 8 TMS predichos, que también están presentes en CopA, una Cu<sup>+</sup> ATPasa de *A.fulgidus* (3j08/3j09) (Ver Figura 6-2).

En estudios previos hechos por nuestro grupo, se predijo que CtpG presenta una topología de membrana tipo I (Ver Figura 1-9), la que corresponde a bombas transportadoras de metales pesados (HM) que presentan 8 segmentos transmembranales (TMS) enumerados como A, B y 1-6; estas difieren de bombas transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos que presentan una topología de membrana tipo II, constituidas por 10 TMS [16].

Zonas transmembranales predichas									
Servidor	1	2	3	4	5	6	7	8	
<b>Con base a la estructura primaria de CtpG</b>									
<b>CCTOP</b>	HMMTOP	155-175	184-199	213-228	231-246	374-394	407-425	709-726	735-750
	MemBrain	158-173	179-198	210-225	231-244	378-401	405-433	707-733	738-750
	Memsat	155-174	178-197	211-226	230-245	380-400	406-433	708-729	733-748
	Octopus	154-174	178-198	213-227	229-243	378-398	409-429	714-728	730-744
	Philius	158-175	182-201	209-234	338-355	377-400	411-435	710-734	-
	Phobius	158-176	182-201	382-405	411-437	710-737	-	-	-
	Pro	152-172	177-197	378-398	411-431	710-730	733-753	-	-
	Prodiv	163-183	224-244	374-394	411-431	709-729	732-752	-	-
	Scampi	155-174	177-196	209-228	330-349	377-396	409-428	712-731	
	Scampi Msa	155-174	177-196	206-225	228-247	378-397	411-430	710-729	732-751
	TMHMM	160-182	204-226	378-400	410-432	710-732	-	-	-
<i>Phyre</i> <sup>2</sup>	155-173	180-198	210-225	229-244	380-398	409-425	707-728	732-749	
<b>Con base a la estructura terciaria de CtpG</b>									
<b>TMDet</b>	155-175	179-199	210-230	223-243	374-394	402-422	705-725	726-746	
<b>PPM server</b>	168-174	183-191	381-395	404-418	711-724	731-738	-	-	

**Tabla 6-1. Predicción de segmentos transmembranales (TMS) de CtpG.** Se realizó la predicción de TMS con base a la estructura primaria por los servidores CCTOP y *Phyre*<sup>2</sup>, también con base a la estructura terciaria desde modelos en formatos pdb con los servidores TMDet y PPM server



**Figura 6-2. Predicción de segmentos transmembranales (TMS) de CtpG mediante el servidor CCTOP.** CCTOP recopila información desde 10 predictores, además compara la secuencia de CtpG frente a proteína homóloga reportada en TOPDB. Los rectángulos amarillos representan los segmentos transmembranales.

## 6.1.2 Predicción de motivos funcionales de CtpG

El análisis de motivos funcionales realizado en el servidor *InterPro*, confirmó que se trata de una proteína con dominios transmembranales, específicamente una ATPasa tipo P de la subfamilia P<sub>1B</sub> transportadora de metales pesados, la que contiene dominios funcionales característicos como el dominio de fosforilación (P), el dominio de unión a nucleótido (N) y el dominio actuador (A). El servidor *InterPro* no permitió obtener información sobre la especificidad iónica de CtpG, ni sobre los motivos funcionales propios de las ATPasas tipo P. Para esto, se realizó un alineamiento múltiple de CtpG con las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb*. Como resultado (Ver Figura 6-2 y Tabla 6-2), a lo largo del alineamiento se ubicaron los 9 motivos característicos de las ATPasas tipo P reportados en sistemas eucariotas [92].

Estos motivos presentaron en CtpG algunas sustituciones respecto a los motivos consenso (Ver Tabla 6-2): los motivos VGD y ATD [92] favorecen los cambios conformacionales que requiere la enzima en los estados E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> durante el ciclo catalítico [16,92]. El motivo TGES es muy conservado en las ATPasas tipo P [92], el que se encuentra ubicado en el dominio A entre los TMS 2 y 3, y funciona como un motivo fosfatasa a partir del residuo de treonina en su secuencia [16,89]. El motivo APCAL determina la especificidad del ión y se ubica al finalizar el TMS 4 [16,92]. Es común que este motivo se encuentre conservado en las ATPasas transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos [16], mientras que en las Cu<sup>+</sup> ATPasas y otras que transportan metales pesados se encuentra como CPCAL, donde los dos residuos de cisteína son necesarios para la coordinación del metal [92]. El motivo DKTGTLT es muy conservado y se encuentra en el dominio P [92,127], el residuo de aspartato de este motivo es defosforilado por el motivo TGES [15,16,89,92]. Los últimos cuatro motivos importantes para la unión del ATP son el motivo AAAL que facilita el enlace al ATP, mientras que los motivos DELR y MLTGD participan en la catálisis de la fosforilación del motivo DKTGTLT; por otra parte, el motivo DPPR es importante para transferir el grupo fosforil desde el ATP a la enzima. Los motivos MLTGD y TAMVGDGVNDAPALAAADLGIAM, están asociados a la coordinación del Mg<sup>2+</sup> como cofactor [16]. Finalmente, el motivo TAMVGDGVNDAPALAAADLGIAM se denomina motivo bisagra, el que provee la flexibilidad necesaria para realizar el cambio conformacional durante la translocación del ión [16,92,127].

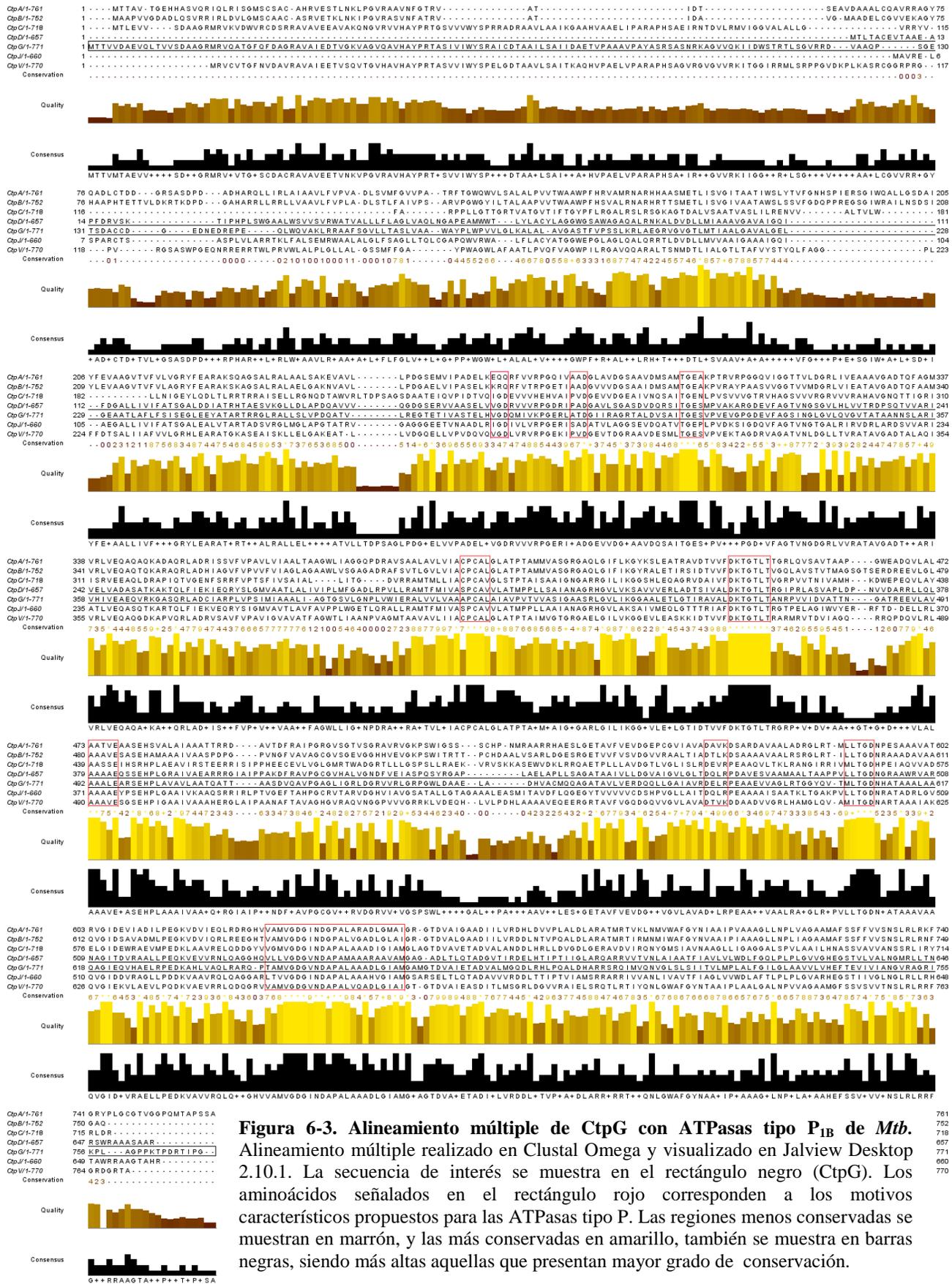


Figura 6-3. Alineamiento múltiple de CtpG con ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb*. Alineamiento múltiple realizado en Clustal Omega y visualizado en Jalview Desktop 2.10.1. La secuencia de interés se muestra en el rectángulo negro (CtpG). Los aminoácidos señalados en el rectángulo rojo corresponden a los motivos característicos propuestos para las ATPasas tipo P. Las regiones menos conservadas se muestran en marrón, y las más conservadas en amarillo, también se muestra en barras negras, siendo más altas aquellas que presentan mayor grado de conservación.

Las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> tienen un dominio adicional de unión a metales pesados (HMBD, por sus siglas en inglés *Heavy Metals Binding Domain*) [105,128], el que se ubica cerca al amino terminal; de secuencia CXXC [129,130], siendo X cualquier aminoácido. Este dominio se ha asociado a funciones de regulación alostérica y suministro de Cu<sup>+</sup> desde chaperonas donantes en las Cu<sup>+</sup>ATPasas [105,128,130,131]. Sin embargo, se ha encontrado que no es esencial para la función de la enzima, sino que juega un papel de auto inhibición en ausencia de metales pesados [128,132]. De las 7 ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb*, solamente CtpA [17] y CtpB presentan este motivo (GMSCSAC y GMSCAAC, respectivamente).

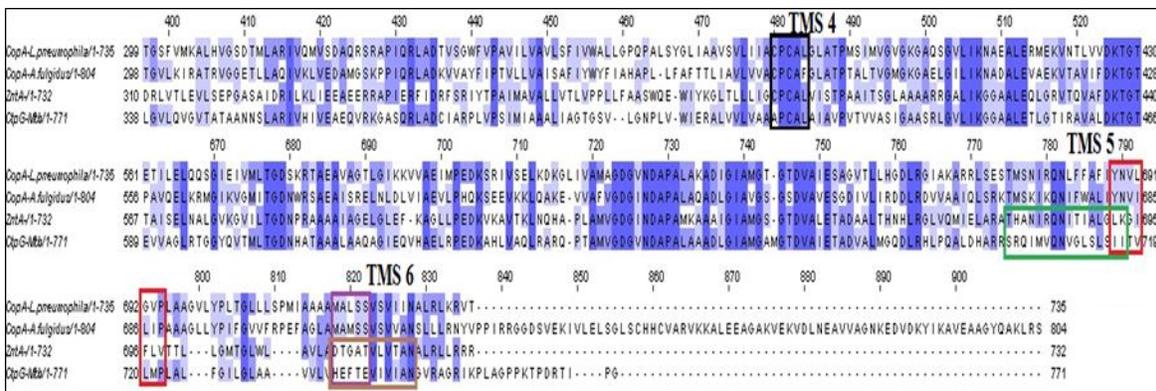
Motivo	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Consenso	PGD	PAD	TGES	PEGL	DKTGTLT	KGAPE	DPPR	MVTGD	VAVTGDGVNDSPALKKADIGVAM
CtpG	VGD	ATD	TGES	APCAL	DKTGTLT	AAALE	DELR	MLTGD	TAMVGDGVNDAPALAAADLGIAM

**Tabla 6-2. Predicción de motivos funcionales de CtpG.** A partir del alineamiento múltiple con las demás ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb*, fue posible predecir los motivos funcionales de CtpG, los que fueron seleccionados de manera manual a lo largo del alineamiento y corroborados con las secuencias consenso reportadas por Thever en el 2009 [92]. En negro se muestran los aminoácidos conservados respecto a la secuencia consenso y en rojo aquellos que no se conservan en la secuencia de interés.

### 6.1.3 Aproximación a la especificidad iónica de CtpG

Los TMS 4- 6 tienen residuos de aminoácidos que determinan la especificidad iónica [133], así por ejemplo las Cu<sup>+</sup>ATPasas presentan el motivo de unión a metal CPC en la TMS 4, el motivo YN(X)<sub>4</sub>P en la TMS 5 y el motivo MXXSS en la TMS 6 [131]. En el caso de las Zn<sup>2+</sup>ATPasas, se conserva el motivo de unión a metal de la TMS 4, pero difiere en los motivos T(X)<sub>5</sub>QN(X)<sub>7</sub>K y DXG(X)<sub>7</sub>N, ubicados en las TMS 5 y 6 respectivamente [131,134,135]. Consecuentemente, el motivo CPC es fundamental en la unión a Cu. En un estudio previo sobre mutaciones de las dos cisteínas de este motivo en CopA de *E. coli*, se demostró que su ausencia conllevaría a perder la actividad enzimática de Cu ATPasa [136].

Con la finalidad de hacer una aproximación a la especificidad iónica de CtpG, se realizó un alineamiento de los sitios de unión a metal en los TMS 4-6 con ATPasas caracterizadas: CopA de *L. pneumophila* (3RFU) [97], CopA de *A. fulgidus* (3j09) [104] y ZntA de *S. sonnei* (3UMV) [105]. Las dos primeras son Cu<sup>+</sup> ATPasas y la última una Zn<sup>2+</sup> ATPasa. (Figura 6-4).



**Figura 6-4. Predicción de la especificidad iónica de CtpG.** Se muestra el alineamiento múltiple de los sitios de unión a metal en los TMS 4-6. En blanco se muestran residuos no conservados, en azul claro aquellos poco conservados y en azul oscuro los residuos conservados en las 4 secuencias. El rectángulo negro muestra motivo de unión en la TMS 4; los rectángulos rojos y púrpura muestran el motivo de unión en la TMS 5 y 6, respectivamente para las Cu<sup>+</sup>ATPasas, mientras que los rectángulos verde y marrón muestran el motivo de unión en la TMS 5 y 6, respectivamente para las Zn<sup>2+</sup>ATPasas.

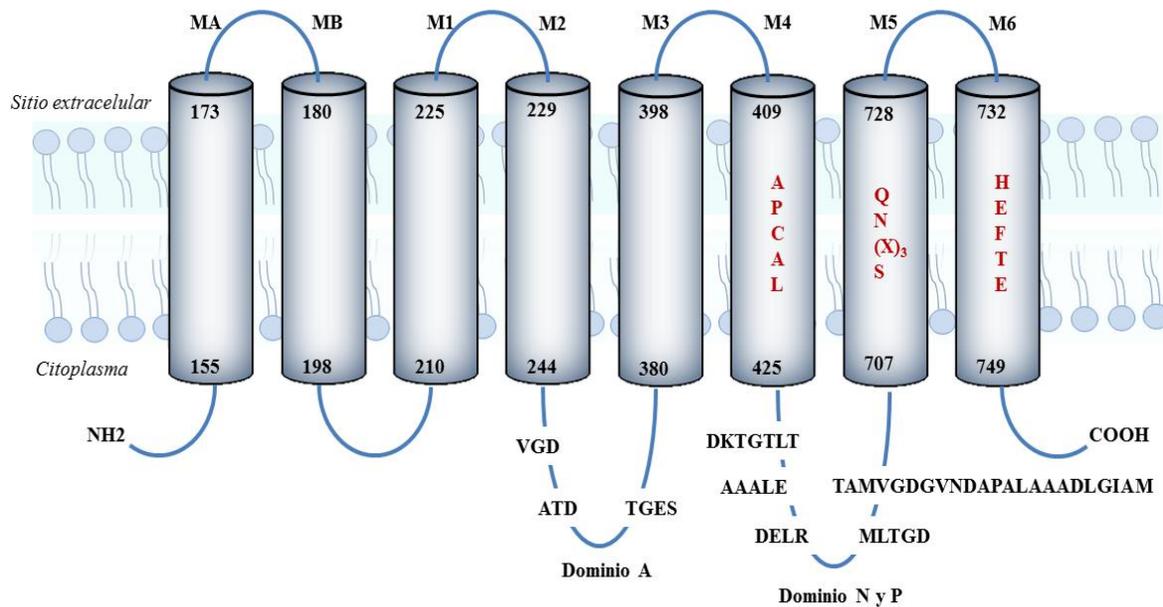
El anterior alineamiento (Ver Figura 6-4) permitió identificar que en el sitio de unión a metal dentro del TMS 4, el primer aminoácido es cisteína para las ATPasas comparadas, mientras que CtpG presenta una sustitución por alanina. En los TMS 5 y 6 se evidencia que los sitios de unión a metal no son conservados en CtpG (QN(X)<sub>3</sub>S y HE(X)<sub>2</sub>E, respectivamente [18]). Adicionalmente, las Co<sup>2+</sup>ATPasas presentan el motivo **HEGT** en el TMS 6 [130,135,137], el que es más cercano al motivo **HEFTE** de CtpG en la misma región transmembranal.

Por otra parte, la mayoría de ATPasas tipo P<sub>1B</sub> dependientes de Cu, que se conocen, transportan el metal en su estado reducido (Cu<sup>+</sup>) debido al ambiente reductor intracelular [78]. En este tipo de ATPasas, seis residuos de los motivos de unión a metal están relacionados con la coordinación del mismo [130,138]. Dos residuos de cisteína en el TMS 4 y uno de tirosina en el TMS 5 coordinan el primer catión; un residuo de asparagina en el TMS 5, y residuos de metionina y serina en el TMS 6 coordinan el segundo catión. En cada sitio se forma una geometría trigonal plana, indicando que por cada ciclo catalítico es posible el transporte de dos iones de Cu<sup>+</sup> [131,139]. El Cu<sup>+</sup> es considerado un ácido de Lewis blando según el concepto ácido-base de Pearson [140]. De acuerdo a esta teoría los ácidos blandos tienden a interactuar con bases blandas, como por ejemplo los grupos sulfhidrilo [141], los que están presentes en los residuos de cisteína.

CtpG presenta un residuo de cisteína en el motivo APCAL, además en el TMS 6 los residuos de histidina y fenilalanina son bases de Lewis intermedia y blanda respectivamente de acuerdo a la misma teoría [141] (Ver figura 6-5). Estos, probablemente pueden interactuar con algún catión

metálico de la misma naturaleza, no obstante, se desconoce la interacción respecto a los demás residuos. De lo anterior se deduce que la especificidad iónica de CtpG puede estar determinada por los residuos que constituyen los sitios de unión a metal, no obstante, el alineamiento realizado no provee suficiente información sobre la especificidad iónica de esta bomba, por lo que se hace necesario el desarrollo de un componente experimental.

La figura 6-5 se construyó con base a la predicción de la topología de membrana, motivos funcionales y sitios de unión a metal de CtpG anteriormente descritos.



**Figura 6-5. Topología de membrana predicha para CtpG.** Cada barra representa una alfa hélice transmembranal predicha mediante el servidor *Phyre*<sup>2</sup>. Los motivos funcionales se señalan en las regiones citoplasmáticas, así mismo los sitios de unión a metal en los TMS 4, TMS 5 y TMS 6, los que también se denominan M4, M5 y M6. El amino y carboxi terminal se ubican en el citoplasma.

### 6.1.4 Estructura secundaria y terciaria de CtpG

La predicción de la estructura secundaria de CtpG se realizó usando el servidor *Jpred4*. Este realizó el modelamiento a partir del alineamiento de CtpG con 170 ATPasas tipo P caracterizadas y anotadas en el PDB, principalmente  $\text{Cu}^+$  y  $\text{Zn}^{2+}$  ATPasas. Para las  $\text{Zn}^{2+}$  ATPasas se encontró un porcentaje de identidad del 35%, mientras que para las  $\text{Cu}^+$  ATPasas se obtuvo un 34% de identidad. Esto muestra que CtpG presenta características estructurales similares para ambos tipos de ATPasas, sin embargo, CtpG es sutilmente más idéntica a las  $\text{Zn}^{2+}$  ATPasas. Los resultados de la estructura secundaria se muestran en la figura 6-6, ilustrando estructuras de  $\alpha$ -hélice, hojas  $\beta$  y regiones aleatorias predichas para CtpG.

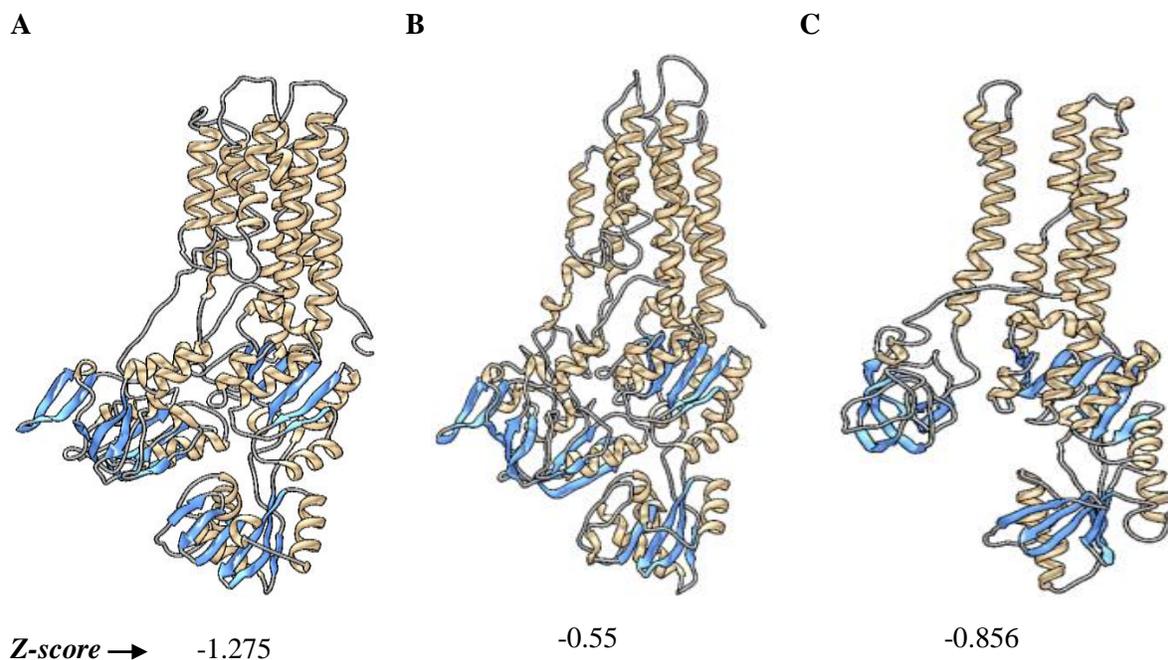
La predicción de la estructura terciaria de CtpG se realizó sometiendo la secuencia de aminoácidos a los predictores del *Protein model portal* ([www.proteinmodelportal.org](http://www.proteinmodelportal.org)). Como resultado se obtuvieron 3 modelos a partir de los predictores *Phyre<sup>2</sup>* y *Swiss-Model* (Figura 6-7), los que realizan el modelamiento por homología (Ver tabla 6-3).



**Figura 6-6. Predicción de estructura secundaria de CtpG.** Predicción de la estructura secundaria de CtpG mediante el servidor *Jpred 4*. En rojo se muestra la predicción de estructura de  $\alpha$ -hélice, en verde estructura de hoja  $\beta$  y en línea delgada negra regiones aleatorias. Además se muestra predicción de accesibilidad al solvente al 0, 5 y 25%. Aquellas regiones expuestas al solvente se representan con -, y aquellas que no son accesibles se representan con B.

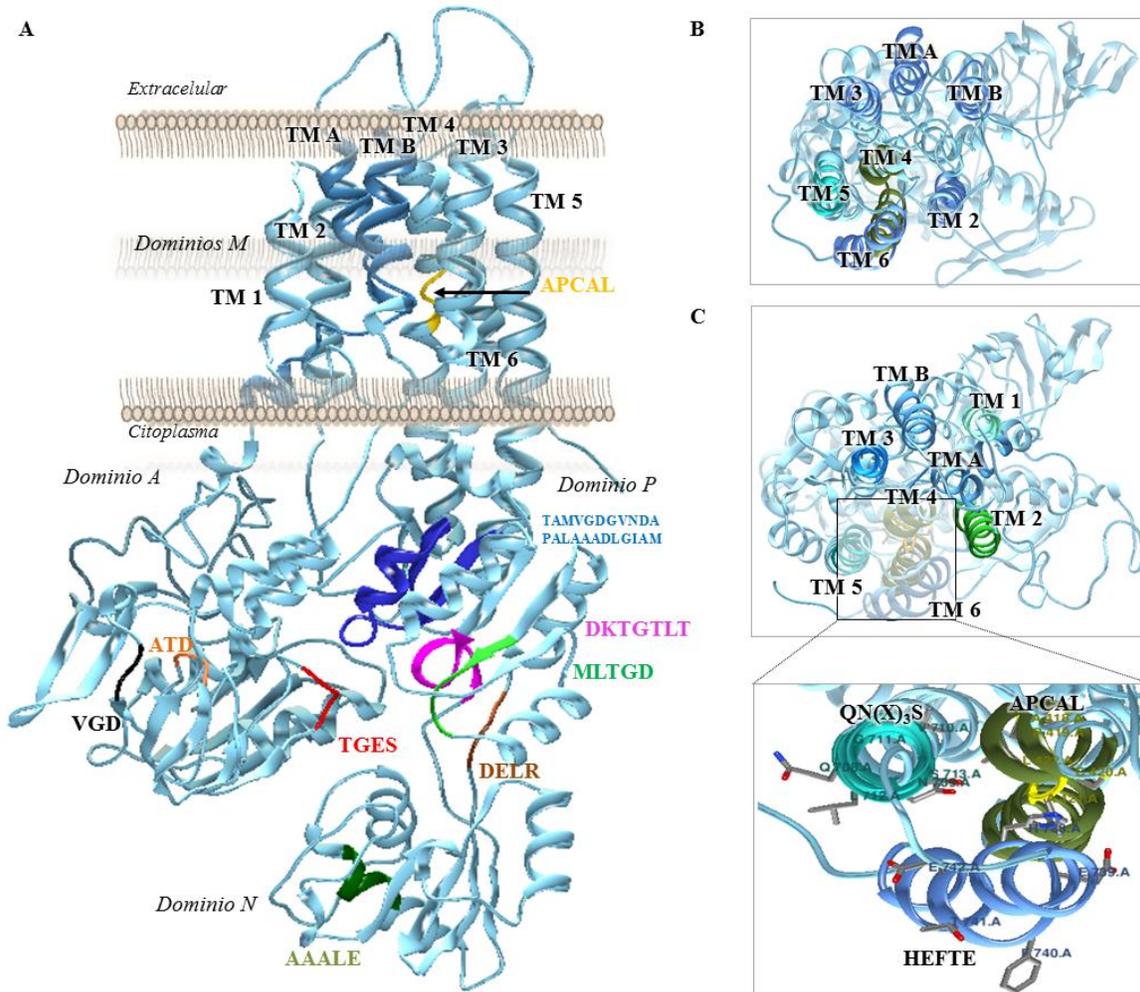
Cada modelo fue corregido y validado con algunas de las herramientas de *What If Web Interface*, que incluyen una valoración inicial de la calidad estereoquímica del modelo, refinamiento de la estructura y validación del z-score de la distribución de Ramachandran. El primer modelo obtenido mediante el servidor *Phyre*<sup>2</sup> usó como plantilla a CopA de *Archaeoglobus fulgidus* (PDB ID 3j09, estructura determinada por microscopía electrónica con una resolución de 2.7 Å [104]), con una cobertura del 96% (18-760 aa) y 31% de identidad. Este modelo corregido dio como resultado un z-score de -1.27. El segundo modelo obtenido mediante el servidor *Swiss model* empleó la misma plantilla anteriormente descrita, con una cobertura del 95.6 % (21-757 aa) y 31.42% de identidad. Para este modelo corregido se obtuvo z-score de -0.55. El último modelo se obtuvo también mediante el servidor *Swiss model* usando como plantilla una H<sup>+</sup>ATPasa de *Neurospora crassa* (PDB ID 1MHS, estructura determinada por microscopía electrónica con una resolución de 8 Å [142]), con una cobertura del 70.37% (213-719 aa) y 25 % de identidad. El z-score de este modelo corregido fue de -0.856.

Los valores de z-score recomendados en la herramienta de distribución de Ramachandran, van de -1 a 0, para que las posibles combinaciones de los ángulos diédricos *Psi* y *Phi* de los aminoácidos que conforman una estructura, se ubiquen principalmente en las regiones favorecidas y permitidas. Además en este rango se encuentran conformaciones de  $\alpha$ -hélice más regulares. Valores iguales o menores a -4 indican una muy baja calidad del modelo y serios problemas con la estructura [108]. En consecuencia, los modelos obtenidos mediante *Swiss model* y *Phyre*<sup>2</sup> son apropiados, sin embargo, el segundo modelo obtenido mediante *Swiss model* fue realizado usando como plantilla una H<sup>+</sup>ATPasa. Por esta razón son más confiables los otros dos modelos, los que usaron como plantilla CopA, una ATPasa tipo P<sub>1B</sub> transportadora de metales pesados, teniendo en cuenta que CtpG pertenece a esta clasificación. Adicionalmente, el servidor *Swiss model* evalúa por defecto la calidad de los modelos mediante el Q-mean, que es un valor de la calidad estructural de un modelo. Para los modelos 1 y 2 este valor equivale a -4.99 y -5.42 respectivamente, los que son muy bajos en comparación con proteínas citosólicas. Esto se debe a que la estabilidad estructural de las proteínas de membrana es favorecida por los lípidos de la bicapa, por lo que estas no siguen la misma distribución de proteínas en solución y por lo tanto los valores de Q-mean serán más lejanos a 0 [143].



**Figura 6-7. Predicción de la estructura terciaria de CtpG.** Se realizó modelamiento por homología usando como plantilla CopA de *Archaeoglobus fulgidus* (PDB ID 3j09, estructura determinada por microscopía electrónica con una resolución de 2.7 Å [104]) mediante servidor *Phyre*<sup>2</sup> (**A**) y *Swiss model* (**B**). también se empleó como plantilla una H<sup>+</sup>ATPasa de *Neurospora crassa* (PDB ID 1MHS, estructura determinada por microscopía electrónica con una resolución de 8 Å [142]), mediante el servidor *Swiss model* (**C**).

En los modelos A y B (Figura 6-7) se encontró que habían sido modelados los 9 motivos funcionales de CtpG, sin embargo, se localizaron algunos errores: en el modelo A, 7 de los 8 TMS predichos fueron modelados; el TMS 1 no fue modelado (Figura 6-8b). En el caso del modelo B, aunque los 8 TMS predichos fueron modelados, el TMS 1 no fue modelado de la manera apropiada ya que se encontró atrás de los TMS A y B, los que constituyen el dominio de soporte S (Figura 6-8c). El TMS 1 hace parte del canal de transporte (Dominio T), el que está constituido por los TMS 1-6, por lo que se espera que en el modelo estén cerca. Con el propósito de detallar más específicamente estas predicciones, se construyó la figura 6-8 a partir del primer modelo de *Swiss model*. En él se muestran los motivos funcionales, la topología de membrana y los sitios de unión a metal predichos para CtpG.



**Figura 6-8. Modelo de la estructura terciaria de CtpG.** (A) Modelo 3D de CtpG obtenido por homología desde el servidor *Swiss model* usando como molde CopA de *A. fulgidus* (PDB ID 3j09, estructura determinada por microscopía electrónica con una resolución de 2.7 Å [104]). En la región transmembranal se muestran los dominios hidrofóbicos S en azul oscuro (TM A y B) y T (TM 1-6); en la región citoplasmática se muestra los dominios A, N y P, también los motivos característicos de las ATPasas tipo P en CtpG. Regiones transmembranales de CtpG desde la cara externa de la membrana mediante servidor *Phyre*<sup>2</sup> (B) y *Swiss model* (C). La parte inferior en (C) muestra específicamente las TM 4-6 desde la cara externa de la membrana. Las TM 4-6 están probablemente asociadas con el transporte del metal, por lo que se muestran los motivos directamente implicados en la TM 4 (APCAL), TM 5 (QN(X)<sub>3</sub>S) y TM 6 (HEFTE).

## 6.2 Componente experimental

Debido a la importancia que CtpG muestra durante la infección [10,21,22], se hace necesario el desarrollo de un componente experimental, que permita elucidar algunas características funcionales de esta enzima. Para esto, se realizaron ensayos de expresión del gen *ctpG* de *Mtb* mediante la técnica de RT-qPCR. En segundo lugar, se evaluó las condiciones de expresión y purificación de la proteína en el sistema *E. coli*. Consecutivamente, se realizó una aproximación a la especificidad

iónica mediante ensayos de viabilidad celular y actividad ATPasa en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Finalmente, se llevó a cabo la síntesis de péptidos antigénicos derivados de la proteína de interés por la metodología SPFS, lo que responde a los objetivos propuestos.

### 6.2.1 Análisis de la expresión génica de *ctpG*

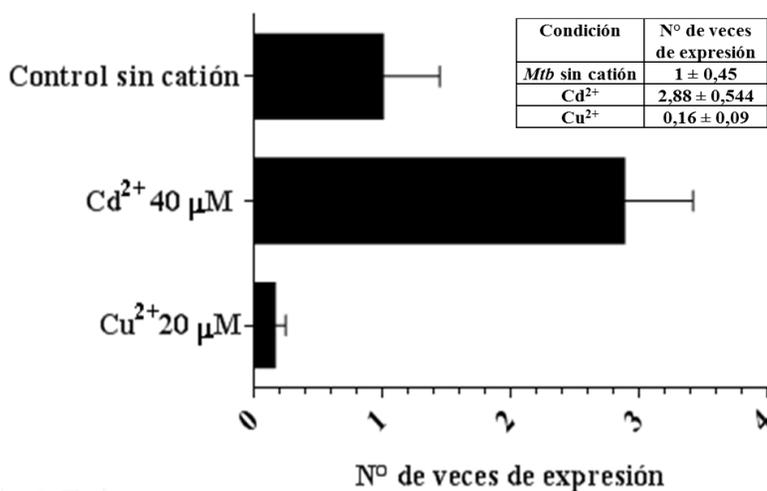
Se ha reportado que *ctpG* se induce 20 veces en la cepa virulenta *Mtb* H37Rv, cuando es cultivada en medio Sauton y suplementada con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  [22], mientras que se induce 2 veces cuando es suplementada con 500  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  [21]. Adicionalmente, mediante ensayos de movilidad electroforética se encontró que 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  es una concentración suficiente para inducir la disociación CmtR-ADN *in vitro* (CmtR es el regulador transcripcional de *ctpG*) [24]. En contraste, en estudios previos realizados por nuestro grupo de investigación [115], se había determinado que *ctpG* se inducía aproximadamente 38 veces en presencia de 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cu}^{2+}$  y 3 veces con 400  $\mu\text{M}$  de  $\text{Zn}^{2+}$  en la cepa atenuada *Mtb* H37Ra. Sin embargo, la inducción de CtpG por  $\text{Cd}^{2+}$  no había sido evaluada hasta el momento. Por ello se decidió analizar la expresión de *ctpG* bajo concentraciones subletales de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  (40  $\mu\text{M}$  y 20  $\mu\text{M}$  respectivamente [20]) en la cepa silvestre *Mtb* H37Ra.

El análisis de RT-qPCR mostró que *ctpG* de *Mtb* H37Ra se induce casi 3 veces en presencia de 40  $\mu\text{M}$  de  $\text{Cd}^{2+}$  respecto a células control cultivadas en condiciones estándar. También se observó que *ctpG* se induce 0,16 veces en presencia de concentraciones subletales de  $\text{Cu}^{2+}$  (20  $\mu\text{M}$ ) (Figura 6-9). Estos resultados indican que *ctpG* es inducido más activamente por condiciones subletales de  $\text{Cd}^{2+}$ , mientras que en presencia de una concentración subletal de  $\text{Cu}^{2+}$ , no hay activación transcripcional estadísticamente significativa. No obstante, durante la primera hora de infección en modelo murino, el interior fagosomal de los macrófagos tiene altas concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  (426  $\mu\text{M} \pm 393$ ) [12], por lo que bajo esta condición hostil y teniendo en cuenta que las concentraciones de  $\text{Cu}^{2+}$  previamente evaluadas son cercanas a la fisiológica [22,115], es razonable que se induzca la expresión de *ctpG*, como uno de los mecanismos que emplea la micobacteria para mantener su homeostasis [76]. Se ha determinado que *Mtb* puede expresar varias proteínas encargadas de esta función: MctB, es una porina que ayuda a la reducción de Cu intracelular [50], también las ATPasas tipo P, CtpA [17] y CtpV [22], se han asociado al eflujo de  $\text{Cu}^+$ .

Por otra parte, se ha demostrado la presencia de  $\text{Cd}^{2+}$  en los macrófagos alveolares humanos, transferidos desde la contaminación del aire, el que es utilizado por estas células como parte de su arsenal bactericida [79]. Aunque la concentración de Cd intrafagosomal no ha sido plenamente establecida, se conoce que en personas fumadoras la concentración de Cd en macrófagos alveolares

es de  $3,4 \pm 0,5$  ng/10<sup>6</sup> células, mientras que en personas no fumadoras esta concentración es aproximadamente  $1,3 \pm 0,2$  ng/10<sup>6</sup> células [79].

Por consiguiente, es factible considerar a Cd<sup>2+</sup> como un posible sustrato de CtpG, teniendo en cuenta que una vez se ha expresado la enzima, el Cu<sup>2+</sup> también podría ser transportado, ya que CtpG posee los elementos estructurales mínimos para reconocer ambos metales. En el presente trabajo, la activación de la transcripción del gen *ctpG* por Cd<sup>2+</sup> fue evidente; sin embargo, en la activación de la transcripción de *ctpG* por el Cu<sup>2+</sup> no se obtuvieron datos estadísticamente significativos, por lo que es necesario realizar otros ensayos biológicos y bioquímicos para determinar con mayor certeza que catión activa el gen, y que catión es preferentemente transportado por CtpG.



**Figura 6-9. Cuantificación de la expresión del gen *ctpG* de *Mtb*.** Los niveles de transcripción de *ctpG* fueron estudiados bajo concentraciones subletales de Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup> y un blanco sin catión en la cepa silvestre *M. tuberculosis* H37Ra. Para la cuantificación relativa la transcripción de *ctpG* fue normalizada con *sigA* como gen de referencia interna mediante el método de *Fit Point* [117]. Se determinó la eficiencia de amplificación de *ctpG* y *sigA*, con valores de 2,11 y 2,13 respectivamente [20,115]. Estos ensayos se realizaron por cuadruplicado técnico, las barras de error representan el error estándar de la media (SEM).

## 6.2.2 Expresión de CtpG recombinante en *E. coli*

Las proteínas de membrana poseen dominios hidrofóbicos que se estabilizan en presencia de los lípidos de la bicapa. Por tal razón son poco solubles en ambientes acuosos, lo que trae como consecuencia la formación de agregados como cuerpos de inclusión [144,145]. En la producción de este tipo específico de proteínas, se requiere de sistemas de expresión que favorezcan su solubilización y que en lo posible posean la maquinaria apropiada para el correcto plegamiento e inserción en la membrana plasmática, ya que bajo estas condiciones se obtendrán proteínas enzimáticamente activas.

Los cuerpos de inclusión son agregados insolubles de proteína desnaturalizada y enzimáticamente inactiva. Estos se encuentran en el citoplasma y en el espacio periplásmico. Generalmente se constituyen de proteínas no nativas que se expresan de manera heteróloga en altos niveles, como por ejemplo proteínas hidrofóbicas. Las ventajas de obtener una proteína en esta forma, es que se obtiene en grandes cantidades, por lo que puede ser usada para obtener anticuerpos. También por su forma de agregado celular presenta baja degradación y resistencia al ataque proteolítico. Su solubilización se realiza a partir del uso de agentes caotrópicos como urea y cloruro de guanidina, en presencia de un agente reductor, lo que permite su purificación, y posterior proceso de renaturalización eliminando gradualmente los agentes caotrópicos [146].

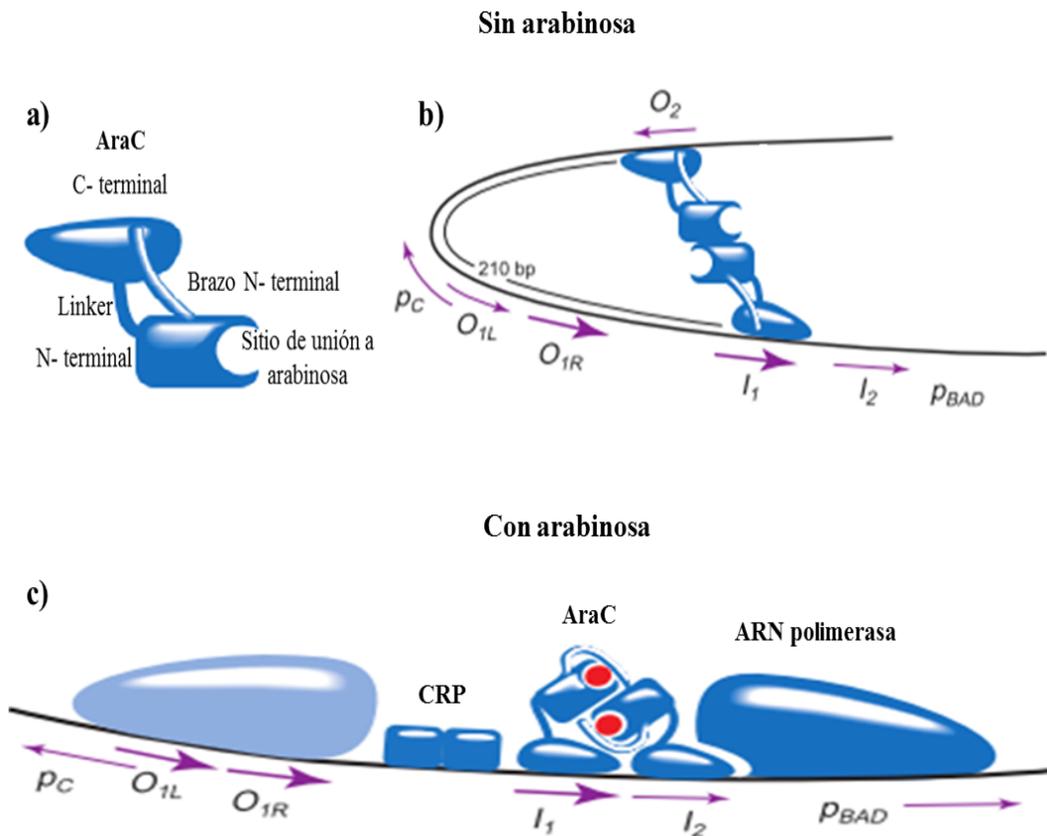
En una segunda parte de este estudio se propuso optimizar las condiciones de sobreexpresión de CtpG recombinante en *E. coli*, teniendo como finalidad realizar su caracterización *in vitro*, por lo que era necesario obtenerla en la fracción asociada a membrana, que a lo largo del estudio denominaremos también como fracción soluble. Para esto, fue necesario caracterizar la cepa de expresión, la concentración de inductor, temperatura y tiempo de inducción que permitieran obtener la proteína en dicha fracción. El Medio autoinductor usado durante esta parte del trabajo es altamente nutritivo, permitiendo obtener cultivos con densidades ópticas muy altas [110], lo que es favorable para su posterior purificación.

### **6.2.3 CtpG se expresa en la fracción soluble de *E. coli* LMG194**

Para hacer la expresión de CtpG en *E. coli* se empleó el sistema pBAD A Myc His, obteniendo el plásmido recombinante pML06 [115]. La expresión en el vector pBAD es regulada por el promotor *araBAD*, presente en el operón arabinosa (Figura 6-10). Este es inducido por L-arabinosa y modulado por represión catabólica [112]. El operón arabinosa está constituido por sitios de control y genes estructurales que codifican para enzimas necesarias en el metabolismo de este monosacárido (AraB-D). Específicamente la proteína AraC dimérica, la que se encarga de la regulación positiva y negativa del operón. Para esto, se enlaza a tres elementos regulatorios: *O1*, *O2* e *I* [147,148].

En ausencia de arabinosa, la transcripción ocurre a bajos niveles [112], pues AraC en su forma dimérica se enlaza al sitio *O2* ubicado dentro del gen *araC*, 210 pares de bases corriente arriba del promotor *araBAD*. Al tiempo, la otra subunidad de AraC se enlaza al sitio *O1* en la región promotora, generando un loop en el ADN, lo que impide la transcripción por parte de la ARN polimerasa.

En presencia de arabinosa, esta se une a AraC, la que sufre un cambio conformacional, de manera que la unión con el sitio O<sub>2</sub> es reemplazada por sitio I del promotor, por lo que la transcripción inicia. El enlace de AraC a I y O<sub>1</sub> es estimulado por el receptor de proteína cAMP (CRP). La expresión basal puede ser reducida en presencia de glucosa, ya que reduce los niveles de cAMP. Además AraC regula la transcripción de transportador de arabinosa AraE [112,148,149].



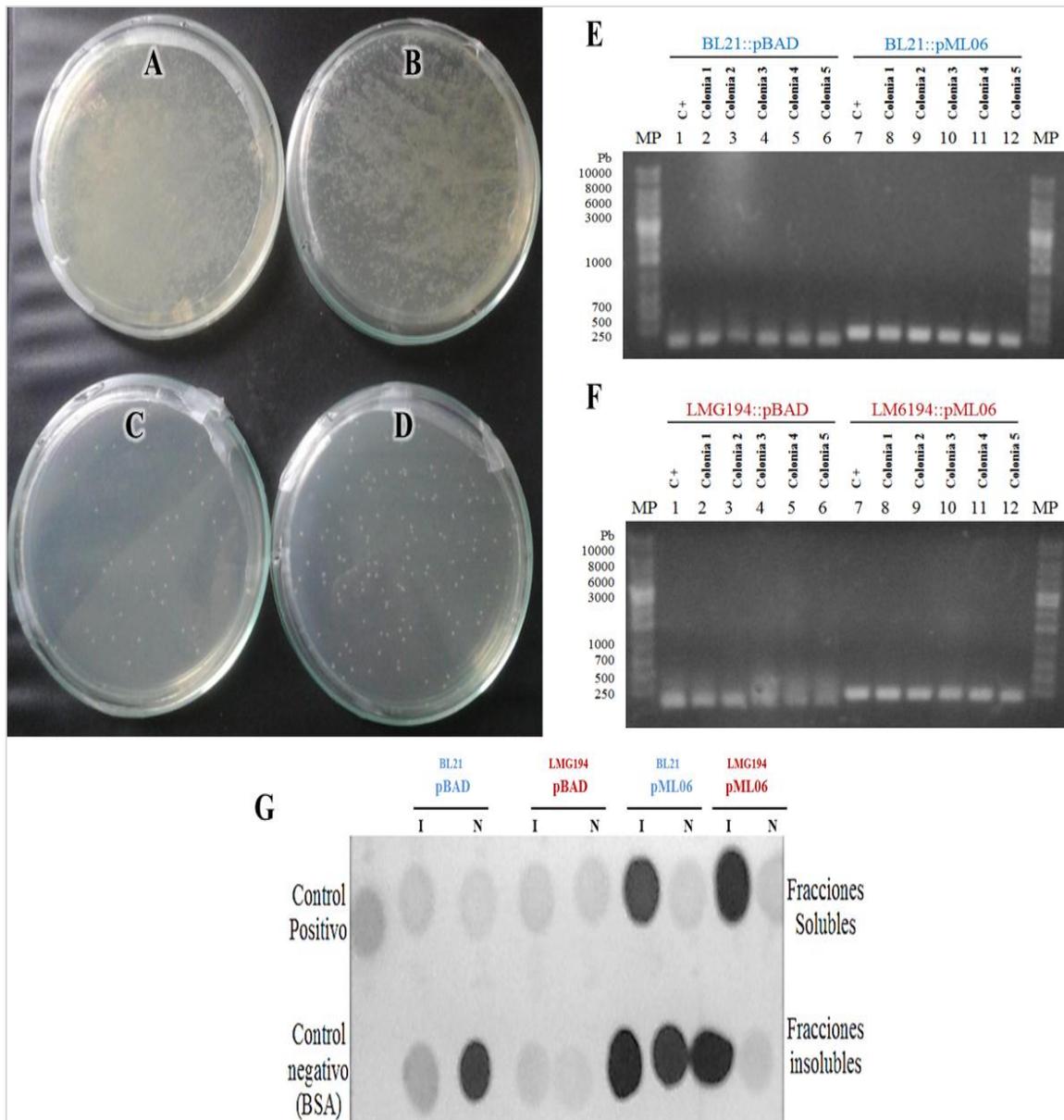
**Figura 6-10. Regulación del promotor *araBAD* por L-arabinosa.** a) Proteína AraC en su forma monomérica, b) proteína AraC en su forma dimérica unida a sitios de control O<sub>2</sub> e I<sub>1</sub> en ausencia de L-arabinosa, formando un bucle de 210 pb en el ADN y c) en presencia de L-arabinosa se genera un cambio conformacional en AraC, por lo que se une a sitio regulatorio I<sub>2</sub>, en consecuencia la ARN polimerasa inicia la transcripción. Tomado y editado de ref [149].

Con la finalidad de obtener CtpG recombinante en la fracción soluble, se evaluaron las cepas de *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194. La primera es deficiente en dos proteasas: ompT e lon, las que pueden degradar proteínas recombinantes [150]; la segunda carece de gran parte de la secuencia del operón *araBAD*, por lo que puede transportar L-arabinosa, pero no metabolizarla [111,112]; ambas cepas pueden crecer en medio mínimo. Seguidamente se realizó la transformación de cada una de ellas con los plásmidos pML06 y pBAD A Myc His como control.

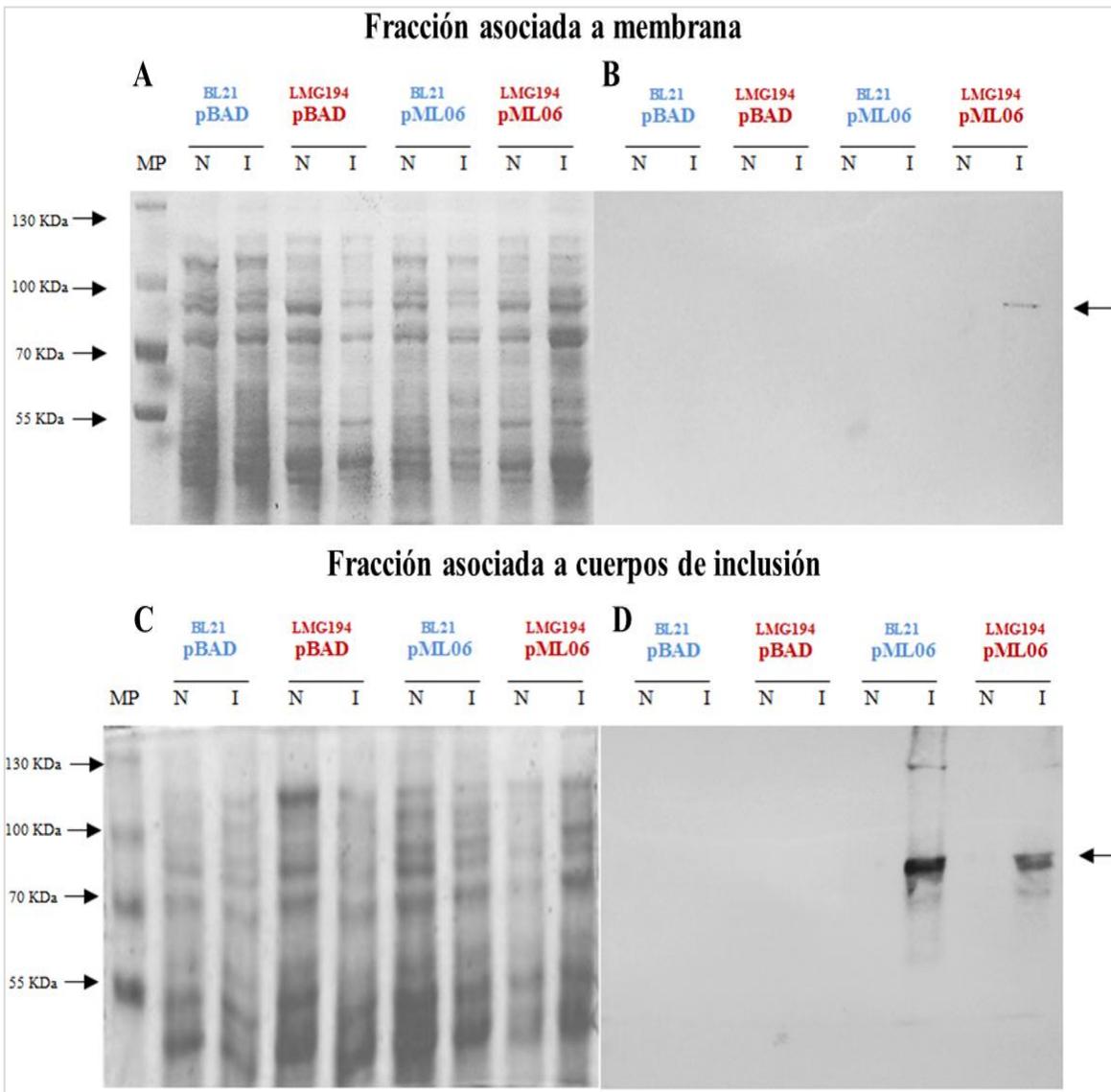
Como resultado, se obtuvieron colonias de cada transformación como se puede ver en la figura 6-11A-D. De cada placa se seleccionaron 5 colonias, las que fueron comprobadas mediante PCR de colonia usando la pareja de cebadores pBAD comp Up- G RT Rev para pML06. El primer directo anilla en el vector y el reverso en el inserto obteniéndose un amplimero de 259 pares de bases como se observa en la figura 6-11E. También se comprobó la transformación con el vector como control, para esto se usó la pareja de cebadores pBAD comp Up- pBAD comp down-, que en ausencia del inserto generan un amplimero de 172 pares de bases (Figura 6-11 F). De acuerdo a este ensayo se pudo corroborar que cada una de las colonias transformadas contenía el plásmido de interés.

Luego se efectuó un ensayo preliminar de la expresión de CtpG recombinante en cada una de estas cepas (Figura 6-11G), seleccionando de manera aleatoria la colonia 1. Para lo que se realizó la inducción en medio autoinductor con L- arabinosa al 0,05% durante 18 horas a 180 rpm y 25°C como temperatura de inducción, esperando obtener la proteína en la fracción soluble. (Figura 6-11G). Este ensayo permitió observar que de las 2 cepas evaluadas aparentemente ambas expresaban la proteína en la fracción soluble e insoluble. Sin embargo, se observaron falsos positivos como aparente expresión de la proteína en el vector vacío o en fracciones no inducidas, por lo que fue necesario corroborar este ensayo mediante SDS-PAGE y Western blot (Figura 6-12).

Se encontró que en la cepa de *E. coli* LMG194 fue posible expresar CtpG recombinante en la fracción soluble (Figura 6-12 A y B) en comparación con *E.coli* BL21 (Figura 6-12 C y D), en donde no hubo expresión. La Figura 6-12 C y D muestra que ambas cepas permiten la expresión de la proteína en la fracción insoluble, en mayor proporción respecto a la fracción soluble, lo que indica que continuamente se estarían formando cuerpos de inclusión. En los geles de SDS-PAGE no se apreció una banda diferencial durante la expresión de la proteína (82 kDa), pero se pudo identificar en el inmunoblot, lo que sugiere que a la misma altura se puede expresar una proteína propia de *E. coli*. Se puede concluir que la cepa *E. coli* LMG194 es la apropiada para cumplir con el propósito de este ensayo, por lo que a lo largo del desarrollo del objetivo será la cepa de trabajo.



**Figura 6-11. Transformación de células competentes de *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194 con los plásmidos pML06 y pBAD.** *E. coli* BL21 (DE3) y LMG194 fueron transformadas con pBAD (A y C respectivamente) y pML06 (B y D respectivamente). Se seleccionaron 5 colonias por placa las que fueron confirmadas por PCR de colonia (E y F). Aleatoriamente se seleccionó una colonia y a partir de esta se realizó ensayo preliminar de expresión de CtpG recombinante, esto se muestra mediante slot blot en membrana de nitrocelulosa utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000 (G).



**Figura 6-12. Expresión de CtpG recombinante en *E.coli* BL2 (DE3) y LMG194.** Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA). Expresión de CtpG en la fracción soluble (A) y (B). Expresión de CtpG en la fracción insoluble (C) y (D). Para cada ensayo se emplearon las cepas transformadas con el vector (pBAD) como control negativo, además se comparó las cepas inducidas (I) frente a las no inducidas (N). SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A y C). Western blot en membrana de nitrocelulosa (B y D), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000. Las flechas de derecha a izquierda indican la posición probable de la proteína de interés.

## 6.2.4 Optimización de la concentración de inductor

Para determinar la concentración óptima de inductor para la cepa *E. coli* LMG194::pML06, se evaluó cada una de las siguientes concentraciones de L-arabinosa: 0, 0.02, 0.05, 0.1, 0.2, 0.3, 0.5, 0.75 y 1% durante 4 horas de inducción. La expresión de CtpG dentro del vector pBAD permite hacer una expresión controlada por adición de glucosa que es un represor del promotor *araBAD* [112]. Se ha sugerido que en presencia de cantidades equivalentes (0.05%) del inductor y el represor se previene la inducción en estadíos tempranos de crecimiento bacteriano [110].

En la figura 6-13 se muestra el resultado de este ensayo. Se encontró que CtpG recombinante se induce desde bajas concentraciones (0.02%) de L-arabinosa en la fracción soluble (Figura 6-13 B); sin embargo, la mayor cantidad de proteína se obtiene con 0.3% de inductor. En la fracción insoluble, la proteína se induce también desde 0.02% y a medida que aumenta la cantidad de inductor, incrementa proporcionalmente la cantidad de la proteína recombinante (Figura 6-13 D). A una concentración de 0.3% es posible sobreexpresar la proteína en ambas fracciones, por lo que se tuvo en cuenta este porcentaje para los ensayos posteriores. En estudios previos se encontró que cantidades de inductor de 0.01%-0.5% permiten obtener altos niveles de expresión de proteínas recombinantes [110], la cantidad óptima estimada en este trabajo se encuentra en este rango.

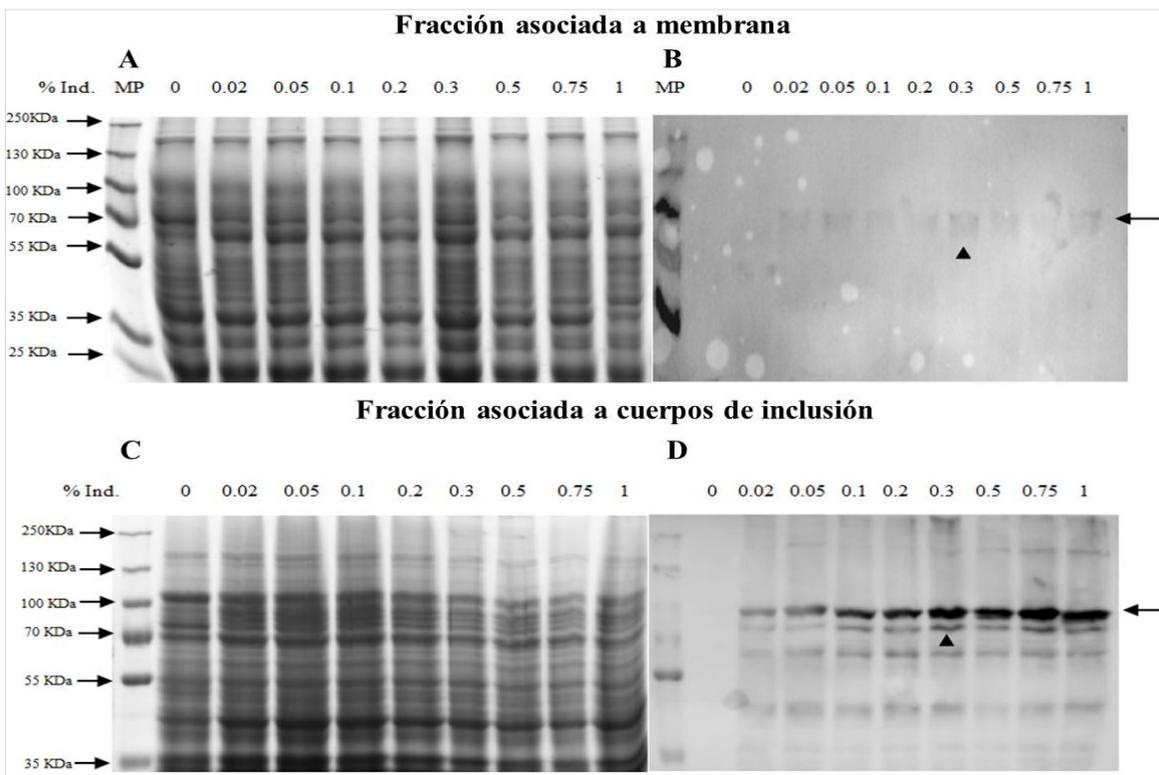
Es importante considerar que la autoinducción es útil cuando se requiere hacer el estudio de expresión y solubilidad de muchas muestras, obteniéndose altas cantidades de la proteína de interés y cuando éstas son inducidas con L-arabinosa [110], por lo que el protocolo utilizado en esta parte del trabajo es adecuado para optimizar las condiciones de expresión de CtpG recombinante. Generalmente los medios de cultivo contienen digeridos enzimáticos que pueden contener trazas del inductor, en este estudio no se aprecia que la proteína se produzca de manera basal en el control no inducido (Figura 6-13 B y D, 0% de inductor).

## 6.2.5 Optimización de la temperatura de inducción

Las proteínas de membrana son ricas en regiones hidrofóbicas que constituyen los dominios transmembranales; para favorecer el plegamiento y correcta inserción de estas en la membrana, se debe disminuir la temperatura de expresión [144]. Anteriormente, se ha establecido que reducir la temperatura de cultivo, conlleva a que la sobre-expresión de proteínas ocurra más lentamente, aliviando así la maquinaria de translocación. A 37°C se ha reportado que predominantemente se generan cuerpos de inclusión, mientras que a bajas temperaturas incrementa la inserción de la proteína en la membrana. Para favorecer aún más este fenómeno se recomienda hacer co-expresión

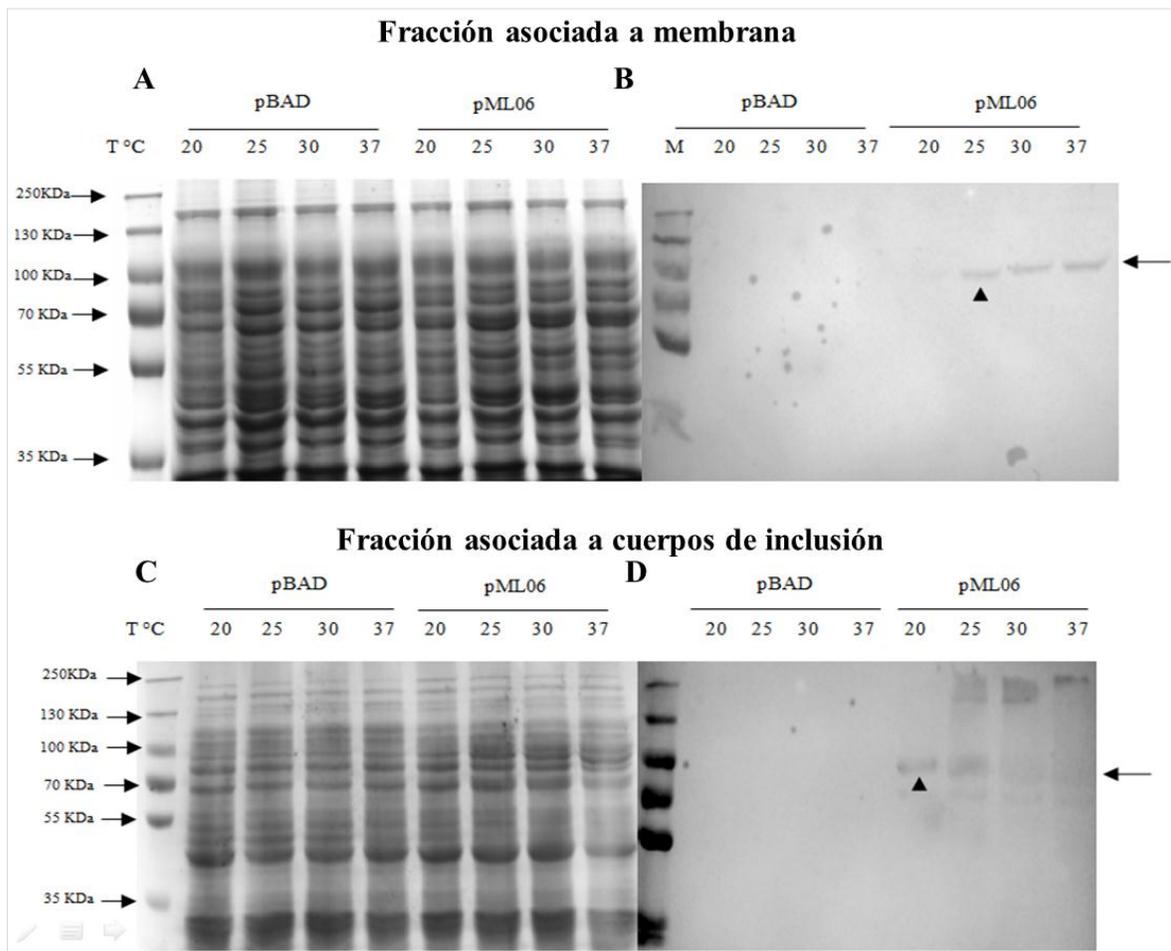
con chaperonas como GroEL y DnaJ/K, las que previenen la agregación de cuerpos de inclusión [144,150,151].

CtpG es una proteína heteróloga en el sistema *E.coli* LMG194, por lo que su producción es un factor de estrés para la bacteria, en el interior de la cual se podrían generar agregados de proteína. Desde el inicio se estableció que principalmente se quería obtener la proteína en la fracción asociada a la membrana. Bajo este razonamiento se evaluaron 4 posibles temperaturas de inducción de CtpG: 20, 25, 30 y 37°C durante 4 horas de inducción. En la figura 6-14 B, se muestra que CtpG se expresa desde los 25°C hasta los 37°C en la fracción soluble, mientras que en la fracción insoluble la proteína se expresa desde los 20°C (Figura 6-14 D). Esto sugiere que existe la tendencia a la formación de cuerpos de inclusión aún desde bajas temperaturas indicando que esta proteína puede ser tóxica para la bacteria.



**Figura 6-13. Optimización de la concentración de inductor para la expresión de CtpG recombinante en *E.coli* LMG194.** Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA). Se evaluó el efecto de las concentraciones de inductor (0-1%), en la expresión de CtpG en la fracción soluble (A y B) e insoluble (C y D). SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A y C). Western blot realizado en membrana de nitrocelulosa (B y D), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000. Las flechas de derecha a izquierda indican la posición probable de la proteína de interés. Las flechas de abajo hacia arriba indican el parámetro seleccionado.

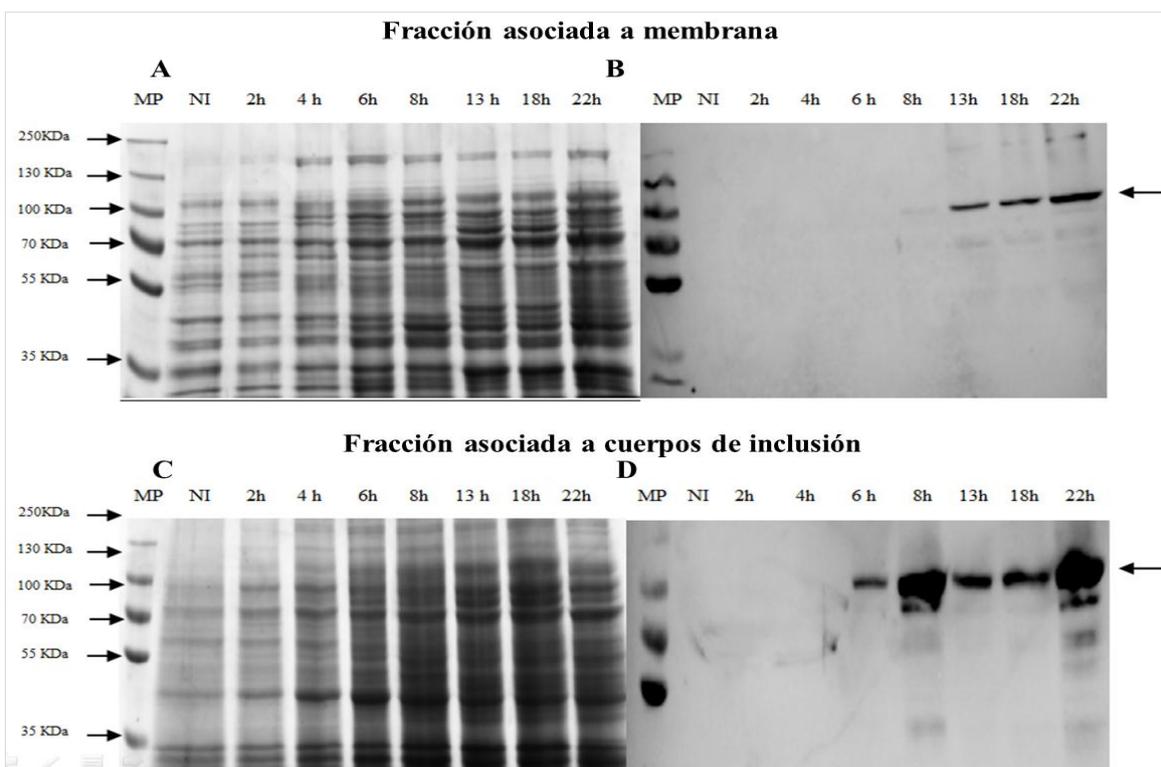
Estos resultados concuerdan en que la expresión de CtpG es más viable a bajas temperaturas. Por esta razón, se seleccionó el tiempo de inducción a 20°C, con la finalidad de disminuir un poco más las temperatura de expresión y así establecer la relación entre la temperatura y el tiempo que la proteína tarda en expresarse en la fracción asociada a la membrana y alternativamente como cuerpos de inclusión. En la optimización de la expresión de otras de las ATPasas tipo P de *Mtb*, en el sistema bacteriano *E.coli* LMG194, se encontró que a 20°C por 18 horas de inducción es posible obtener cantidades apreciables de la proteína en la fracción asociada a membrana [18,20].



**Figura 6-14. Optimización de la temperatura de expresión de CtpG recombinante en *E.coli* LMG194.** Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA). Se evaluaron 4 temperaturas de inducción para la expresión de CtpG (20, 25, 30, 37°C). Los resultados se muestran en la fracción soluble (A y B) e insoluble (C y D). Como control negativo se empleó la cepa transformada con el vector pBAD. SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A y C). Western blot en membrana de nitrocelulosa (B y D), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000. Las flechas de derecha a izquierda indican la posición probable de la proteína de interés. Las flechas de abajo hacia arriba indican el parámetro seleccionado.

## 6.2.6 Optimización del tiempo de inducción

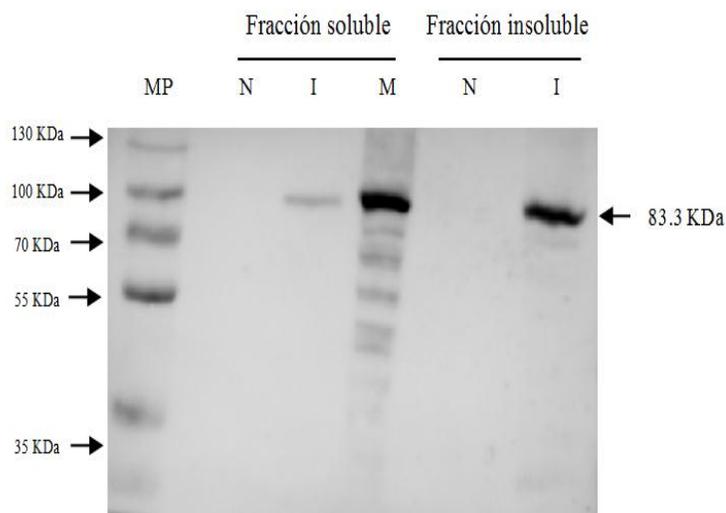
Como último parámetro de sobreexpresión, se evaluó el tiempo de inducción desde 0 a 22 horas. Se observó que CtpG se obtiene en la fracción soluble desde las 8 horas de inducción (Figura 6-15 A y B). A la hora 22, la cantidad de proteína es mucho más significativa. En la fracción insoluble se obtiene la proteína desde las 6 horas como cuerpos de inclusión (Figura 6-15 C y D). Teniendo en cuenta que la temperatura usada en este ensayo fue de 20°C es coherente que la proteína tarde más en expresarse en ambas fracciones, lo que es conveniente con el propósito de favorecer el correcto plegamiento de CtpG y su inserción en la membrana plasmática, por lo que fue la temperatura selecta para ensayos posteriores.



**Figura 6-15. Optimización del tiempo de inducción de CtpG recombinante en *E.coli* LMG194.** Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA). Se evaluó el tiempo de inducción (0-22h) para la expresión de CtpG. Los resultados se muestran en la fracción soluble (A y B) e insoluble (C y D). Como control negativo se empleó la cepa transformada con el vector pBAD. SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A y C). Western blot en membrana de nitrocelulosa (B y D), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000. Las flechas de derecha a izquierda indican la posición probable de la proteína de interés.

Finalmente se estableció que para obtener CtpG recombinante en la fracción soluble de *E. coli* LMG194 es necesario hacer el cultivo con 0,3% de inductor, por 18- 22 horas a 20°C. Cabe resaltar

que las condiciones de sobreexpresión fueron evaluadas en cultivos en medio autoinductor [110], con agitación constante de 180 rpm, por lo que se sugiere mantener esta condición. Esto permitirá obtener cantidades apreciables de la proteína en ambas fracciones. De acuerdo al interés inicial se obtendrá la proteína asociada a la membrana, la que se puede concentrar por extracción de la membrana plasmática, retirando así proteínas citosólicas contaminantes. De esta manera surge la figura 6-16, en la que se observa la expresión de CtpG bajo las condiciones de cultivo anteriormente descritas. Se comprobó que CtpG recombinante se enriqueció en las vesículas de membrana plasmática y también como cuerpos de inclusión.



**Figura 6-16. Optimización de la de expresión de CtpG recombinante en *E.coli* LMG194.** Se cultivó la cepa *E. coli* LMG194::pML06, durante 18 horas a 20°C con 0,3% de L-arabinosa en medio autoinductor con agitación constante (180 rpm). Posteriormente, se separó la fracción soluble de la insoluble. La primera fue sometida a un protocolo de centrifugación diferencial, lo que permitió obtener vesículas de membrana enriquecidas con CtpG. Línea I Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus Thermoscientific, USA. Se muestran ambas fracciones inducidas (I) y no inducidas (NI), también proteína de membrana enriquecida con CtpG (M). El peso molecular se calculó mediante el software Image Lab 5.2.1 (BIORAD, la Joya, California). Western blot en membrana de nitrocelulosa, utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución 1:1000. La flecha de derecha a izquierda indica la posición probable de la proteína de interés.

### 6.2.7 Purificación parcial de CtpG

Para llevar a cabo la purificación de CtpG recombinante se aplicaron dos estrategias. La primera, de acuerdo al método propuesto por Mandal y colaboradores [120], basada en la solubilización de la proteína a partir de vesículas de membrana enriquecidas con CtpG. Para esto, se empleó un detergente no iónico, dodecil maltosido (DDM), ampliamente empleado para el estudio de proteínas integrales de membrana. Una vez se desensambla la proteína de los lípidos de la membrana, la cola

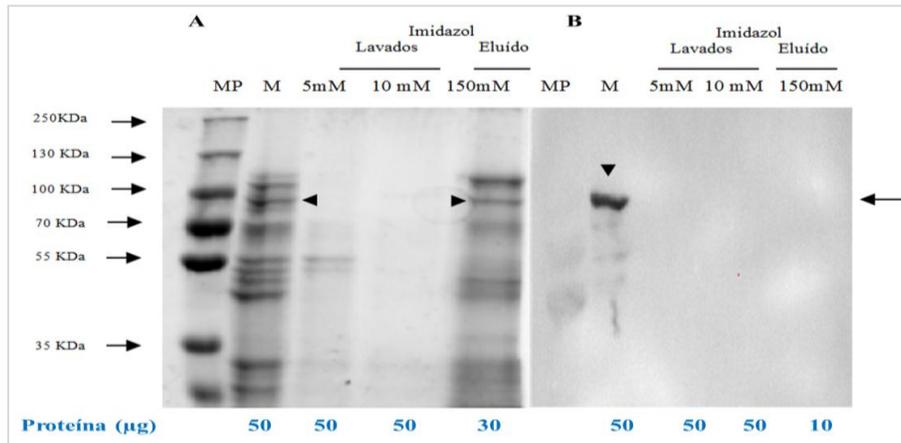
apolar del detergente forma micelas alrededor de los dominios hidrofóbicos de la proteína. Adicionalmente, se emplea asolectina en una relación 1:1 con el detergente, para estabilizar la proteína e impedir la pérdida de su actividad.

La segunda estrategia se desarrolló mediante la solubilización de los cuerpos de inclusión, usando urea como agente caotrópico y Tritón X-100 como detergente. En ambas estrategias, se partió de la proteína solubilizada empleando la etiqueta de histidinas para realizar su purificación mediante cromatografía de afinidad a metales (IMAC), específicamente en resina de Ni-NTA (Qiagen, USA). Posterior a la incubación de la proteína solubilizada con la resina, se realizaron lavados con soluciones de 5 y 20 mM y eluidos con 150 y 300 mM de imidazol. Una vez se tenían los eluidos, se realizó un proceso de intercambio de buffer, para lo cual se usaron centricones de 50 K. El fundamento del uso de centricon es la exclusión molecular, las proteínas con peso inferior a 50 kDa serán eluidas, mientras que aquellas con peso superior serán retenidas. La ventaja del uso del centricon es que es posible eliminar proteínas contaminantes y exceso de imidazol, además de concentrar la proteína de interés.

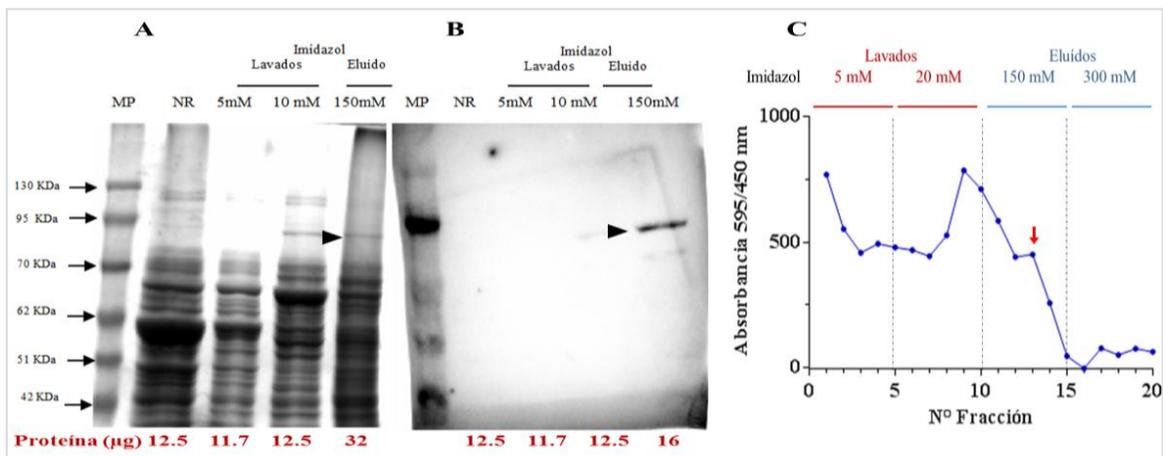
Respecto a la primera estrategia, en la figura 6-17 se muestra que CtpG está presente en la membrana no solubilizada, no obstante, en los eluidos (150 mM de Imidazol) si bien aparece una banda a la misma altura en el gel, en el inmunoblot no aparece. Lo que puede indicar que la proteína no fue desensamblada de la membrana al hacer la solubilización con DDM. Otra posibilidad es que la proteína no haya sido eluida de la resina Ni-NTA, por lo que es necesario usar un buffer con diferente composición (pH o concentración de imidazol) o el uso de agentes caotrópicos como la urea. Esto se comprueba en la segunda estrategia propuesta (Figura 6-18), donde la proteína es eluida en condiciones denaturantes, sin embargo se logra retirar muy pocos de los contaminantes.

Como se observa en la figura 6-18 A, se analizaron 32 µg de proteína concentrada en el gel de SDS-PAGE, donde se evidencia la presencia de CtpG recombinante a la altura correspondiente de acuerdo al marcador de peso molecular. Así mismo, con 16 µg de proteína concentrada, se corrobora la expresión de CtpG en el Western blot (Figura 6-18 B), la que aparece únicamente en la fracción de eluido, indicando una purificación parcial. Como parte del proceso de purificación de la proteína recombinante en condiciones denaturantes, se analizó el perfil de elución de CtpG, midiendo la concentración de proteína de cada volumen de elución (Figura 6-18 C). Esto mostró que la fracción 13 presenta un leve aumento en la concentración de proteína, por lo que puede ser la fracción en donde se encuentre mayoritariamente la proteína eluida. No obstante, en el gel de SDS-PAGE (Figura 6-18 A), se observa que en la fracción de eluido sigue habiendo presencia de

proteínas contaminantes, las que son mucho más notorias tras el proceso de concentración en el centricon, debido también a la mayor cantidad de proteína analizada en la fracción de eluido (32  $\mu\text{g}$ ) respecto a la cantidad de proteína analizada de los lavados (11,7 y 12,5  $\mu\text{g}$ , respectivamente).



**Figura 6-17. Purificación de CtpG recombinante desde vesículas de membrana.** A partir de vesículas de membrana de *E. coli* LMG194:: pML06, se llevó a cabo la solubilización de CtpG recombinante. La proteína solubilizada se incubó con la resina Ni-NTA (Qiagen, USA). Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA), el pellet obtenido tras la solubilización de vesículas de membrana sobreexpresando CtpG con DDM 0.75%, también fue analizado, el que se denomina M. La proteína fue eluida con 150 mM de Imidazol y concentrada en centricon. SDS-PAGE al 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A), Western blot en membrana de nitrocelulosa (B), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución1:1000. Se observa la presencia de CtpG recombinante en proteína no solubilizada de las vesículas de membrana (M), indicando que CtpG no fue desensamblada de la membrana.



**Figura 6-18. Purificación de CtpG recombinante desde cuerpos de inclusión.** A partir de la fracción insoluble de *E. coli* LMG194:: pML06, se llevó a cabo la solubilización de CtpG recombinante. La proteína solubilizada se incubó con la resina Ni-NTA Qiagen, USA en condiciones denaturantes. Línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Opti- Proteín Marker ladder ABM®. La proteína fue eluida con 150 mM de Imidazol y concentrada en centricon. SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue (A), Western blot en membrana de nitrocelulosa (B), utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo, (Thermoscientific, USA), dilución 1:1000; anticuerpo secundario de cabra anticonejo acoplado a peroxidasa de rábano (Thermoscientific, USA) dilución1:1000. Perfil de elución de CtpG recombinante desde cuerpos de inclusión (C).

## 6.2.8 Expresión de CtpG recombinante en micobacteria

Como uno de los objetivos de este trabajo de investigación, se propuso hacer una aproximación a la especificidad iónica de CtpG, ya que varios estudios han reportado algunas condiciones de inducción del gen *ctpG* [21,22,115] y con medios bioinformáticos han predicho su posible especificidad iónica [16], sin embargo, en este momento no se ha corroborado experimentalmente. Para esto, se realizaron ensayos actividad ATPasa en vesículas de membrana y viabilidad celular, usando como sistema *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 expresando CtpG.

## 6.2.9 Ensayos de actividad ATPasa dependiente de metales pesados

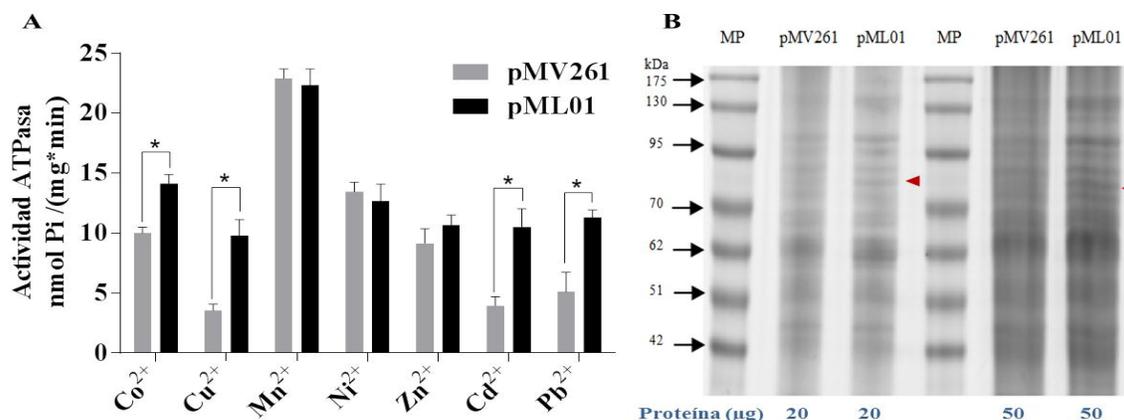
Como parte del análisis de la especificidad iónica de CtpG, se realizaron ensayos de actividad ATPasa dependiente de metales pesados, utilizando vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada separadamente con pML01 (expresa CtpG) y el vector pMV261.

El ensayo de actividad enzimática se basa en evaluar la cantidad de Pi que se libera de la hidrólisis del ATP, por el transporte de cationes metálicos a través de la membrana plasmática. Para esto, se evaluó el efecto de cada uno de los siguientes metales: Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Ni<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Mn<sup>2+</sup>, los que hacen parte del grupo de sustratos posiblemente transportados por las ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de MTBC [16,130], y son encontrados en el interior del fagosoma [11,12]. Por otro lado evaluamos la actividad enzimática en presencia de Cd<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup>, ya que estos cationes sensan el regulador transcripcional de CtpG, CmtR [23,24]; y su influencia en la actividad de CtpG no había sido establecida hasta el momento. Estos cationes también se analizan en los ensayos de viabilidad celular.

Los ensayos de actividad ATPasa se realizan en presencia de Brij-58, un detergente que permeabiliza e invierte la orientación de las vesículas de membrana [152,153], por lo que la región citosólica adopta una conformación *cis*, contraria a la conformación natural (*trans*) que se presenta en las células. En consecuencia, los motivos involucrados en la unión de ATP quedan expuestos en la membrana [152–154], permitiendo la realización exitosa del ensayo. Cuando se da inicio a la reacción por adición de ATP, en presencia del catión a evaluar, CtpG transporta el catión desde el medio de reacción al interior de la vesícula como se muestra en la figura 5-2. En las células completas, este proceso ocurre de manera contraria, ya que CtpG transporta el catión desde el interior celular hacia el exterior. Como controles del ensayo se realizó la reacción con vesículas de membrana, pero sin el catión, para determinar el Pi liberado por enzimas diferentes a las ATPasas, como las fosfatasas. También se realizó un control en ausencia de membrana, para determinar

posibles contaminaciones de Pi en los reactivos utilizados, y como último control, se realizó el ensayo en ausencia de ATP, para asegurar que el Pi es liberado por el inicio de la reacción, y no de manera espontánea.

En la figura 6-19, se muestran los resultados de los ensayos de actividad ATPasa. La actividad de CtpG se estimó como la diferencia entre la actividad en las vesículas de la cepa recombinante respecto a las vesículas con el vector (Tabla 6-3).



**Figura 6-19. Ensayo de actividad ATPasa dependiente de metales pesados.** Se realizó el ensayo con cada uno de los siguientes metales Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup>, a una concentración de 10 µM, sobre vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, expresando separadamente CtpG y el vector vacío (A). El ensayo se hizo por triplicado técnico. Las barras de errores corresponden a la desviación de los datos, expresada como el SEM. Las diferencias estadísticamente significativas, se determinaron mediante la prueba t-student con valores de p<0,05\*. Expresión de CtpG recombinante en vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, se muestra cepa transformada con el vector vacío (pMV261) y plásmido recombinante (pML01) (B), línea 1 Marcador de peso molecular preteñido Opti- Proteín Marker ladder ABM®, SDS-PAGE 10% teñido con Coomassie Brilliant Blue. La flecha roja indica la posición probable de la proteína de interés.

Catión	Actividad de CtpG (U/mg proteína)	±
Co <sup>2+</sup>	4,127*	0,915
Cu <sup>2+</sup>	6,250*	1,429
Mn <sup>2+</sup>	-0,548	1,560
Ni <sup>2+</sup>	-0,761	1,633
Zn <sup>2+</sup>	1,522	1,458
Cd <sup>2+</sup>	6,571*	1,694
Pb <sup>2+</sup>	6,210*	1,745

**Tabla 6-3. Actividad ATPasa de CtpG estimulada por metales pesados.** La actividad de CtpG se estimó por la diferencia entre la actividad en las vesículas de la cepa recombinante respecto a las vesículas con el vector. La desviación de los datos esta expresada como el SEM. Las diferencias estadísticamente significativas se determinaron mediante la prueba t-student con valores de p<0,05\*.

Las vesículas de membrana de las células control (transformadas con el vector pMV261) siempre muestran un nivel menor de actividad ATPasa, respecto a las vesículas con el plásmido

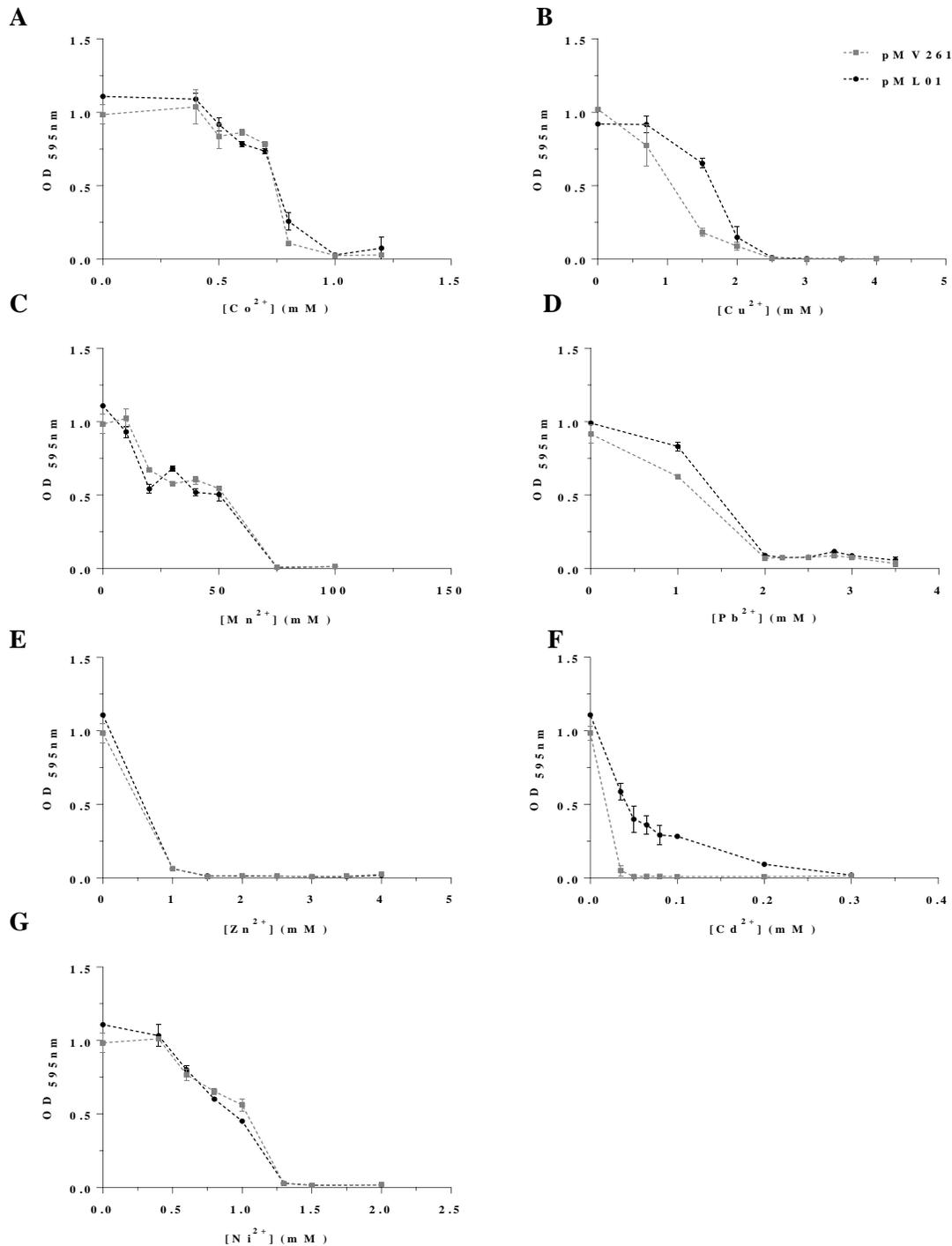
recombinante (pML01), lo que sugiere participación activa de CtpG en el transporte de cationes de metales pesados. Como se muestra en la figura 6-19, la actividad de CtpG es estimulada principalmente por  $Cd^{2+} > Cu^{2+} > Pb^{2+} > Co^{2+}$ . Por el contrario, no existen diferencias significativas en la actividad cuando las vesículas de membrana de las células control y con pML01 son incubadas con  $Mn^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  y  $Ni^{2+}$ . En relación con los ensayos de expresión génica, se esperaba que  $Cd^{2+}$  y  $Cu^{2+}$  estimularan la actividad de CtpG, sin embargo, se observa que  $Pb^{2+}$  y  $Co^{2+}$  también la estimulan *in vitro*. Esto sugiere que la enzima es capaz de transportar diferentes sustratos, dependiendo el entorno en el que se encuentre. Este es el caso de  $Co^{2+}$ , que no es expulsado del interior celular en los ensayos *in vivo*, como se discutirá más adelante, pero si puede ser transportado por CtpG *in vitro*.

En el proteoma de *M. smegmatis* se encuentran 3 ATPasas tipo  $P_{1B}$ , CtpB (MSMEG2), CtpC (MSMEG1), CtpD (MSMEG3), que poseen alta identidad con sus contrapartes ortólogas en *Mtb* del 50,7%; 77,2% y 66,9% respectivamente [18]. De estas, solamente las dos últimas han sido caracterizadas, CtpC como  $Mn^{2+}$ ATPasa [155] y CtpD como  $Co^{2+}/Ni^{2+}$ ATPasa [156]. Se estima que MSMEG2 puede ser una  $Cu^{+}$ ATPasa. Además se ha reportado que CtpC, puede transportar en menor medida  $Zn^{2+}$  [21].

### **6.2.10 Efecto de la expresión de CtpG en la tolerancia de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 frente a concentraciones tóxicas de metales pesados**

Para determinar el efecto que tiene la expresión de CtpG en la tolerancia de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 frente a concentraciones tóxicas de metales pesados, se realizaron ensayos de viabilidad celular en presencia de concentraciones variables de cationes posiblemente transportados por enzimas ATPasas tipo  $P_{1B}$  de *Mtb* [16,130,133]. Para esto, se estimó la viabilidad de las cepas de *M. smegmatis* transformadas con pMV261 y pML01 cultivadas en presencia de diferentes concentraciones de metales. Como control positivo de crecimiento se consideraron las mismas cepas cultivadas en ausencia del catión.

El crecimiento celular se estimó mediante medidas de absorbancia a un  $OD_{595\text{ nm}}$ . La concentración mínima inhibitoria (CMI) fue establecida con base al crecimiento celular de las cepas, entendiendo esta, como el valor más bajo posible en el cual se inhibirá el crecimiento bacteriano aparente después de su incubación [157]. Adicionalmente, se realizó un control para cada dilución de catión en ausencia de las cepas, con el propósito de evitar una sobreestimación de la absorbancia.



**Figura 6-20. Ensayos de viabilidad celular en *M. smegmatis* mc<sup>2155</sup> sobreexpresando CtpG.** Los cultivos de *M. smegmatis* mc<sup>2155</sup> sobreexpresando CtpG (pML01) en círculos negros o vector vacío (pMV261) en cuadrados grises, fueron inoculados a un OD<sub>595nm</sub> 0.05 y crecidos por 72 horas con agitación en presencia de Co<sup>2+</sup> (A), Cu<sup>2+</sup> (B), Mn<sup>2+</sup> (C), Pb<sup>2+</sup> (D), Zn<sup>2+</sup> (E), Cd<sup>2+</sup> (F) y Ni<sup>2+</sup> (G) que corresponden a los cationes transportados por las ATPasas P<sub>1B</sub>. El crecimiento bacteriano se reportó en unidades de absorbancia. El ensayo se realizó con 2 muestras biológicas independientes por triplicado. Las barras de desviación muestran el SEM, las diferencias estadísticamente significativas fueron estimadas desde \*P<0.0005 con la prueba t student.

Cepa	Concentración mínima inhibitoria (mM)						
	Cu <sup>2+</sup>	Pb <sup>2+</sup>	Ni <sup>2+</sup>	Co <sup>2+</sup>	Cd <sup>2+</sup>	Mn <sup>2+</sup>	Zn <sup>2+</sup>
<i>M. smegmatis</i> (pMV261)	2,5	2	1,3	1	0,05	75	1,5
<i>M. smegmatis</i> (pML01)	2,5	2	1,3	1	0,3	75	1,5

**Tabla 6-4. Determinación de concentración mínima inhibitoria (CMI) en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.** Se llevó a cabo la determinación de CMI en las cepas de *M. smegmatis* transformadas con pMV261 y pML01 frente a metales pesados mediante medidas de absorbancia a OD<sub>595 nm</sub>.

Los resultados de los ensayos de viabilidad celular se muestran en la figura 6-20, en la que se aprecia que la presencia de Co<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> y Ni<sup>2+</sup> (Figura 6-20 A, C, E y G) en el medio de cultivo no induce cambios significativos en el crecimiento celular, respecto a las células control. Lo que indica que la expresión de CtpG no genera tolerancia aparente a estos metales en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. También se observa que la CMI de Cu<sup>2+</sup> no varía entre las dos cepas (Figura 6-20 B y Tabla 6-4). Sin embargo, la expresión de CtpG conlleva a aumentar la tolerancia en presencia de 1,5 mM de Cu<sup>2+</sup>, por lo que hay una diferencia en el crecimiento de 0,47 unidades de absorbancia que equivale aproximadamente al 50 % de crecimiento celular. En la figura 6-20 D, se observa que en presencia de Pb<sup>2+</sup>, existe una leve diferencia en el crecimiento a 1mM de la sal, que equivale a 0,2 unidades de absorbancia. No obstante la CMI es la misma para las dos cepas. Cabe resaltar que los ensayos con Pb<sup>2+</sup> se realizaron ajustando el pH del medio a 5,5 para prevenir la precipitación de la sal, sin embargo se pudo apreciar que el pH levemente ácido no afectó de manera visible la viabilidad celular.

Finalmente en presencia de Cd<sup>2+</sup> (Figura 6-20 F), se logra apreciar la mayor diferencia de crecimiento celular, en comparación con los demás metales evaluados; así por ejemplo a una concentración de 0,03 mM de Cd<sup>2+</sup> la cepa control revela inhibición en el crecimiento a un OD<sub>595 nm</sub> de 0,05 unidades, mientras que la cepa recombinante presenta un OD<sub>595 nm</sub> de 0,587 unidades, lo que equivale a un poco más del 50% de población celular inicial. La CMI para la cepa control es de 0,05 mM, entre tanto que para la cepa recombinante la CMI es de 0,3 mM, indicando que la expresión de CtpG le confiere tolerancia de aproximadamente 6 veces a *M. smegmatis* frente a esta condición de estrés.

Cuando la tolerancia a un metal disminuye indica que el metal está siendo internalizado por la bacteria, lo que conlleva a un proceso de intoxicación que resulta en muerte celular. Consecuentemente, cuando se mantiene la tolerancia frente a concentraciones tóxicas del metal, esto indica que hay proteínas transportadoras de metales en la membrana que están expulsando el

metal desde el interior celular para mantener la homeostasis iónica [158]. De acuerdo a lo anterior, se puede concluir de los ensayos de viabilidad celular, que la expresión de CtpG se asocia al eflujo de metales como  $\text{Cd}^{2+}$  principalmente, sugiriendo que este metal puede ser uno de los sustratos más relevantes para la enzima.

Es importante resaltar que las concentraciones de metales pesados que soporta *Mtb* intrafagosomalmente son mucho más bajas, respecto a las CMI establecidas durante este estudio para *M. smegmatis* (Tabla 6-4). Se ha establecido que 0,5 mM de  $\text{Cu}^{2+}$  es una concentración tóxica para *Mtb* [22,76], mientras que para *M. smegmatis* es una concentración subletal (Tabla 6-4). Esto se debe a que aunque ambas pertenecen al género *Mycobacterium*, *Mtb* es un patógeno intracelular facultativo [159], mientras que *M. smegmatis* es una bacteria saprófita ambiental que se encuentra en el suelo [160,161], por lo que el ambiente al que se ven expuestos ambos microorganismos es diferente. No obstante, los ensayos de viabilidad celular muestran que la expresión de CtpG aumenta la tolerancia a  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  en *M. smegmatis*, respecto a las células control, estos resultados pueden ser extrapolados a la función de detoxificación que CtpG cumple en *Mtb*. Esta afirmación también es soportada por el hecho de que *M. smegmatis* no tiene contraparte de CtpG [18], por lo que en los ensayos de actividad ATPasa y viabilidad celular, las diferencias entre la cepa con el vector y la cepa recombinante, pueden ser atribuidas a la expresión de CtpG, dando mayor confiabilidad en los resultados.

### 6.2.11 Determinación de los parámetros cinéticos

Es de particular interés evaluar el efecto de la concentración de sustrato en la actividad de CtpG, ya que estos resultados pueden dar información útil sobre el grado de afinidad que presenta cada uno de los iones posiblemente transportados por la enzima. En este sentido, nos centramos en elucidar principalmente las constantes cinéticas para  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , ya que de acuerdo a los resultados hasta ahora obtenidos, no pueden ser descartados como sustratos preferencialmente transportados por CtpG. Para llevar a cabo esta parte del objetivo, fue necesario establecer las condiciones óptimas de reacción, como concentración de la proteína de membrana, pH, temperatura y concentración de sustrato. Se evaluó la concentración de proteína de membrana desde 0-20  $\mu\text{g}$ , también el efecto del pH de la reacción (5.5-9), empleando 20  $\mu\text{g}$  de proteína. Finalmente, se optimizó la temperatura (4-60°C) para lo cual se usó 20  $\mu\text{g}$  de proteína por reacción. Se consideró como óptima la condición en la cual se apreciaron mayores diferencias entre la actividad de vesículas de membrana expresando CtpG, respecto a las vesículas de las células control.

Teniendo en cuenta que en una investigación de nuestro grupo, se había establecido las condiciones óptimas de reacción para  $\text{Cu}^{2+}$  (8  $\mu\text{g}$  de proteína, pH 6.8 y 37°C) [115], solo fue necesario establecer las condiciones de reacción para  $\text{Cd}^{2+}$ . El efecto de la concentración de sustrato fue evaluado para ambos cationes.

#### ▪ Efecto de la concentración de proteína

Cuando la concentración de sustrato es alta, la reacción enzimática depende únicamente de la cantidad de enzima disponible. Por esta razón, al aumentar la concentración de proteína las diferencias de actividad entre la cepa control y la cepa recombinante van aumentando. Previamente se había reportado que desde 4  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana era posible evaluar la actividad de CtpA [17], una Cu-ATPasa de *Mtb*. Aunque CtpG y CtpA son enzimas diferentes, ambas pertenecen al subgrupo P<sub>1B</sub> de ATPasas y el método usado para evaluar la actividad enzimática es muy similar. En el caso de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$ , se estimó que desde 10  $\mu\text{g}$  de proteína se iba haciendo más notoria su actividad (resultados no mostrados). En este sentido, se requiere usar grandes cantidades de vesículas enriquecidas con CtpG para contar con una concentración de CtpG significativa en los ensayos. Para la optimización de los parámetros cinéticos se dispuso de 20  $\mu\text{g}$  como cantidad máxima de proteína para cada reacción, mientras que para la estimación de las constantes cinéticas se utilizaron 10  $\mu\text{g}$  de proteína de membrana por reacción.

#### ▪ Efecto del pH

Se observó que la actividad de CtpG se favoreció principalmente a pH 7.4, cercano a la neutralidad. Lo que es de esperarse ya que a condiciones fisiológicas, *Mtb* requiere conservar el pH para mantener su viabilidad. CopA, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa de *A. fulgidus* presenta su máxima actividad en un rango de pH de 6.1-6.5 [120], lo que sugiere que el pH óptimo de reacción de las ATPasas tipo P, está determinado por las condiciones en las que el microorganismo se desarrolla. En el caso de *Mtb*, este es un patógeno intracelular [159], mientras que *A. fulgidus* es un microorganismo termofílico, metabolizador de azufre, encontrado en hidrotermales [120].

Cuando el bacilo tuberculoso es fagocitado por los macrófagos alveolares, se dan procesos de acidificación del fagosoma (pH 6-6.5) [162], pero *Mtb* ha mostrado bastante resistencia al ataque ácido debido a su compleja envoltura celular y una amplia respuesta transcripcional que le permite mantener su pH intracelular frente a variaciones del medio extracelular. Uno de ellos, es un locus *aprABC* (por su siglas en inglés *acid and phagosome regulated*), el que es fundamental para el crecimiento en el interior de los macrófagos, también en la agregación celular y en la producción de

algunos componentes de la envoltura, principalmente lípidos de la pared celular [162]. *aprABC* es regulado por el sistema de dos componentes PhoPR [70].

### ▪ Efecto de la temperatura

La temperatura óptima en la actividad ATPasa de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$  fue  $37^\circ\text{C}$  (resultados no mostrados), la que corresponde con la temperatura fisiológica. Varias de las ATPasas tipo P<sub>IB</sub>, presentan su mayor actividad a  $37^\circ\text{C}$  como por ejemplo CtpA [17] de *Mtb* y Pma1 [19] el homólogo de CtpF en *M. smegmatis*. Algunos microorganismos extremófilos, presentan ATPasas tipo P<sub>IB</sub> cuya actividad óptima es a una temperatura superior. Tal es el caso de CopA y CopB de *A. fulgidus*, cuya máxima actividad es a  $75^\circ\text{C}$ , mientras que a  $37^\circ\text{C}$  son inactivas [120,163,164].

## 6.2.12 Determinación de las constantes cinéticas

Las ATPasas interactúan con dos sustratos durante el ciclo catalítico, uno de ellos es el ATP que genera la energía necesaria para el transporte de los iones, y el segundo es el ión específico a transportar. Cuando la enzima llega a la concentración de saturación de ATP, la cinética enzimática dependerá solamente de la concentración del ión metálico [165]. Con base a este argumento, es posible evaluar el efecto de la concentración del sustrato en la actividad ATPasa de CtpG, expresada en vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en relación con vesículas de membrana de la misma cepa, con el vector vacío como control. Nosotros previamente hemos realizado ensayos de actividad ATPasa en vesículas de membrana para determinar las constantes cinéticas de CtpA [17], CtpE, CtpF y CtpH [18] de *Mtb*; y Pma1 [19] el homólogo de CtpF en *M. smegmatis*. Por lo que es un protocolo estandarizado y que ha dado resultados confiables de las enzimas estudiadas.

De acuerdo a las condiciones de reacción establecidas, se llevó a cabo la determinación de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , mediante las herramientas que ofrece el programa GraphPad Prism 6 versión 6.01 (La Joya, California USA), disponible en [www.graphpad.com](http://www.graphpad.com).

Como se muestra en la figura 6-21 A, la actividad ATPasa de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$  muestra una cinética aparente del tipo *Michaelis-Menten*:

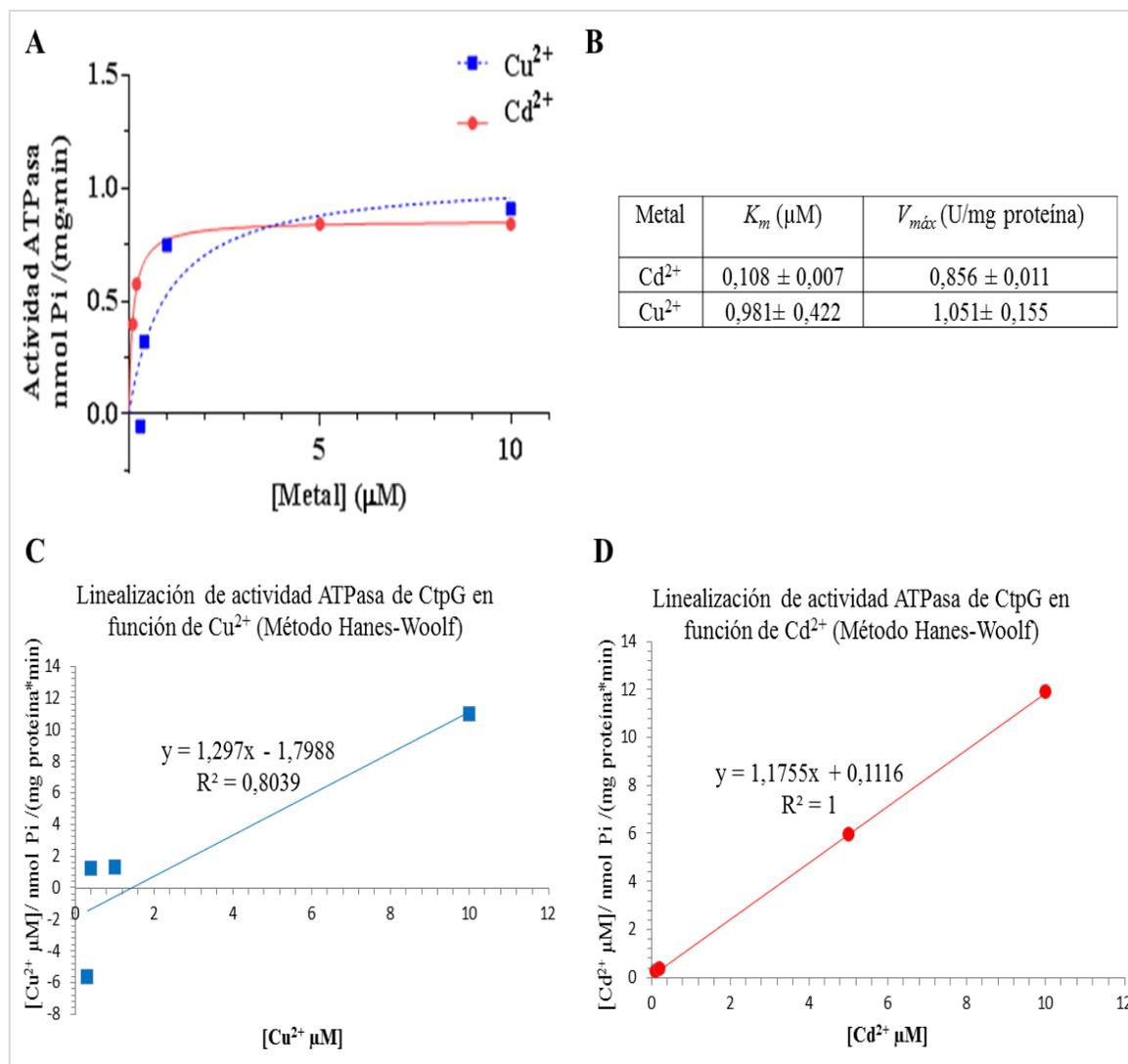
$$v_0 = \frac{V_{m\acute{a}x}[S]}{K_m + [S]}$$

Donde  $v_0$  es la velocidad de reacción,  $V_{m\acute{a}x}$  es la velocidad máxima,  $[S]$  es la concentración de sustrato, es decir la concentración del catión metálico y  $K_m$  es la constante de *Michaelis*. Cuando  $v_0 = \frac{1}{2} V_{m\acute{a}x}$ ,  $K_m$  representa la cantidad de sustrato [ $\mu\text{M}$ ] necesario para unirse a la mitad de enzima disponible y producir la mitad de  $V_{m\acute{a}x}$  [165].

En la cinética de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$ , se obtuvo los valores  $V_{m\acute{a}x}$   $0.856 \pm 0.011$  (U/mg de proteína) y  $K_m$   $0.108 \pm 0.007$   $\mu\text{M}$ ; mientras que en función de  $\text{Cu}^{2+}$  se obtuvo los valores  $V_{m\acute{a}x}$   $1,051 \pm 0,155$  (U/mg de proteína) y  $K_m$   $0,981 \pm 0,422$   $\mu\text{M}$ . En la cinética de CtpG en función de  $\text{Cu}^{2+}$ , se evidencia que varios de los datos se salen de una tendencia tipo *Michaelis- Menten*. Para esto, fue necesario hacer una linealización con el método de Hanes Woolf [166]:

$$\frac{[S]}{v} = [S] \frac{1}{V_{m\acute{a}x}} + \frac{K_m}{V_{m\acute{a}x}}$$

Esta linealización permitió confirmar que la cinética de CtpG dependiente de  $\text{Cd}^{2+}$ , es del tipo *Michaelis-menten* ya que todos los datos fueron linealizados con  $R^2$  igual a 1, mientras que en la cinética de CtpG dependiente de  $\text{Cu}^{2+}$ , varios de los datos quedaron fuera de la linealización (Figura 6-21 C y D). De acuerdo con las constantes de afinidad resultantes, se puede concluir que CtpG es más afín por  $\text{Cd}^{2+}$ , ya que presenta una  $K_m$  más baja en comparación a la  $K_m$  obtenida en función de  $\text{Cu}^{2+}$ . Para la estimación de la constante de recambio  $K_{cat}$ , se consideró que la concentración de CtpG es homogénea en las vesículas de membrana, por lo que se hizo una aproximación de la eficiencia catalítica de la reacción dependiente de  $\text{Cd}^{2+}$  ó  $\text{Cu}^{2+}$  mediante la relación  $V_{m\acute{a}x}/K_m$  [165]. En este sentido, la posible eficiencia catalítica de CtpG en función de  $\text{Cd}^{2+}$  sería  $7,898 \pm 1,576$  y en función de  $\text{Cu}^{2+}$  sería  $1,0717 \pm 0,3672$ , esto sugiere que  $\text{Cd}^{2+}$  puede ser más eficientemente transportado por la enzima.



**Figura 6-21. Efecto de la concentración de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  en la actividad ATPasa sobre vesículas de membrana enriquecidas con CtpG.** Cinética de la reacción enzimática en función de  $\text{Cu}^{2+}$  y  $\text{Cd}^{2+}$  (A). Determinación de las constantes cinéticas  $K_m$  y  $V_{\text{máx}}$  mediante el programa GraphPad Prism 6 versión 6.01 (B). Linealización de la actividad enzimática empleando el método de Hanes Woolf en función de  $\text{Cu}^{2+}$  (C) y en función de  $\text{Cd}^{2+}$  (D). Los ensayos se realizaron por triplicado técnico. Las barras de errores corresponden a la desviación de los datos, expresada como el SEM. Las diferencias estadísticamente significativas, se determinaron mediante la prueba t-student con valores de  $p < 0,05^*$ .

En comparación con las constantes cinéticas para otras ATPasas Tipo  $P_{1B}$  de *Mtb*, determinadas de manera similar respecto a este estudio, se observa que CtpA en función de  $\text{Cu}^+$  presenta valores de  $K_m$  de  $0,0468 \pm 0,00168 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}}$  de  $10,3 \pm 0,16 \text{ U/mg}$  de proteína [17]. CtpG presenta valores superiores de  $K_m$  para los cationes evaluados  $\text{Cd}^{2+}$  y  $\text{Cu}^{2+}$ , por lo que se esperaba obtener valores de  $V_{\text{máx}}$  mayores, no obstante estos son inferiores respecto a los de CtpA indicando menor actividad enzimática. CtpD una  $\text{Co}^{2+}$  ATPasa de *Mtb* presenta valores  $K_m$  de  $4,1 \pm 0,9 \mu\text{M}$  y  $V_{\text{máx}}$  de  $0,62 \pm 0,03$

U/mg de proteína (las unidades enzimáticas fueron reportadas como  $\mu\text{mol/h}$ , en contraste con CtpG, cuyas unidades enzimáticas son  $\text{nmol/min}$ ), estas constantes fueron determinadas a partir de proteína pura [156].

En este momento son muy pocas las  $\text{Cd}^{2+}$  ATPasas que se han estudiado en microorganismos: CadA de *S.aureus* [123], ZntA de *S. sonnei* [105] y ZntA de *E.coli* [167]. De las anteriores, solo de la última se han reportado constantes cinéticas; de las otras dos se conoce que su actividad enzimática es dependiente de  $\text{Cd}^{2+}$ ,  $\text{Pb}^{2+}$  ó  $\text{Zn}^{2+}$ . ZntA de *E. coli*, presenta valores de  $K_m$  de  $6,9 \pm 0,6 \mu\text{M}$  y  $V_{m\acute{a}x}$  de  $0,88 \pm 0,1 \text{U/mg}$  de proteína (las unidades enzimáticas fueron reportadas como  $\mu\text{mol/h}$ ), cuando la actividad enzimática es dependiente de  $\text{Pb}^{2+}$  [167]. Esto muestra que el valor de  $V_{m\acute{a}x}$  es superior respecto al valor obtenido de CtpG dependiente de  $\text{Cd}^{2+}$  ( $0,856 \text{U/mg}$  de proteína, unidades enzimáticas expresadas como  $\text{nmol/min}$ ). Respecto a los resultados de actividad de CtpG en función de  $\text{Cu}^{2+}$ , CopB, una  $\text{Cu}^{2+}$  ATPasa de *A. fulgidus* presenta valores de  $K_m$  y  $V_{m\acute{a}x}$  son  $0,28 \pm 0,09 \mu\text{M}$  y  $5 \pm 0,4 \text{U/mg}$  de proteína [163], respectivamente. Se puede inferir que cuando las constantes cinéticas se han determinado a partir de vesículas de membrana son inferiores respecto a aquellas que han sido determinadas desde proteína pura. Por lo que son valores relativos y aparentes [168].

Como se describió en la parte bioinformática, CtpG presenta el motivo APCAL, por lo que carece de una de las cisteínas necesarias para la coordinación del Cu. Aunque no es muy clara la interacción de este motivo con el metal, puede ser que esto explique porque  $\text{Cu}^{2+}$  no es el principal sustrato de la enzima de acuerdo a los resultados de esta investigación. Es importante resaltar que en las  $\text{Cu}^{2+}$  ATPasas el motivo de unión a metal presenta una sustitución de histidina (CPH), el que continua siendo diferente al motivo de unión de CtpG. Otro motivo que es importante para el transporte de Cu es el motivo MBD, el que se encuentra solamente en CtpA y CtpB de *Mtb*. No obstante CtpV, una  $\text{Cu}^+$  ATPasa que es enzimáticamente activa, carece de este motivo, por lo que se le ha atribuido una función regulatoria.

Hasta el momento se han reportado las constantes cinéticas de 3 de las 7 ATPasas tipo  $\text{P}_{1\text{B}}$  de *Mtb* (CtpA, CtpC, CtpD). Se espera que los resultados de esta investigación contribuyan a la determinación de estas en CtpG.

### 6.2.13 Diseño de péptidos antigénicos derivados de CtpG

Actualmente, nuestro grupo no cuenta con herramientas inmunológicas diferentes a las comerciales, que permitan analizar el nivel de expresión de alguna de las ATPasas tipo P nativas de *Mtb*. Por esta razón se propuso producir péptidos antigénicos derivados de CtpG, los que podrán ser usados para la producción de anticuerpos policlonales.

En la respuesta inmune una proteína puede ser reconocida de forma localizada, es decir que dentro de su secuencia se reconocerán regiones puntuales que pueden ser lineales o continuas, lo que dependerá de las propiedades específicas de los residuos de aminoácidos como la hidrofiliidad, carga, superficie expuesta y estructura secundaria en la secuencia [169,170]. También se puede presentar un reconocimiento estructural o discontinuo basado en la estructura terciaria [169]. Cada una de estas regiones se denomina epítipo, las que serán reconocidas por los anticuerpos mediante regiones determinantes de la complementariedad CDR (por sus siglas en inglés *Complementarity Determining Region*). Es decir que en una respuesta humoral se generaran anticuerpos específicos para cada epítipo, obteniendo como resultado el reconocimiento de la proteína completa [170]. El diseño de péptidos antigénicos se basa en el anterior argumento, por lo que cada secuencia sintetizada representará un epítipo de la proteína original [170].

En el diseño de los péptidos se desarrolló la siguiente estrategia: inicialmente se realizó la predicción de regiones antigénicas de la proteína mediante el servidor bioinformático ofrecido por *Immunomedicine Group Tools* ([imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl](http://imed.med.ucm.es/Tools/antigenic.pl)). Este hizo la predicción basado en el método semi-empírico propuesto por Kolaskar y Tongaonkar [109], el que tiene como parámetros de selección la hidrofiliidad, flexibilidad y accesibilidad de los residuos de aminoácidos al solvente [109,170] (Ver Figura 6-22 A). Además el predictor tiene en cuenta residuos de aminoácidos que experimentalmente han sido encontrados en epitopes de proteínas. De acuerdo con estos parámetros, el predictor asigna una puntuación a cada residuo que corresponde a la probabilidad de ser encontrado en una región antigénica. Aquellos con un valor por encima de 1 se consideran potencialmente antigénicos (Cisteína (C), Leucina (L), Valina (V) principalmente), ya que pertenecen a regiones expuestas y que están en epítipes comprobados. Seguidamente, se encontró que CtpG tiene un valor promedio de 1.0528 de propensidad antigénica, es decir que la mayoría de residuos que conforman la proteína tienen una puntuación igual o superior a 1, por lo que se predice ser una proteína con potencial antigénico. El predictor también entregó una lista de 35 posibles epítipes de CtpG (Ver Figura 6-22 B).

Además se realizó la superposición de los modelos 3D predichos para CtpG, con el propósito de seleccionar manualmente los loops extracitoplasmáticos, ya que en una respuesta humoral serían los primeros en ser reconocidos [171] (Ver figura 6-22 C y D). De las regiones más expuestas, se seleccionaron 6 posibles epítopes (ETSDACCDGEDNEDREP, LVAAWAYPLWPVVL, SLKRAEGRVGVGTMTIAAL, LGAVALGELGE, GTGSVLGNPLWIERA y TVLMPLALFG-ILGLAAVV), luego se compararon con la lista de epítopes antigénicos predichos, encontrándose que los 5 últimos estaban incluidos. Sin embargo los 6 epítopes expuestos se tuvieron en cuenta en el proceso de síntesis como se discute más adelante.

A



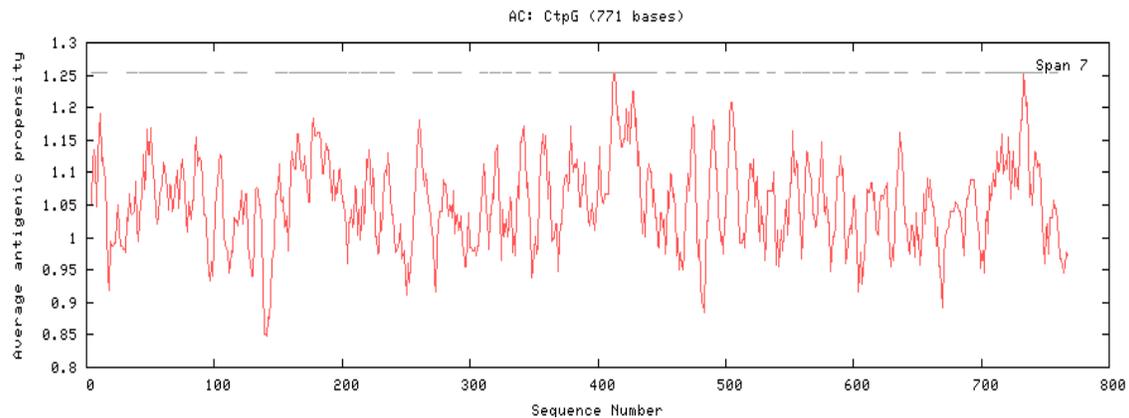
PREDICTED ANTIGENIC PEPTIDES

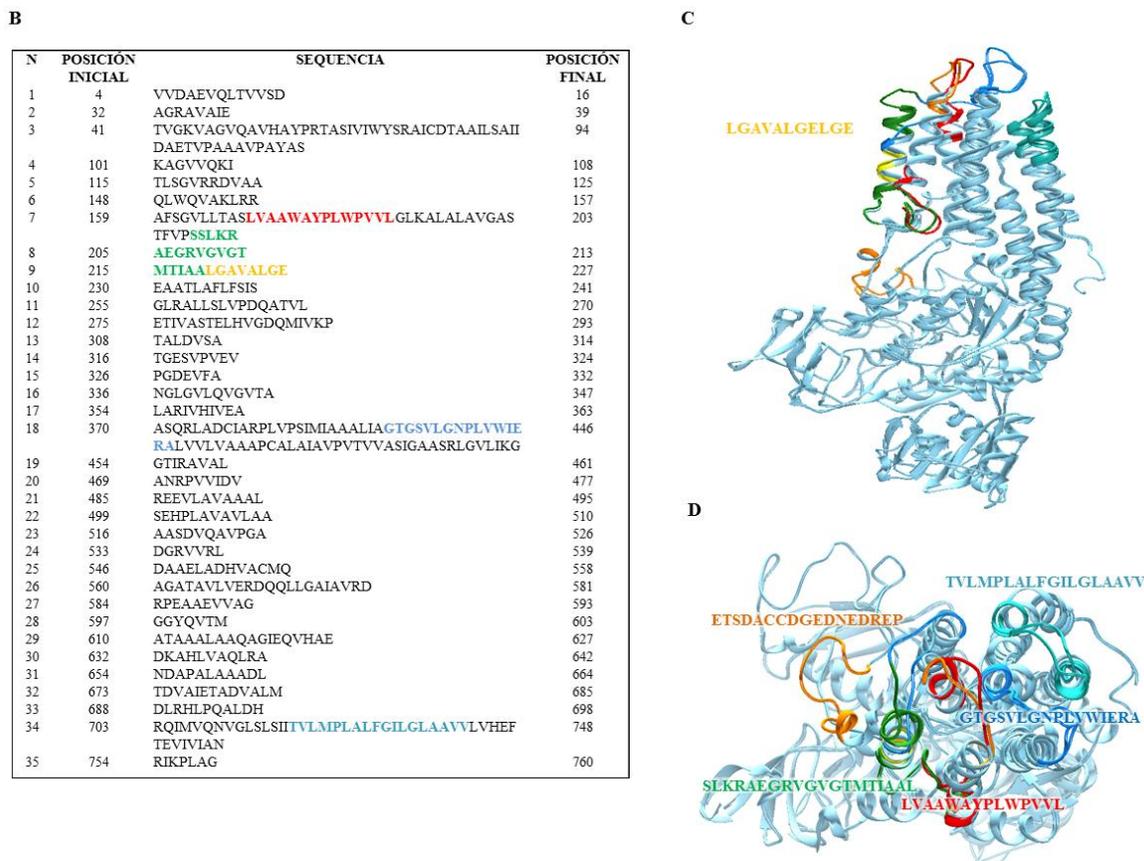
## Results

Your CtpG sequence is 771 residues long

Average antigenic propensity for this protein is 1.0528

Antigenic plot for sequence CtpG



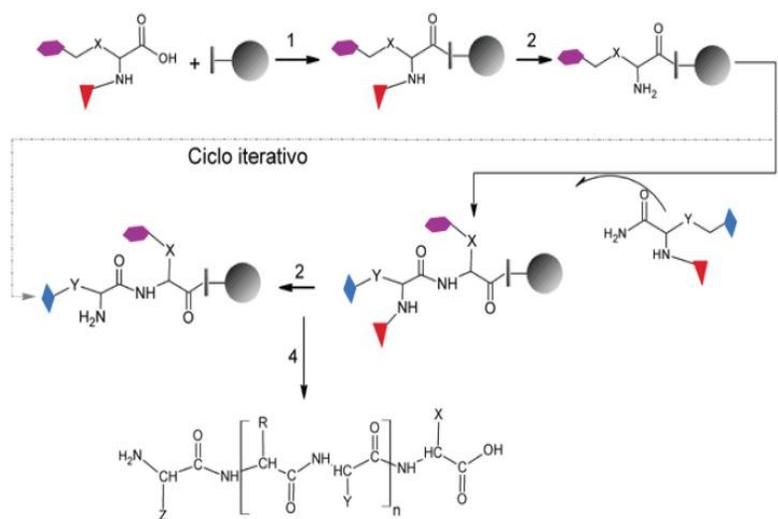


**Figura 6-22. Predicción de regiones antigénicas de CtpG.** A Diagrama de propensión antigénica de CtpG, de acuerdo al método propuesto por Kolaskar y Tongaonkar [109]. Valores superiores a 1 indican que el residuo es potencialmente antigénico. B Lista de posibles epítopes de CtpG: esta posee 35 secuencias con propiedades antigénicas predichas. C. Superposición de los modelos de estructura terciaria predichos para CtpG (Modelos obtenidos por homología mediante el servidor *Phyre*<sup>2</sup> y *Swiss model*, usando como plantilla CopA de *A. fulgidus*, PDB ID 3j09) y selección de regiones más expuestas. D. Vista superior de las regiones expuestas, cada secuencia seleccionada se muestra de color: Naranja en ETSDACCDGEDNEDREP, rojo en LVAAWAYPLWPVVL, en verde SLKRAEGRVGVGTMTIAAL, en amarillo LGAVALGELGE, en azul GTGSVLGNPLWIERA y en cian claro TVLMPLALFGILGLAAVV.

### 6.2.14 Síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS)

La elaboración de péptidos sintéticos ha sido muy importante en la investigación, específicamente en el desarrollo de nuevos fármacos, antimicrobianos, epítopes de proteínas y como candidatos a vacunas [172]. Hay varios métodos de producción de péptidos, entre ellos, la síntesis enzimática, sistemas de expresión acelulares [170] (basada en procesos de traducción *in vitro* para producción de polipéptidos funcionales [173]) y síntesis química, esta última es una rama bien consolidada [170,172].

La síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS) fue creada por Bruce Merrifield en 1963 [174,175], basada en el anclaje de uno a uno de los aminoácidos en un soporte sólido que es insoluble e inerte y permite lavar y filtrar los desechos de acoplamiento, elongando la cadena peptídica sobre el soporte, en contraste a la síntesis en solución en la que era necesario purificar el producto de la ligación en cada paso.



**Figura 6-23. Síntesis de péptidos en fase sólida, tomado de [170]**

En la SPFS se unen secuencialmente los aminoácidos a una resina en dirección del carboxi terminal al amino terminal, contrariamente a como ocurre la síntesis proteica en el ribosoma. A la postre se repiten pasos de lavado, desprotección, acople, lo que permite sistematizar el proceso. Los aminoácidos están protegidos en el  $\alpha$ -N y en las cadenas laterales para evitar reacciones indeseadas.

Actualmente, se usan dos estrategias de protección que son *t-Boc/Bzl* (ter-butoxicarbonilo/bencilo) y *Fmoc/t-Bu* (9-Fluorenilmetoxicarbonilo/ter-butilo), que poseen una zona lábil a las bases o a los ácidos. En la primera estrategia t-Boc protege el  $\alpha$ -N y Bzl las cadenas laterales, estos pueden ser retirados con ácido trifluoroacético (TFA); en la segunda estrategia, el grupo Fmoc protege el  $\alpha$ -N y t-Bu las cadenas laterales, los que pueden ser removidos con piperidina y TFA respectivamente. El TFA también es empleado en la separación del péptido de la resina (clivaje) [170,176].

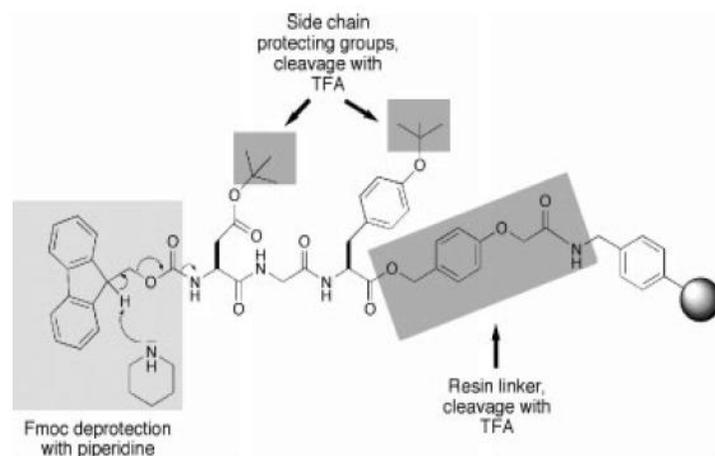


Figura 6-24. Estrategia Fmoc/t-butil, síntesis en fase sólida. Tomado de [177]

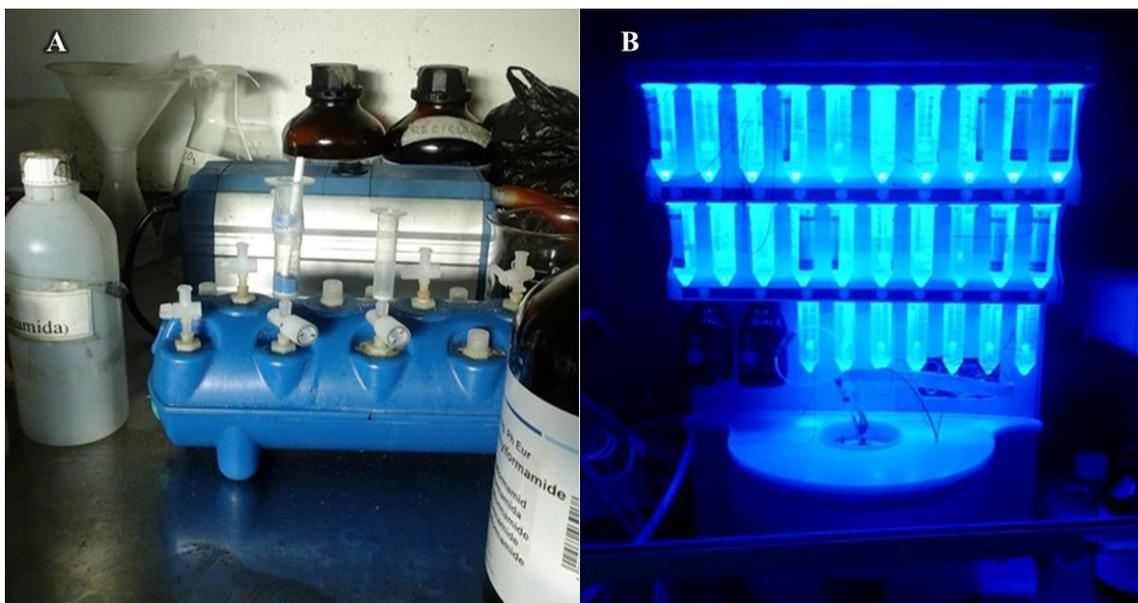
### 6.2.15 Síntesis y caracterización de péptidos antigénicos derivados de CtpG

El diseño bioinformático de los péptidos elucidó 6 posibles secuencias con capacidad antigénica derivadas de CtpG, las que fueron consideradas para ser sintetizadas por la técnica SPFS. Inicialmente se asignó un código a cada secuencia (Tabla 6-5), ya que se registraron en la peptidoteca del Núcleo de Biotecnología Curauma en la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso, en Chile, donde se realizó la síntesis y caracterización de los péptidos. Algunas de las secuencias fueron modificadas, como la correspondiente al péptido 2256, en la que los dos residuos de cisteína fueron sustituidos por residuos de treonina ya que la cisteína tiene la capacidad de formar enlaces disulfuro, lo que llevaría a la polimerización del péptido.

Péptido	Posición	Secuencia (N-Term a C-Term)	N° Residuos	Peso Molecular (g/Mol)
2256	130-146	ETSDATTDGEDNEDREP	17	1880,74
2257	169-182	LVAAWAYPLWPVVL	14	1597,94
2258	200-220	SLKRAEGRVGVGTMTIAAL	19	1930,28
2259	220-230	LGAVLALGELGE	11	1028,16
2260	395-410	GTGSVLGNPLWIERA	16	1668,89
2261	718-735	TVLMPLALFGILGLAAVV	18	1798,28

Tabla 6-5. Péptidos antigénicos derivados de CtpG. Se muestra la secuencia de cada péptido y la posición que ocupa en la proteína original, también su peso molecular y el código asignado.

Posteriormente se realizó la síntesis de los péptidos en sintetizador Liberty Blue<sup>™</sup> Automated Microwave Peptide Synthesizer (CEM Corp., Matthews, NC, USA) usando DIC como activador del grupo carbonilo y OXIMA para evitar racemizaciones. El péptido 2261 fue además sintetizado de manera manual, como lo muestra la siguiente figura:



**Figura 6-25. Síntesis de péptidos en fase sólida (SPFS).** La SPFS se puede realizar de manera manual en jeringa (A) o de manera automática en sintetizador (B).

Como resultado se logró sintetizar cada uno de los péptidos, sin embargo el péptido 2261 resulto muy insoluble. Por esta razón se realizó una modificación en el amino terminal de su secuencia, acoplado adicionalmente cisteína y glicina (aumentan solubilidad), aumentando su peso molecular a 1958,51g/mol. Aun así el péptido modificado fue muy insoluble, y no pudo ser caracterizado, por lo que fue descartado del estudio.

Los péptidos fueron analizados inicialmente por cromatografía en fase reversa RP-HPLC. Los cromatogramas mostraron varios picos, por lo que se procedió a realizar una cromatografía preparativa partiendo de 10 mg de péptido. Para esto se realizó la purificación en columnas Sepak C-18 (Clean-Up<sup>®</sup> CEC18153 extraction columns, UCT, Bristol, PA, USA) en fase reversa, usando acetonitrilo como solvente de 0-100%. El péptido 2259 fue solamente desalinizado en columna de Sephadex G-10 basado en el principio de exclusión molecular. A continuación se muestra el tiempo de retención de cada péptido después de su purificación o desalinización, también el porcentaje de rendimiento de la purificación, teniendo como base la cantidad inicial de péptido crudo, respecto a la cantidad obtenida tras el tratamiento.

Péptido	Método De Purificación	Tiempo De Retención (Min)	% Rendimiento	Masa teórica*	Masa ESI-MS
2256	C-18: 20% ACN	4.125	75	1880,74	1879,8
2257	C-18: 40% ACN	7.94	43.6	1597,94	1597
2258	C-18: 30% ACN	6.26	32.2	1930,28	1930,3
2259	Desalinización G-10	5.87	95	1028,16	1027,2
2260	C-18: 30% ACN	6.87	28	1668,89	1667,9

**Tabla 6-6. Purificación de los péptidos.** Todos los péptidos fueron purificados por cromatografía en fase reversa en columnas C-18, usando gradiente de acetonitrilo-agua (0-100%), excepto el péptido 2259, el que solamente fue desalinizado en columna G-10. Se muestra el tiempo de retención de cada péptido en el cromatograma tras su purificación y el porcentaje de rendimiento de acuerdo a la cantidad de péptido crudo. \*Masa teórica calculada con <http://pepcalc.com/de> Innovagen.

La tabla 6-6 muestra el tiempo de retención durante la cromatografía de cada péptido, el que también puede dar indicios sobre su hidrofobicidad. Así por ejemplo se aprecia que el péptido 2256 es menos hidrofóbico, respecto a los demás péptidos, siendo retenido hasta el minuto 4.125. También el péptido 2257 es uno de los más hidrofóbicos por lo que es retenido hasta el minuto 7.94.

Posterior a la purificación o desalinización, se sometió una pequeña fracción de la muestra al equipo de RP-HPLC, obteniendo cromatogramas con un solo pico en la mayoría de las muestras, el que representa al péptido de interés (Figura 6-26 a 6-30, sección A y B). El péptido 2258 tiene en su secuencia un residuo de metionina, por lo que en el cromatograma, después de purificar se aprecian dos picos que corresponden a los estados reducido y oxidado del aminoácido. El rendimiento de la purificación fue variable, sin embargo la cantidad obtenida es suficiente para la producción de anticuerpos policlonales, en la que se requieren alrededor de 100 µg por inoculación [178].

En los casos en los que se presentó más de un pico en los cromatogramas, aún después de su purificación, esto se debe a posibles deleciones del péptido o a subproductos, por lo que paralelamente se confirmó el peso molecular de cada péptido por espectrometría de masas (ESI-MS) (Figura 6-26 a 6-30, sección C). Se encontró que el peso molecular corresponde a cada péptido. Específicamente los péptidos 2256, 2257, 2259 y 2260 perdieron una unidad de su peso debido a la pérdida de un protón hidrógeno durante la ionización. También se observó que los péptidos 2256 y 2258 presentaron algunas deleciones que aparecen en el espectro de masas, sin embargo un 80% de pureza, es suficiente en péptidos sintéticos destinados para anticuerpos policlonales.

Finalmente se caracterizó la estructura secundaria de cada péptido mediante el espectro de diroísmo circular (DC), en una solución de 30% de trifluoroetanol (TFE), la que retira moléculas

de H<sub>2</sub>O del péptido, forzándolo a tomar una estructura secundaria específica (Figura 6-26 a 6-30, sección D). Los cromóforos de interés en el estudio de proteínas y péptidos incluyen el enlace peptídico que absorbe por debajo de 240 nm, también cadenas laterales de aminoácidos aromáticos como fenilalanina, tirosina y triptófano, los que absorben en el espectro UV cercano (260-320 nm) y los puentes disulfuro que absorben alrededor de 260 nm. Por lo tanto la absorción en la región de 240 nm e inferior, se debe principalmente al enlace peptídico, en el que se presentan dos transiciones importantes:  $n-\pi^*$ , el que absorbe alrededor de 220 nm, y  $\pi-\pi^*$  que absorbe es alrededor de 190 nm [179]. Consecuentemente, en el espectro DC del péptido 2256 se aprecian tres mínimos, a 190 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -12500), 197 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -34000) y 212,5 nm (transición negativa  $n-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -10000), correspondiente a una estructura irregular.

En el espectro DC del péptido 2257 se aprecia un máximo, a 190 nm (transición positiva  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de 1000), y dos mínimos a 202 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -9500) y 230 nm (transición negativa  $n-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -1250), correspondiente a una estructura irregular.

En el espectro DC del péptido 2258 se aprecia un máximo, a 190 nm (transición positiva  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de 100), y dos mínimos a 200 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -25000) y 213 nm (transición negativa  $n-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -3000), correspondiente a una estructura irregular.

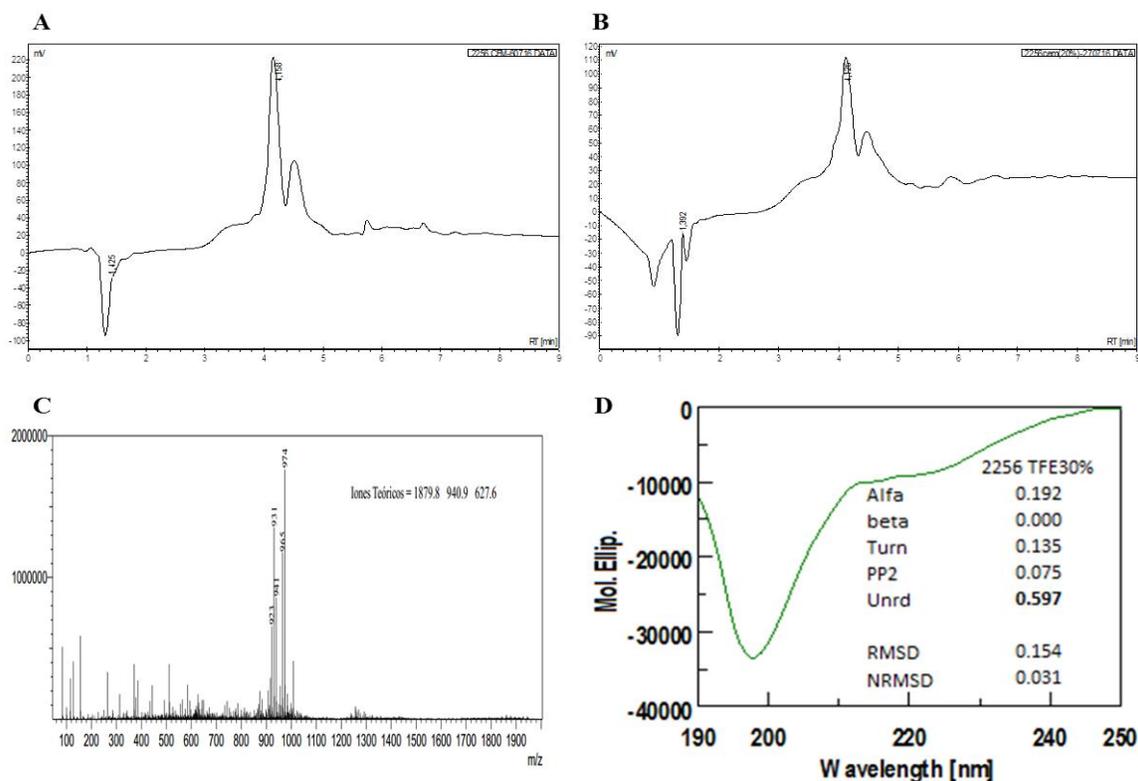
En el espectro DC del péptido 2259 se aprecian tres mínimos, a 190 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -2000), 199 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -21000) y 215 nm (transición negativa  $n-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -3000), correspondiente a una estructura irregular.

Por último, en el espectro DC del péptido 2260 se aprecia un máximo, a 192 nm (transición positiva  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de 24000), dos mínimos a 206 nm (transición negativa  $\pi-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -17000) y 215 nm (transición negativa  $n-\pi^*$  con  $[\theta]$  aproximado de -15000), por lo que parece ser un híbrido entre una estructura irregular y una  $\alpha$ -hélice (presenta dos mínimos a 208 nm y 222 nm [179]).

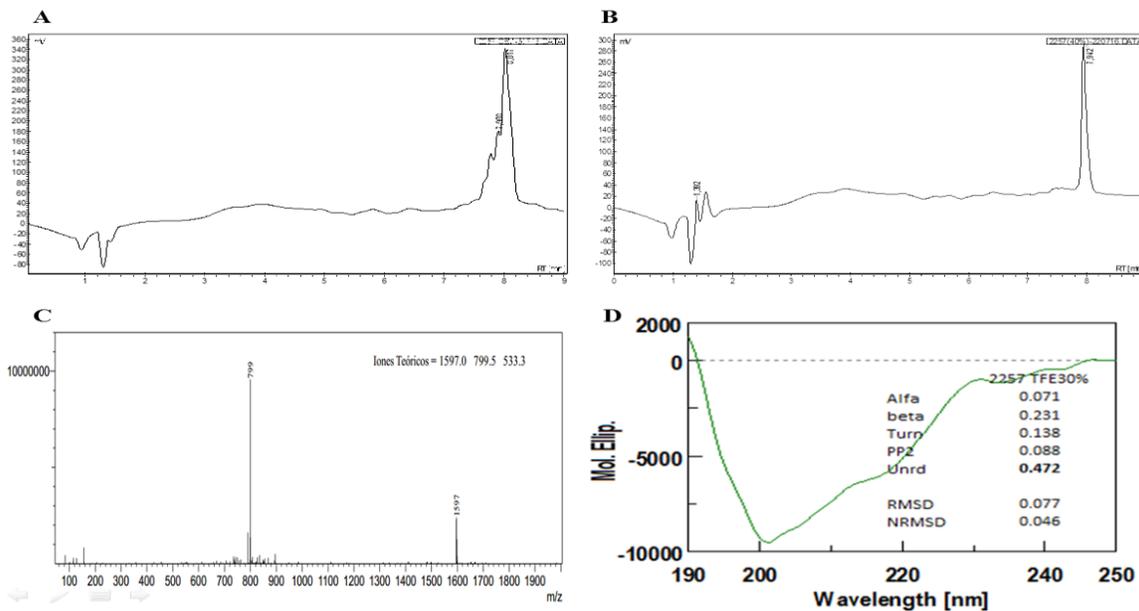
Los parámetros principales que determinan la estructura secundaria de una proteína o péptido son la relación entre los ángulos diédricos *Phi* y *Psi*, la energía de enlace que conlleva a la formación de puentes de hidrogeno, interacciones entre cadenas, efectos estéricos e interacciones hidrofóbicas

con la estructura terciaria [180]. En este sentido, teniendo en cuenta que los péptidos están aislados del entorno de la proteína original, la estructura secundaria dependerá de la secuencia de aminoácidos, por lo que se esperaría que tuviera estructuras irregulares debido a la presencia de prolina y glicina, pero también parte de estructura de  $\alpha$ -hélice por el alto contenido de residuos hidrofóbicos como alanina y leucina, en menor proporción se esperaría formación de hojas  $\beta$  por la presencia de valina [181,182]. Sin embargo, la mayoría de péptidos presentaron una estructura secundaria irregular mediante DC, sugiriendo que a las condiciones del ensayo y debido al ambiente que genera la presencia de TFE, sea la conformación más estable. Lo anterior se correlaciona con el análisis bioinformático, en el que se habían seleccionado estructuras expuestas de la proteína.

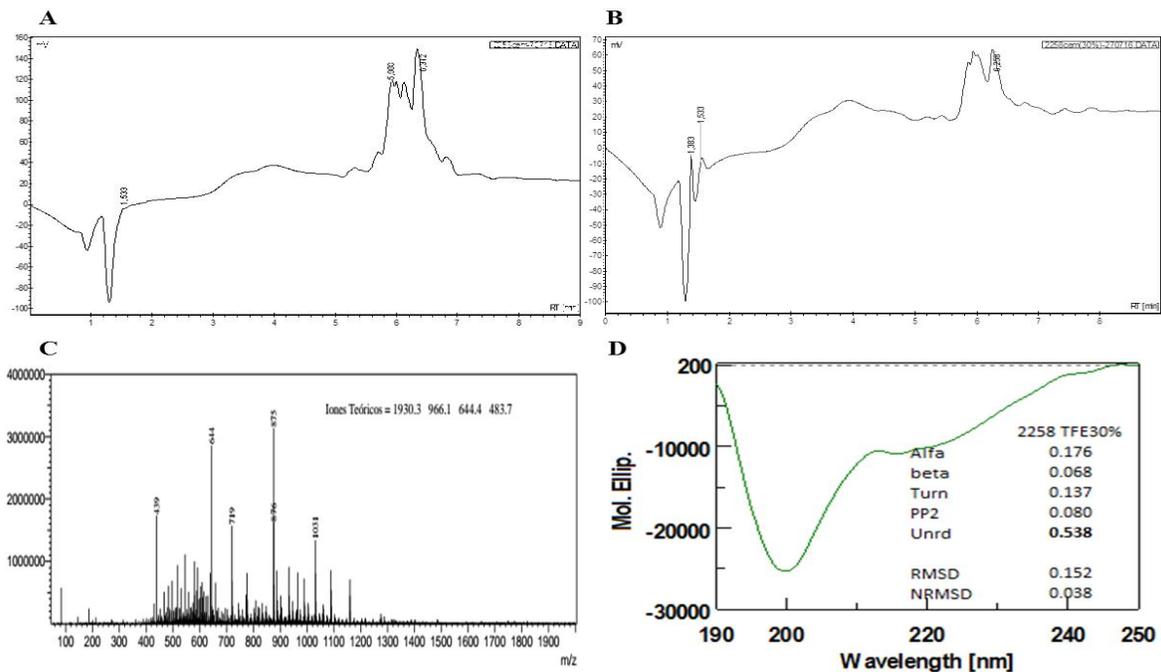
Finalmente se resalta que el alineamiento de CtpG con ATPasas tipo P<sub>1B</sub> de *Mtb* (Figura 6-3), evidenció que el péptido 2256 es una secuencia no conservada, por lo que es específica de CtpG y podría considerarse como un marcador de la proteína durante la infección.



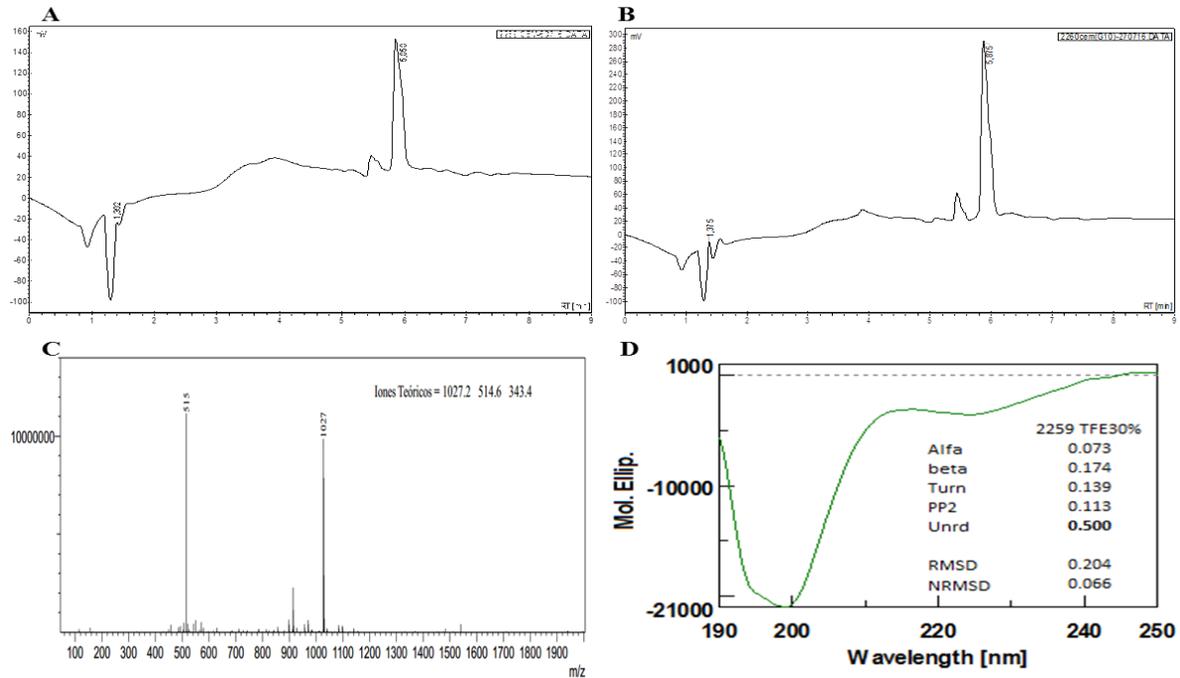
**Figura 6-26. Caracterización del péptido 2256.** Cromatograma antes de purificar (A) y purificado en columna de C-18, fracción 20% de acetonitrilo (B). Espectro de masas detector PDA (C) y análisis de estructura secundaria por dicroísmo circular (DC) (D).



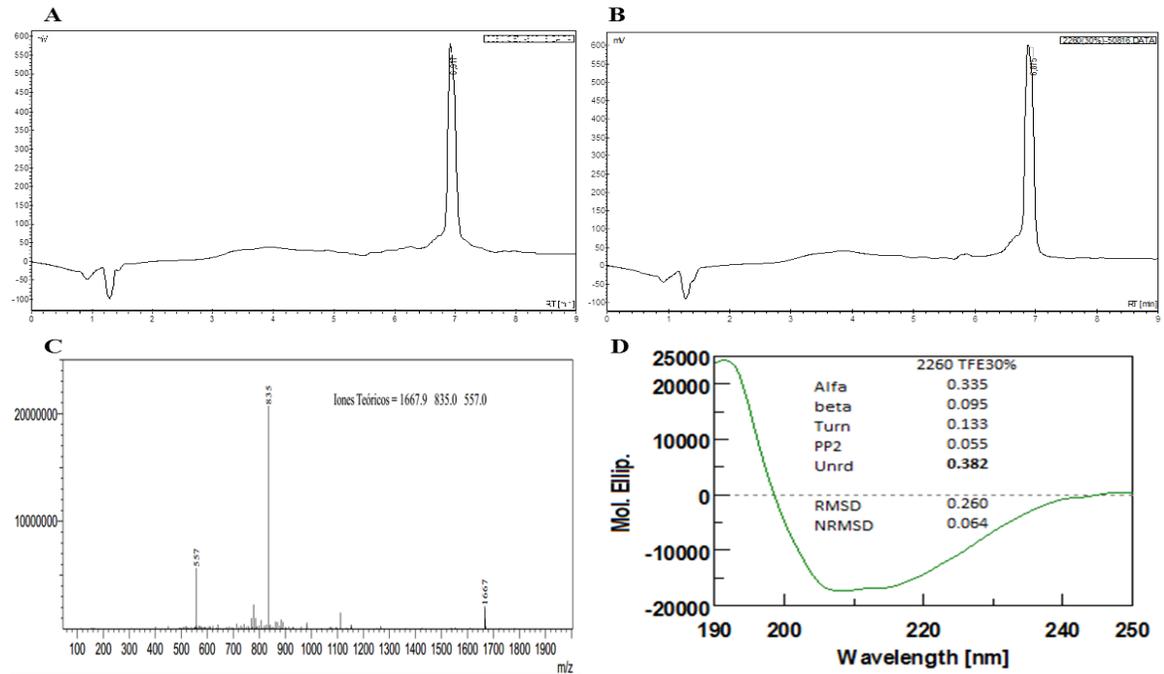
**Figura 6-27. Caracterización del péptido 2257.** Cromatograma antes de purificar (A) y purificado en columna de C-18, fracción 40% de acetonitrilo (B). Espectro de masas detector PDA (C) y análisis de estructura secundaria por DC (D).



**Figura 6-28. Caracterización del péptido 2258.** Cromatograma antes de purificar (A) y purificado en columna de C-18, fracción 30% de acetonitrilo (B). Espectro de masas detector PDA (C) y análisis de estructura secundaria por DC (D).



**Figura 6-29. Caracterización del péptido 2259.** Cromatograma antes de purificar (A) y desalinizado en columna de G-10 (B). Espectro de masas detector PDA (C) y análisis de estructura secundaria por DC (D).



**Figura 6-30. Caracterización del péptido 2260.** Cromatograma antes de purificar (A) y purificado en columna de C-18, fracción 30% de acetonitrilo (B). Espectro de masas detector PDA (C) y análisis de estructura secundaria por DC (D).

## 7. Conclusiones y Perspectivas

### 7.1 Conclusiones

El análisis bioinformático permitió identificar y diferenciar motivos funcionales de ATPasas tipo P en CtpG y elucidar la ausencia del dominio MBD. Adicionalmente, se ubicaron los motivos involucrados en la unión del metal como APCAL, QN(X)<sub>3</sub>S y HEFTE, los que no se correlacionan totalmente con ATPasas tipo P cristalizadas.

El análisis de la expresión génica indicó que una concentración subletal de Cd<sup>2+</sup> induce la expresión de *ctpG* 2,88 veces ( $\pm 0,544$ ). Esta información fue útil como parámetro de partida para elucidar la especificidad iónica de la proteína.

Se estandarizaron las condiciones de CtpG recombinante en el sistema procariota *E. coli* LMG194 como concentración de inductor, temperatura y tiempo de inducción. En la fracción asociada a membrana la proteína se expresa desde las 8 horas a 20°C en presencia de 0.3% de L-arabinosa como inductor. En la fracción asociada a cuerpos de inclusión la proteína se expresa desde las 6 horas, sugiriendo que su expresión es principalmente en forma de cuerpos de inclusión.

Los ensayos de actividad ATPasa revelaron que Cd<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup> y Pb<sup>2+</sup> inducen la actividad de CtpG. Las constantes cinéticas fueron determinadas para CtpG dependiente de Cd<sup>2+</sup>, obteniéndose valores de  $V_{m\acute{a}x}$   $0.856 \pm 0.011$  (U/mg de proteína) y  $K_m$   $0.108 \pm 0.007$   $\mu$ M; en contraste la actividad de CtpG dependiente de Cu<sup>2+</sup> elucido valores  $V_{m\acute{a}x}$   $1,051 \pm 0,155$  (U/mg de proteína) y  $K_m$   $0,981 \pm 0,422$   $\mu$ M. Sugiriendo que Cd<sup>2+</sup> puede ser el principal sustrato de CtpG, lo que se relaciona con el regulador transcripcional CmtR, que sensa este metal.

Los ensayos de viabilidad celular en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 mostraron que la expresión de CtpG aumenta la tolerancia a Cd<sup>2+</sup> y Cu<sup>2+</sup> *in vitro*, lo que puede ser extrapolado a la función que desempeña CtpG en *Mtb*.

Los péptidos antigénicos derivados de CtpG se diseñaron y sintetizaron exitosamente, por lo que son una herramienta disponible para la producción de anticuerpos que permitan el reconocimiento de la proteína.

## 7.2 Perspectivas

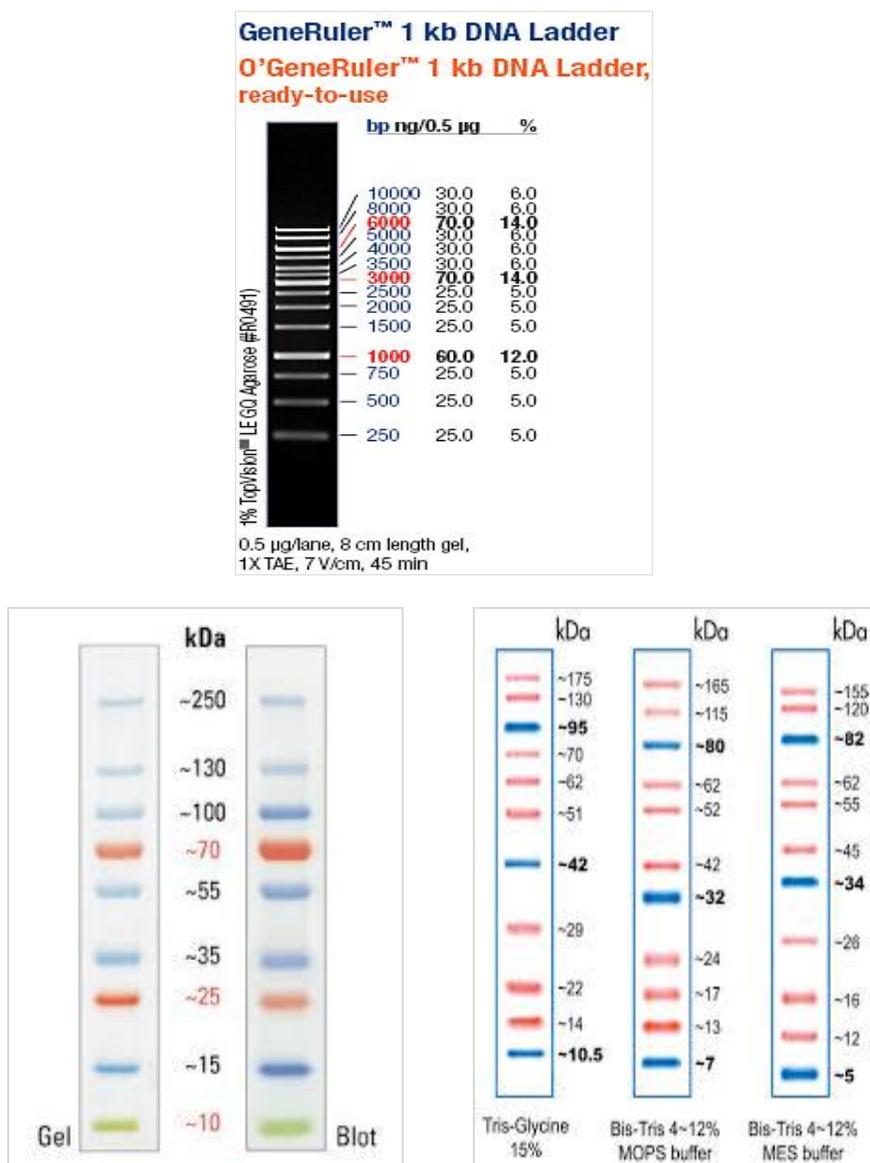
Teniendo en cuenta las herramientas obtenidas durante este trabajo se propone:

A corto plazo, analizar los residuos de aminoácidos de CtpG directamente implicados en el transporte del metal por dinámica molecular.

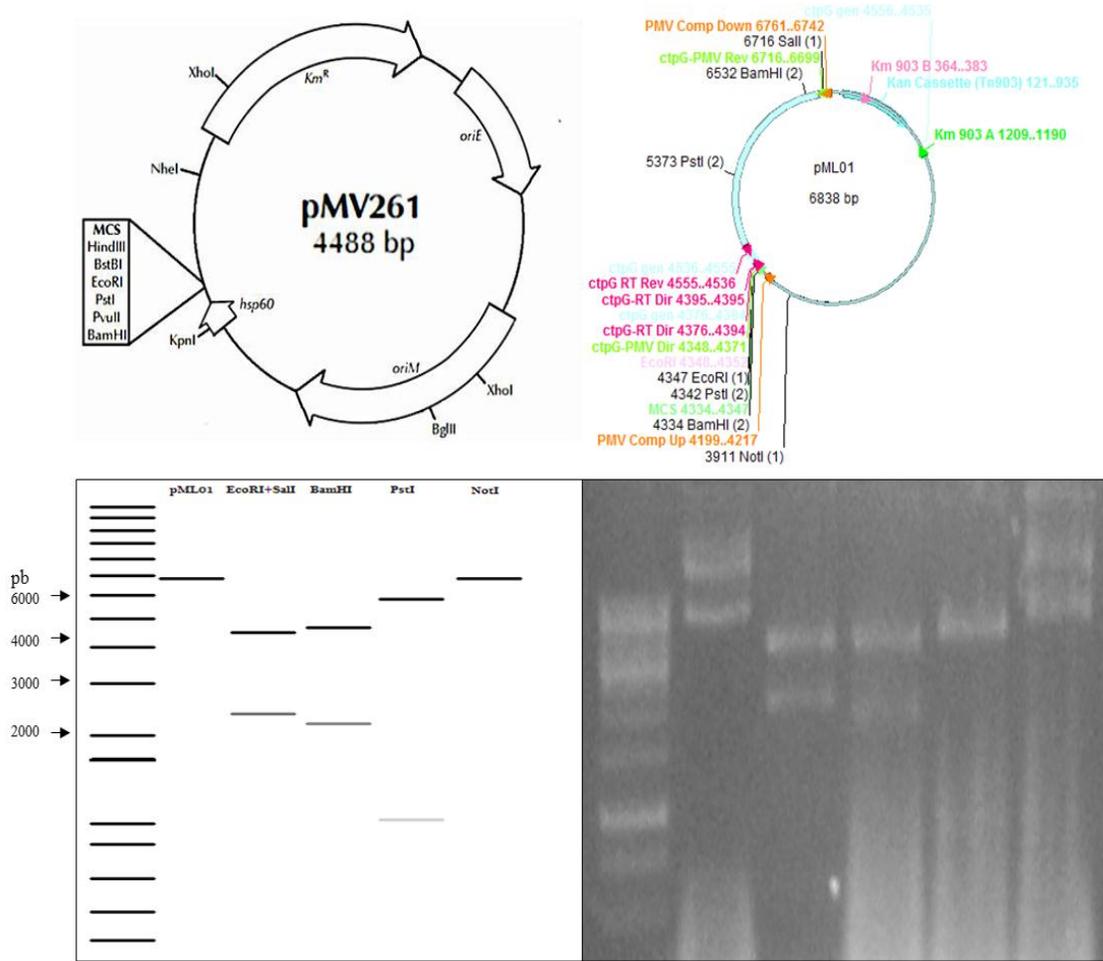
A mediano plazo, corroborar la información obtenida sobre la especificidad iónica de CtpG mediante ensayos de acumulación intracelular del posible metal transportado en mutantes o células sobreexpresando el transportador en la membrana plasmática. También con los péptidos sintetizados, desarrollar herramientas inmunológicas que permitan identificar la proteína nativa durante los estadios de la infección o bajo diferentes condiciones de estrés.

A largo plazo se espera que este trabajo contribuya al conocimiento de los mecanismos de defensa de *Mtb* en su interacción con el hospedero, para proponer nuevas dianas terapéuticas que permitan generar una eficiente vacuna contra la tuberculosis.

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



**Figura A-1.** Marcadores de peso molecular utilizados a lo largo del presente estudio. De izquierda a derecha: Marcador de ADN, GeneRuler 1 kb DNA ladder (Thermoscientific, USA). Marcadores de proteína preteñidos: Page Ruler™ Plus (Thermoscientific, USA) y Opti- Proteín Marker ladder ABM®



**Figura A-2. Información del plásmido recombinante usado en este estudio para la expresión de CtpG en micobacteria (pML01).** Se muestra el vector pMV261 en donde se realizó la clonación [115]. Mapeo con enzimas de restricción



**Figura A-4. Secuenciación de pML06 con cebador directo.** Los resultados de la secuenciación y la secuencia de *ctpG* se alinearon en el servidor Clustal Omega de EMBI. A continuación se muestran los resultados de la secuenciación: Alineamiento del resultado de secuenciación de pML06 y la secuencia esperada. El resultado superior corresponde a la secuencia de pML06 y el resultado inferior corresponde a la secuenciación usando el primer pBAD Comp Up.

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

```

Esperado          TTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTAACCATGGATCCGAGCTCGAGAGTGACGACTGTAGT
Secuenciación     -----TAACCCGAGCTCGAGAGTGACGACTGTAGT
                  * *****

Esperado          TGACGCCGAGGTCCAGCTGACCGTTGTATCCGATGCAGCCGGGCGGATGCGTGTGCAGGC
Secuenciación     TGACGCCGAGGTCCAGCTGACCGTTGTATCCGATGCAGCCGGGCGGATGCGTGTGCAGGC
                  *****

Esperado          CACCGGGTTTCAGTTCGACGCGGGACGGGCCGTTGCGATCGAGGACACCGTCGGCAAGGT
Secuenciación     CACCGGGTTTCAGTTCGACGCGGGACGGGCCGTTGCGATCGAGGACACCGTCGGCAAGGT
                  *****

Esperado          GGCCGGTGTGCAGGCCGTGCATGCCTATCCGCGGACGGCATCCATTGTGATCTGGTATTC
Secuenciación     GGCCGGTGTGCAGGCCGTGCATGCCTATCCGCGGACGGCATCCATTGTGATCTGGTATTC
                  *****

Esperado          ACGCGCAATCTGCGACACCGCTGCCATCCTGTCGGCAATCATCGATGCCGAGACCGTCCC
Secuenciación     ACGCGCAATCTGCGACACCGCTGCCATCCTGTCGGCAATCATCGATGCCGAGACCGTCCC
                  *****

Esperado          TCGGGCGGCGGTGCCCGGTATGCTTCGCGCTCGGCCAGTAACCGCAAGGCCGGGGTAGT
Secuenciación     TCGGGCGGCGGTGCCCGGTATGCTTCGCGCTCGGCCAGTAACCGCAAGGCCGGGGTAGT
                  *****

Esperado          GCAGAAAATCATCGACTGGAGCACGCGAACACTATCAGGAGTTCGGCGTGACGTGGCCGC
Secuenciación     GCAGAAAATCATCGACTGGAGCACGCGAACACTATCAGGAGTTCGGCGTGACGTGGCCGC
                  *****

Esperado          GCAGCCATCGGGGAGACGAGCGATGCCCTGCTGCGACGGCGAGGACAACGAGGACCGCGA
Secuenciación     GCAGCCATCGGGGAGACGAGCGATGCCCTGCTGCGACGGCGAGGACAACGAGGACCGCGA
                  *****

Esperado          GCCGGAGCAGCTCTGGCAAAGTCGCCAAACTGCGGCGAGCCGCATTCTCCGGAGTGTGCT
Secuenciación     GCCGGAGCAGCTCTGGCAAAGTCGCCAAACTGCGGCGAGCCGCATTCTCCGGAGTGTGCT
                  *****

Esperado          GACCGCGTCGCTAGTTGCCGCATGGGCTTATCCGCTGTGGCCGGTCGTACTGGGACTGAA
Secuenciación     GACCGCGTCGCTAGTTGCCGCATGGGCTTATCCGCTGTGGCCGGTCGTACTGGGACTGAA
                  *****

```

```

Esperado      GGGCCCTGCGCTGGCGGTTGGGGCCTCGACATTCGTGCCCTCCAGCCTCAAACGACTGGC
Secuenciación GGGCCCTGCGCTGGCGGTTGGGGCCTCGACATTCGTGCCCTCCAGCCTCAAACGACTGGC
*****

Esperado      CGAAGGCCGCGTCGGCGTAGGCACCCCTGATGACCATCGCCGCGCTGGGCGCTGTCGCACT
Secuenciación CGAAGGCCGCGTCGGCGTAGGCACCCCTGATGACCATCGCCGCGCTGGGCGCTGTCGCACT
*****

Esperado      TGGCGAGCTGGGTGAGGCCGCTACGCTGGCGTTTCTGTTCTCGATCAGCGAAGGCTTGGGA
Secuenciación TGGCGAGCTGGGTGAGGCCGCTACGCTGGCGTTTCTGTTCTCGATCAGCGAAGGCTTGGGA
*****

Esperado      GGAATACGCGACGGCGCGCACTCGCCGTGGCCTGCGCGCCCTGCTGTGCTGGTGCCGGA
Secuenciación GGAATACGCGACGGCGCGCACTCGCCGTGGCCTGCGCGCCCTGCTGTGCTGGTGCCGGA
*****

Esperado      TCAGGCCACAGTTCGTGGGAGGGCACCGAAACCATCGTGGCCTCAACCGAATTGCACGT
Secuenciación TCAGGCCACAGTTCGTGGGAGGGCACCGAAACCATCGTGGCCTCAACCGAATTGCACGT
*****

Esperado      CGGTGACCAGATGATCGTTAAACCGGGCGAACGCTGGCCACCGACGGCATCATTGTCGC
Secuenciación CGGTGACCAGATGATCGTTAAACCGGGCGAACGCTGGCCACCGACGGCATCATTGTCGC
*****

Esperado      CGGGCGCACCGCCCTGGATGTCTCCGCGATCACCGGCGAATCGGTGCCGGTTCGAGGTTGG
Secuenciación CGGGCGCACCGCCCTGGATGTCTCCGCGATCACCGGCGAATCGGTGCCGGTTCGAGGTTGG
*****

Esperado      ACCCGGTGACGAAAGTGTTGCG-CGGGTCGATCAACGGCTTGGGCG--TGCTGCAGGTGGG
Secuenciación ACCCGGTGACGAAAGTGTTGCGCCCGGGTCGATCAACGGCTTGGGACTGTGCTGCATGGTGG
*****

Esperado      GGTACCCGCTACCGCGCCAACAACCTCGCTGGCGCGCATCGTGCACATCGTGGAGGCCGA
Secuenciación GGGGGC-----
**      *
    
```

**Figura A-5. Secuenciación de pML06 con cebador reverso.** Alineamiento del resultado de secuenciación de pML06 y la secuencia esperada. El resultado superior corresponde a la secuencia de pML06 y el inferior es el resultado de la secuenciación usando el primer pBAD Comp Down.

```

CLUSTAL O(1.2.3) multiple sequence alignment

Esperado          GCTGGAGACCGTTTAAACTCAATGATGATGATGATGGTTCGACGGCGCTATTCAGATC
Secuenciación     -----GGCTGGGTGGGGGCGGGAAAGAGAGGTGAGGCGCTATTCGATC
                  * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * * *

Esperado          CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCCC CGGGATAGTCCGATCAGGTGT
Secuenciación     CTCTTCTGAGATGAGTTTTTGTTCGGGCCCAAGCTTCCC CGGGATAGTCCGATCAGGTGT
                  *****

Esperado          CTTGGGTGGCCCGGCAAGTGGTTTGATGCGTCCGGCCCGCACGCCGTTGGCGATGACGAT
Secuenciación     CTTGGGTGGCCCGGCAAGTGGTTTGATGCGTCCGGCCCGCACGCCGTTGGCGATGACGAT
                  *****

Esperado          GACCTCGGTGAACTCGTGCACAAAGCAGCACCGCGGCCAGTCCGAGGATCCCGAACAAACGC
Secuenciación     GACCTCGGTGAACTCGTGCACAAAGCAGCACCGCGGCCAGTCCGAGGATCCCGAACAAACGC
                  *****

Esperado          CAGCGGCATCAGCACGGTGATGATACTTAGGGACAATCCGACGTTTTGCACCATGATCTG
Secuenciación     CAGCGGCATCAGCACGGTGATGATACTTAGGGACAATCCGACGTTTTGCACCATGATCTG
                  *****

Esperado          CCGCGAGCGCCGGGCATGGTCTAGGGCTTGGGGCAGATGCCGCAAGTCTTGGCCCATCAG
Secuenciación     CCGCGAGCGCCGGGCATGGTCTAGGGCTTGGGGCAGATGCCGCAAGTCTTGGCCCATCAG
                  *****

Esperado          GGCGACGTCGGCGGTTTCGATGGCGACGTCGGTCCCATGGCGCCCATCGCGATTCCAG
Secuenciación     GGCGACGTCGGCGGTTTCGATGGCGACGTCGGTCCCATGGCGCCCATCGCGATTCCAG
                  *****

Esperado          GTCGGCGGCGGCCAGGGCCGGAGCGTCGTGACTCCGTCGCGACCATCGCGGTGGGTTG
Secuenciación     GTCGGCGGCGGCCAGGGCCGGAGCGTCGTGACTCCGTCGCGACCATCGCGGTGGGTTG
                  *****

Esperado          CCGAGCCCGCAGCTGTGCGACCAGATGAGCCTTGTCCTCGGGCCGCAATTGGCATGTAC
Secuenciación     CCGAGCCCGCAGCTGTGCGACCAGATGAGCCTTGTCCTCGGGCCGCAATTGGCATGTAC
                  *****

Esperado          CTGCTCGATGCCGGCTTGGGCTGCCAGGGCGGCAGCGGTGGCATGGTTGTGCGCGGTGAG
Secuenciación     CTGCTCGATGCCGGCTTGGGCTGCCAGGGCGGCAGCGGTGGCATGGTTGTGCGCGGTGAG
                  *****

Esperado          CATCGTCACTGGTAGCCGCGGGTGGCGAGCCGGCCACCACCTCGGCGGCTTCGGGGCG
Secuenciación     CATCGTCACTGGTAGCCGCGGGTGGCGAGCCGGCCACCACCTCGGCGGCTTCGGGGCG
                  *****

Esperado          TAGTTCGTGCGCACGGCGATGGCACCAAGCAGCTGCTGGTTCGCGTTCGACGAGAACCAGC
Secuenciación     TAGTTCGTGCGCACGGCGATGGCACCAAGCAGCTGCTGGTTCGCGTTCGACGAGAACCAGC
                  *****

Esperado          TGTGGCGCCGGCTTGTGTCATGCACGCCACATGATCTGCGAGCTCGGCGGCATCGAGCCA
Secuenciación     TGTGGCGCCGGCTTGTGTCATGCACGCCACATGATCTGCGAGCTCGGCGGCATCGAGCCA
                  *****

Esperado          GCCGGGTGCGCCCAGTCGCACCACCCGCCCGTTCGAGGCGGCCTATCAGCCCGCGCCCGG
Secuenciación     GCCGGGTGCGCCCAGTCGCACCACCCGCCCGTTCGAGGCGGCCTATCAGCCCGCGCCCGG
                  *****

Esperado          GACGGCTTGACAGTCGCTGGCGGCGGTCGTCGCTGGGTGCGGGCAAGCACGGCCACAGC
Secuenciación     GACGGCTTGACAGTCGCTGGCGGCGGTCGTCGCTGGGTGCGGGCAAGCACGGCCACAGC
                  *****

```

## Referencias

1. Comas I, Gagneux S. The past and future of tuberculosis research. *PLoS Pathog.* 2009;5(10):1–7.
2. World Health Organization. Global tuberculosis report. 2016.
3. Donoghue HD. Human tuberculosis - an ancient disease, as elucidated by ancient microbial biomolecules. *Microbes Infect.* 2009;11:1156–62.
4. Barry CE, Boshoff HI, Dartois V, Dick T, Ehrt S, Flynn J, et al. The spectrum of latent tuberculosis: rethinking the biology and intervention strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2009;7:845–55.
5. Ahmad S, Mokaddas E. Current status and future trends in the diagnosis and treatment of drug-susceptible and multidrug-resistant tuberculosis. *J Infect Public Health. King Saud Bin Abdulaziz University for Health Sciences;* 2014;7(2):75–91.
6. Instituto Nacional de Salud. Boletín Epidemiológico Semanal- Semana epidemiológica N°24. 2017.
7. Chaisson RE, Harrington M. How research can help control tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2009;13(5):558–68.
8. Handzel ZT. The Immune Response to *Mycobacterium tuberculosis* Infection in Humans. In: *Tuberculosis - Current Issues in Diagnosis and Management dendritic.* 2013. p. 19–29.
9. Coll P. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(8):474–80.
10. Novoa-Aponte L, Soto Ospina CY. *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPases: Possible Targets for Drug or Vaccine Development. *Biomed Res Int.* 2014;2014:1–9.
11. Wagner D, Maser J, Lai B, Cai ZH, Barry CE, Bentrup KHZ, 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):1491–500.
12. Wagner D, Maser J, Moric I, Boechat N, Vogt S, Gicquel B, et al. Changes of the phagosomal elemental concentrations by *Mycobacterium tuberculosis* Mramp. *Microbiology.* 2005;151(1):323–32.
13. Cook GM, Berney M, Gebhard S, Heinemann M, Cox RA, Danilchanka O, et al. Physiology of *Mycobacteria*. In: *Advances in Microbial Physiology.* 2009. p. 1–76.
14. Nies DH. Efflux-mediated heavy metal resistance in prokaryotes. *FEMS Microbiol Rev.* 2003;27:313–39.
15. Palmgren MG, Nissen P. P-type ATPases. *Annu Rev Biophys.* 2011;40:243–66.
16. Novoa-Aponte L, León-Torres A, Patiño-Ruiz M, Cuesta-Bernal J, Salazar LM, Landsman D, 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(25):1–12.

17. León-Torres A, Novoa-Aponte L, Soto C-Y. CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals*. 2015;28:713–24.
18. Novoa Aponte L. Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado. Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá; 2016.
19. Ayala-Torres C, Novoa-Aponte L, Soto CY. Pma1 is an alkali/alkaline earth metal cation ATPase that preferentially transports Na(+) and K(+) across the *Mycobacterium smegmatis* plasma membrane. *Microbiol Res*. 2015;176:1–6.
20. León-Torres A. Respuesta de las ATPasas tipo P 1B a las condiciones de estrés en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Doctorado en curso. Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá; 2017.
21. Botella H, Peyron P, Levillain F, Poincloux R, Poquet Y, Brandli I, et al. Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe*. 2011;10(3):248–59.
22. Ward SK, Abomoelak B, Hoye EA, Steinberg H, Talaat AM. CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2010;77(5):1096–110.
23. Cavet JS, Graham AI, Meng W, Robinson NJ. A Cadmium-Lead-sensing ArsR-SmtB Repressor with Novel Sensory Sites. 2003;278(45):44560–6.
24. Chauhan S, Kumar A, Singhal A, Tyagi JS, Prasad HK. CmtR, a cadmium-sensing ArsR-SmtB repressor, cooperatively interacts with multiple operator sites to autorepress its transcription in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEBS J*. 2009;276:3428–39.
25. Zumla A, Nahid P, Cole ST. Advances in the development of new tuberculosis drugs and treatment regimens. *Nat Rev Drug Discov*. 2013;12:388–404.
26. Daffé M, Etienne G. The capsule of *Mycobacterium tuberculosis* and its implications for pathogenicity. *Tuber lung Dis*. 1999;79(3):153–69.
27. Brennan PJ, Nikaido H. The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem*. 1995;64:29–63.
28. Bansal-Mutalik R, Nikaido H. Mycobacterial outer membrane is a lipid bilayer and the inner membrane is unusually rich in diacyl phosphatidylinositol dimannosides. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(13):4958–63.
29. Koul a, Arnoult E, Lounis N, Guillemont J, Andries K. The challenge of new drug discovery for tuberculosis. *Nature*. 2011;469:483–90.
30. Ahmad S. Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin Dev Immunol*. 2011;2011:1–17.
31. Oharan N. Current status of tuberculosis and recombinant bacillus Calmette-Gu??rin vaccines. *J Oral Biosci*. 2012;54:92–5.
32. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of *Mycobacterium Tuberculosis* Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 2013;5(1):1–11.

33. Sakamoto K. The Pathology of *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Vet Pathol.* 2012;49(3):423–39.
34. Wani R. Tuberculosis 2: Pathophysiology and microbiology of pulmonary tuberculosis. *South Sudan Med J.* 2013;6(1):10–2.
35. Gorocica P, Jiménez-Martínez MDC, Garfias Y, Sada I, Lascurain R. Componentes glicosilados de la envoltura de *Mycobacterium tuberculosis* que intervienen en la patogénesis de la tuberculosis. *Rev del Inst Nac Enfermedades Respir México.* 2005;18(2):142–53.
36. Madigan M, Martinko J, Parker J. Brock Biología de los microorganismos. 8th ed. Iberia PH, editor. International Microbiology. Madrid; 1997. 1064 p.
37. Eisenstadt J, Hall GS. Microbiology and classification of mycobacteria. *Clin Dermatol.* 1995;13(3):197–206.
38. Bernardelli A. Manual de Procedimientos: Clasificación fenotípica de las micobacterias. Comunicaciones C de P y, editor. Buenos Aires; 2007. 1-63 p.
39. Pesciaroli M, Alvarez J, Boniotti MB, Cagiola M, Di Marco V, Marianelli C, et al. Tuberculosis in domestic animal species. *Res Vet Sci.* 2014;97:S78–85.
40. Herrera-León L, Pozuelo-Díaz R, Molina Moreno T, Valverde Cobacho A, Saiz Vega P, Jiménez Pajares MS. Aplicación de métodos moleculares para la identificación de las especies del complejo *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin.* 2009;27(9):496–502.
41. Jia X, Yang L, Dong M, Chen S, Lv L, Cao D, et al. The Bioinformatics Analysis of Comparative Genomics of *Mycobacterium tuberculosis* Complex (MTBC) Provides Insight into Dissimilarities between Intraspecific Groups Differing in Host Association, Virulence, and Epitope Diversity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017;7(88):1–14.
42. Tortoli E. Phylogeny of the genus *Mycobacterium*: Many doubts, few certainties. *Infect Genet Evol.* 2012;12:827–31.
43. Hacker J, Dobrindt U. Pathogenomics. KGaA. W-VVG& C, editor. Weinheim; 2006. 1-568 p.
44. Faksri K, Xia E, Tan JH, Teo Y-Y, Ong RT-H. In silico region of difference (RD) analysis of *Mycobacterium tuberculosis* complex from sequence reads using RD-Analyzer. *BMC Genomics.* 2016;17(1):847.
45. Martín C. Desarmando El bacilo de la tuberculosis''. Universidad de Zaragoza, editor. Zaragoza; 2006. 5-25 p.
46. Puerto G, Castro CM, Ribón W. Reacción en cadena de la polimerasa: una contribución para el diagnóstico de la tuberculosis extrapulmonar y de las micobacteriosis. *Asoc Colomb Infectología.* 2007;11(2):97–100.
47. Palomino JC, Cardoso S, Ritacco V. Tuberculosis 2007-From basic science to patient care. 1°. Palomino JC, Cardoso Leão S, Ritacco V, editors. 2007. 1-686 p.
48. Sarathy JP, Dartois V, Lee EJD. The role of transport mechanisms in *Mycobacterium*

- Tuberculosis drug resistance and tolerance. *Pharmaceuticals*. 2012;5:1210–35.
49. Berg S, Kaur D, Jackson M, Brennan PJ. The glycosyltransferases of *Mycobacterium tuberculosis* - roles in the synthesis of arabinogalactan, lipoarabinomannan, and other glycoconjugates. *Glycobiology*. 2007;17(6):35R–56R.
  50. Rowland JL, Niederweis M. Resistance mechanisms of *Mycobacterium tuberculosis* against phagosomal copper overload. *Tuberculosis*. 2012;92(3):202–10.
  51. Chatterjee D. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Biopolymers*. 1997;1:579–88.
  52. Guerin ME, Korduláková J, Alzari PM, Brennan PJ, Jackson M. Molecular Basis of Phosphatidyl-myo-inositol Mannoside Biosynthesis and Regulation in Mycobacteria. *J Biol Chem*. 2010;285(44):33577–83.
  53. Brennan PJ. Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2003;83:91–7.
  54. Tam PH, Lowary TL. Recent advances in mycobacterial cell wall glycan biosynthesis. *Biopolymers*. 2009;13:618–25.
  55. Rodriguez-Rivera FP, Zhou X, Theriot JA, Bertozzi CR. Visualization of mycobacterial membrane dynamics in live cells. *J Am Chem Soc*. 2017;139:3488–95.
  56. Whitfield C. Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in *Escherichia coli*. *Annu Rev Biochem*. 2006;75:39–68.
  57. Van Der Woude AD, Luirink J, Bitter W. Getting across the cell envelope: Mycobacterial protein secretion. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2013;374:109–34.
  58. Buchmeier N, Blanc-Potard A, Ehrt S, Piddington D, Riley L, Groisman EA. A parallel intraphagosomal survival strategy shared by *Mycobacterium tuberculosis* and *Salmonella enterica*. *Mol Microbiol*. 2000;35(6):1375–82.
  59. Ernst JD. The immunological life cycle of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:581–91.
  60. Nunes-alves C, Booty MG, Carpenter SM, Jayaraman P, Rothchild AC, Behar SM. In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat Publ Gr*. 2014;12(4):289–99.
  61. Ramakrishnan L. Revisiting the role of the granuloma in tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2012;12:352–66.
  62. Walzl G, Ronacher K, Hanekom W, Scriba TJ, Zumla A. Immunological biomarkers of tuberculosis. *Nat Rev Immunol*. 2011;11(5):343–54.
  63. Microbiol C, Novoa-aponte PAPL. The DosR Dormancy Regulator of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulates the Na<sup>+</sup> / K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ATPase Activities in Plasma Membrane Vesicles of Mycobacteria. 2014;
  64. Pai M, Behr MA, Dowdy D, Dheda K, Divangahi M, Boehme CC, et al. Tuberculosis. *Nat Rev Dis Prim*. 2016;2:1–23.
  65. Aínsa JA, Martín C, Gicquel B. Molecular approaches to tuberculosis. *Mol Microbiol*.

- 2001;42(2):561–70.
66. O’Garra A, Redford PS, McNab FW, Bloom CI, Wilkinson RJ, Berry MPR. The immune response in tuberculosis. *Annu Rev Immunol*. 2013;31(1):475–527.
  67. Russell DG, Cardona P-J, Kim M-J, Allain S, Altare F. Foamy macrophages and the progression of the human tuberculosis granuloma. *Nat Immunol*. 2009;10(9):943–8.
  68. Armas Pérez L, González Ochoa E, Hevia Estrada G, Peláez Castro E. Elementos del diagnóstico clínico y el tratamiento de la tuberculosis. *Rev Cuba Med Gener Integr*. 1996;12(1):59–68.
  69. Stewart GR, Patel J, Robertson BD, Rae A, Young DB. Mycobacterial Mutants with Defective Control of Phagosomal Acidification. *PLoS Pathog*. 2005;1(3):269–78.
  70. Soldati T, Neyrolles O. Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment : Take It With a Pinch of Salt ( s )! *Traffic*. 2012;13:1042–52.
  71. Behar SM, Divangahi M, Remold HG. Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat Rev Microbiol*. 2010;8(9):668–74.
  72. Kindt TJ, Goldsby RA, Osborne BA. *Inmunología de Kuby*. 6th ed. Mc Graw Hill, editor. México, D.F; 2007. 1-574 p.
  73. Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. *Harper’s Illustrated Biochemistry*. 26th ed. McGraw-Hill Medical; 2003. 611 p.
  74. Agranoff D, Krishna S. Metal ion transport and regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Front Biosci*. 2004;9:2996–3006.
  75. Institut Pasteur. Tuberculosis 2012: biology, pathogenesis and intervention strategies; an update from the city of light. *Res Microbiol*. 2012;164:270–80.
  76. Ward SK, Hoyer EA, Talaat AM. The global responses of *Mycobacterium tuberculosis* to physiological levels of copper. *J Bacteriol*. 2008;190(8):2939–46.
  77. Argüello JM, Raimunda D, Padilla-Benavides T. Mechanisms of copper homeostasis in bacteria. *Front Cell Infect Microbiol*. 2013;3(73):1–14.
  78. Niederweis M, Wolschendorf F, Mitra A, Neyrolles O, Toulouse D. Mycobacteria, Metals, and the Macrophage. *Immunol Rev*. 2015;264(1):249–63.
  79. Grasseschi RM, Ramaswamy RB, Levine DJ KC& WL (2003). Cadmium accumulation and detoxification by alveolar macrophages of cigarette smokers. *Chest*. 2003;124(5):1924–8.
  80. Hett EC, Rubin EJ. Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2008;72(1):126–56.
  81. Youm J, Saier MH. Comparative analyses of transport proteins encoded within the genomes of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium leprae*. *Biochim Biophys Acta - Biomembr*. 2012;1818(3):776–97.
  82. Mawuenyega KG, Forst C V., Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* Functional Network Analysis by Global Subcellular Protein

- Profiling. *Mol Biol Cell*. 2005;16(1):396–404.
83. Yatime L, Buch-Pedersen MJ, Musgaard M, Morth JP, Winther AML, Pedersen BP, et al. P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochim Biophys Acta - Bioenerg*. 2009;1787(4):207–20.
84. Pedersen PL. Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*. 2007;39:349–55.
85. Pedersen PL. Transport ATPases: Structure, motors, mechanism and medicine: A brief overview. *J Bioenerg Biomembr*. 2005;37(6):349–57.
86. Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser C, Krieger M SM. *Molecular cell biology*. 4th ed. *Biología celular y Molecular*. New York: W.H. Freeman and Company; 2000. 1084 p.
87. López ML, Segura Latorre C. NUEVAS VÍAS DE PERMEABILIDAD Y REGULACIÓN DEL pH INTRACELULAR COMO POSIBLES BLANCOS TERAPÉUTICOS EN *Plasmodium falciparum*. *Acta Biol Colomb*. 2008;13(2):3–22.
88. Pulido PA, Novoa-Aponte L, Villamil N, Soto CY. The DosR Dormancy Regulator of *Mycobacterium tuberculosis* Stimulates the Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> and Ca<sup>2+</sup> ATPase Activities in Plasma Membrane Vesicles of *Mycobacteria*. *Curr Microbiol*. 2014;69:604–10.
89. Kühlbrandt W. Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004;5:282–95.
90. Chène P. ATPases as drug targets: learning from their structure. *Nat Rev Drug Discov*. 2002;1(9):665–73.
91. Axelsen KB, Palmgren MG. Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J Mol Evol*. 1998;46(1):84–101.
92. Thever MD, Saier AEMH. Bioinformatic Characterization of P-Type ATPases Encoded Within the Fully Sequenced Genomes of 26 Eukaryotes. *J Membr Biol*. 2009;229:115–30.
93. Vandecaetsbeek I, Christensen SB, Liu H, Van Veldhoven PP, Waelkens E, Eggermont J, et al. Thapsigargin affinity purification of intracellular P2A-type Ca<sup>2+</sup> ATPases. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res*. 2011;1813:118–1127.
94. Ward SK, Abomoelak B, Hoyer EA, Steinberg H, Talaat AM. CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*. 2010;77(5):1096–110.
95. Busenlehner LS, Pennella MA, Giedroc DP. The SmtB / ArsR family of metalloregulatory transcriptional repressors: structural insights into prokaryotic metal resistance. *FEMS Microbiol Rev*. 2003;27:131–43.
96. Cavet JS, Meng W, Pennella MA, Appelhoff RJ, Giedroc DP, Robinson NJ. A Nickel-Cobalt-sensing ArsR-SmtB Family Repressor. *JBiolChem*. 2002;277(41):38441–8.
97. Gourdon P, Liu X-Y, Skjørringe T, Morth JP, Møller LB, Pedersen BP, et al. Crystal structure of a copper-transporting PIB-type ATPase. *Nature*. 2011;475(7354):59–64.
98. Novoa Aponte L. ANÁLISIS BIOINFORMÁTICO Y DESARROLLO DE ÚTILES

GÉNICOS PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR In vitro, DE UN POSIBLE TRANSPORTADOR DE CATIONES ALCALINOS Ó ALCALINOTÉRREOS DE LA MEMBRANA PLASMÁTICA DE *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá; 2012.

99. Swiss Institute of Bioinformatic. Tuberculist [Internet]. New website - version 2.6. 2013. Available from: <http://tuberculist.epfl.ch/>
100. Kyte J, Doolittle RF. A Simple Method for Displaying the Hydropathic Character of a Protein. *J Mol Biol.* 1982;157:105–32.
101. Dobson L, Academy H, Academy TH. CCTOP : a Consensus Constrained TOPology prediction web server. *Nucleic Acids Res.* 2015;1:1–5.
102. McWilliam H, Li W, Uludag M, Squizzato S, Park YM, Buso N, et al. Analysis Tool Web Services from the EMBL-EBI. *Nucleic Acids Res.* 2013;41(Web Server issue):W597–600.
103. Papadopoulos J, Agarwala R. COBALT: constraint-based alignment tool for multiple protein sequences. *Bioinformatics.* 2007;23(9):1073–9.
104. Allen GS, Wu C-C, Cardozo T, Stokes DL. The Architecture of CopA from *Archeaoglobus fulgidus* Studied by Cryo-Electron Microscopy and Computational Docking. *Structure.* 2011;19(9):1219–32.
105. Wang K, Sitsel O, Meloni G, Autzen HE, Andersson M, Klymchuk T, et al. Structure and mechanism of Zn<sup>2+</sup>-transporting P-type ATPases. *Nature.* 2014;514:518–22.
106. Drozdetskiy A, Cole C, Procter J, Barton GJ. JPred4: A protein secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2015;43(Web Server issue):W389–94.
107. Cole C, Barber JD, Barton GJ. The Jpred 3 secondary structure prediction server. *Nucleic Acids Res.* 2008;36(Web Server issue):W197–201.
108. Hooft RW, Sander C, Vriend G. Objectively judging the quality of a protein structure from a Ramachandran plot. *Comput Appl Biosci.* 1997;13(4):425–30.
109. Kolaskar AS, Tongaonkar PC. A semi-empirical method for prediction of antigenic determinants on protein antigens. *FEBS Lett.* 1990;276(1,2):172–4.
110. Studier FW. Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures. *Protein Expr Purif.* 2005;41:207–34.
111. ThermoFisher Scientific catalog [Internet]. 2017. Available from: <https://www.thermofisher.com>
112. Guzman LM, Belin D, Carson MJ, Beckwith J. Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose PBAD Promoter. *J Bacteriol.* 1995;177(14):4121–30.
113. Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T, Jacobs Jr WR. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 1990;4(11):1911–9.
114. Zheng H, Lu L, Wang B, Pu S, Zhang X, Zhu G, et al. Genetic basis of virulence attenuation

- revealed by comparative genomic analysis of *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Ra versus H37Rv. *PLoS One*. 2008;3(6):1–12.
115. López Ruiz M, Soto Ospina CY. Caracterización parcial del transportador iónico , CtpG , ATPasa tipo P potencialmente implicado en la desintoxicación de metales pesados en *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis de Maestría en curso. Universidad Nacional de Colombia- Sede Bogotá; 2017.
  116. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem*. 1987;162(1):156–9.
  117. Pfaffl MW. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. 2001;29(9):2002–7.
  118. Van Kessel JC, Hatfull GF. Mycobacterial recombineering. *Methods Mol Biol*. 2008;435:203–15.
  119. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1):248–54.
  120. Mandal AK, Cheung WD, Argüello JM. Characterization of a thermophilic P-type Ag<sup>+</sup>/Cu<sup>+</sup>-ATPase from the extremophile *Archaeoglobus fulgidus*. *J Biol Chem*. 2002;277(9):7201–8.
  121. Fiske CH, Subbarow Y. The colorimetric determination of phosphorus. *JBiolChem*. 1925;66(2):375–400.
  122. Cariani L, Thomas L, Brito J, Castillo JR. Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Anal Biochem*. 2004;324:79–83.
  123. Rensing C, Sun Y, Mitra B, Rosen BP, Li Z, Li C. Pb (II) -translocating P-type ATPases. *JBiolChem*. 1998;273(49):32614–7.
  124. Kelley L, Mezulis S, Yates C, Wass M, Sternberg M. The Phyre2 web portal for protein modeling, prediction and analysis. *Nat Protoc* 10. 2015;10(6):845–58.
  125. Tusnády GE, Kalmár L, Simon I. TOPDB: Topology data bank of transmembrane proteins. *Nucleic Acids Res*. 2008;36(Database issue):234–9.
  126. Dobson L, Langó T, Reményi I, Tusnády GE. Expediting topology data gathering for the TOPDB database. *Nucleic Acids Res*. 2015;43(Database issue):D283–9.
  127. Chan H, Babayan V, Blyumin E, Gandhi C, Hak K, Harake D, et al. The P-Type ATPase superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol*. 2010;19:5–104.
  128. Mattle D, Sitsel O, Autzen HE, Meloni G, Gourdon P, Nissen P. On allosteric modulation of P-type Cu<sup>+</sup>-ATPases. *J Mol Biol*. Elsevier Ltd; 2013;425(13):2299–308.
  129. Solioz M, Vulpe C. CPx-type ATPases: A class of P-type ATPases that pump heavy metals. *Trends Biochem Sci*. 1996;21(7):237–41.
  130. Argüello JM. Identification of Ion-Selectivity Determinants in Heavy-Metal Transport P1B-type ATPases. *J Membr Biol*. 2003;195(2):93–108.

131. Sitsel O, Grønberg C, Autzen HE, Wang K, Meloni G, Nissen P, et al. Structure and Function of Cu(I)- and Zn(II)-ATPases. *Biochemistry*. 2015;54(37):5673–83.
132. Okkeri J, Haltia T. The metal-binding sites of the zinc-transporting P-type ATPase of *Escherichia coli*. Lys 693 and Asp 714 in the seventh and eighth transmembrane segments of ZntA contribute to the coupling of metal binding and ATPase activity. *Biochim Biophys Acta*. 2006;1757:1485–95.
133. Argüello JM, Eren E, González-Guerrero M. The structure and function of heavy metal transport PIB-ATPases. *Biometals*. 2007;20:233–48.
134. Raimunda D, Subramanian P, Stemmler T, Argüello JM. A tetrahedral coordination of Zinc during transmembrane. *Biochim Biophys Acta*. 2012;1818(5):1374–1377.
135. Smith AT, Smith KP, Rosenzweig AC. Diversity of the metal-transporting PIB-type ATPases. *J Biol Inorg Chem*. 2014;19(6):947–60.
136. Fan B, Rosen BP. Biochemical characterization of CopA, the *Escherichia coli* Cu(I)-translocating P-type ATPase. *J Biol Chem*. 2002;277(49):46987–92.
137. Zielazinski EL, Cutsail GE, Hoffman BM, Stemmler TL, Rosenzweig AC. Characterization of a Cobalt-Specific PIB-ATPase. *Biochemistry*. 2012;51:7891–7900.
138. Zhitnitsky D, Lewinson O. Identification of functionally important conserved trans-membrane residues of bacterial PIB-type ATPases. *Mol Microbiol*. 2014;91(4):777–89.
139. González-Guerrero M, Eren E, Rawat S, Stemmler TL, Argüello JM. Structure of the two transmembrane Cu<sup>+</sup> transport sites of the Cu<sup>+</sup>-ATPases. *J Biol Chem*. 2008;283(44):29753–9.
140. Pearson RG. Hard and Soft Acids and Bases. *J Am Chem Soc*. 1963;83(22):3533–3339.
141. Lemire J a, Harrison JJ, Turner RJ. Antimicrobial activity of metals: mechanisms, molecular targets and applications. *Nat Rev Microbiol*. 2013;11(6):371–84.
142. Kühlbrandt W, Zeelen J, Dietrich J, Kent UM, Metzger H, Ravetch J V, et al. Structure, mechanism, and regulation of the *Neurospora* plasma membrane H<sup>+</sup>-ATPase. *Science* (80- ). 2002;297:1692–6.
143. Benkert P, Biasini M, Schwede T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. *Bioinformatics*. 2011;27(3):343–50.
144. Gordon E, Horsefield R, Swarts HGP, de Pont JJHHM, Neutze R, Snijder A. Effective high-throughput overproduction of membrane proteins in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif*. 2008;62(1):1–8.
145. Rawlings AE. Membrane proteins: always an insoluble problem? *Biochem Soc Trans*. 2016;44(3):790–5.
146. Singh SM, Panda AK. Solubilization and Refolding of Bacterial Inclusion Body Proteins. *J Biosci Bioeng*. 2005;99(4):303–10.
147. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol*. 2005;115(2):113–28.

148. Schleif R. AraC protein, regulation of the l-arabinose operon in *Escherichia coli*, and the light switch mechanism of AraC action. *FEMS Microbiol Rev.* 2010;34(5):779–96.
149. Schleif R. Regulation of the L-arabinose operon of *Escherichia coli*. *Trends Genet.* 2000;16(12):559–65.
150. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol.* 2014;5(APR):1–17.
151. Chen Y, Song J, Sui S., Wang D-N. DnaK and DnaJ facilitated the folding process and reduced inclusion body formation of magnesium transporter CorA overexpressed in *Escherichia coli*. *Protein Expr Purif.* 2003;32:221–231.
152. Johansson F, Olbe M, Sommarin M, Larsson C. Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* 1995;7 (1):165–73.
153. Santos P, Gordillo A, Osses L, Salazar LM, Soto CY. Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides.* 2012;36(1):121–8.
154. Santos Ruiz PA. Sistema de Transporte ATPasa en vesículas de membranas de *Mycobacterium tuberculosis* involucrado en la regulación de la concentración de protones: Posible blanco terapéutico de la acción de péptidos antimicrobianos. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia-Sede Bogotá; 2010.
155. Padilla-benavides T, Long JE, Raimunda D, Sasseti CM. A Novel P 1B -type Mn <sup>2+</sup> -transporting ATPase Is Required for Secreted Protein Metallation in *Mycobacteria* \*. 2013;288(16):11334–47.
156. Raimunda D, Long JE, Sasseti CM, Argüello JM. Role in metal homeostasis of CtpD, a Co<sup>2+</sup> transporting P1B4 - ATPase of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol.* 2012;84(6):1139–49.
157. Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob Chemother.* 2001;48:5–16.
158. Lewinson O, Lee AT, Rees DC. A P-type ATPase importer that discriminates between essential and toxic transition metals. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(12):4677–82.
159. Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* 1998;393:537–44.
160. de Mendonça-Lima L, Picardeau M, Raynaud C, Rauzier J, Goguet de la Salmonière YO, Barker L, et al. Erp, an extracellular protein family specific to mycobacteria. *Microbiology.* 2001;147(8):2315–20.
161. Cambier C., Falkow S, Ramakrishnan L. Host Evasion and Exploitation Schemes of *Mycobacterium tuberculosis*. *Cell.* 2014;159(7):1497–509.
162. Abramovitch RB, Rohde KH, Hsu F-F, Russell DG. A *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific locus that modulates pH-driven adaptation to the macrophage phagosome. *Mol Microbiol.* 2011;3(80):678–94.

163. Mana-Capelli S, Mandal AK, Argüello JM. Archaeoglobus fulgidus CopB is a thermophilic Cu<sup>2+</sup>-ATPase: Functional role of its histidine-rich N-terminal metal binding domain. *J Biol Chem.* 2003;278(42):40534–41.
164. Capelli SM. CopB from Archaeoglobus fulgidus: a thermophilic Cu<sup>2+</sup> transporting CPx-ATPase. Tesis de Maestría. WORCESTER POLYTECHNIC INSTITUTE; 2002.
165. Nelson DL, Cox MM. Lehninger: Principios de bioquímica. 3rd ed. New York: W.H. Freeman and Company; 2002.
166. Atkins GL, Nimmo IA. A comparison of seven methods for fitting the Michaelis-Menten equation. *Biochem J.* 1975;149(3):775–7.
167. Sharma R, Rensing C, Rosen P, Mitra B, Rosen BP. The ATP Hydrolytic Activity of Purified ZntA, a Pb (II)/ Cd (II)/ Zn (II) -translocating ATPase from Escherichia coli. *JBiolChem.* 2000;275(6):3873–8.
168. Solioz M, Odermatt A. Copper and silver transport by CopB-ATPase in membrane vesicles of Enterococcus hirae. Vol. 270, *Journal of Biological Chemistry.* 1995. p. 9217–21.
169. Soria-Guerra RE, Nieto-Gomez R, Govea-Alonso DO, Rosales-Mendoza S. An overview of bioinformatics tools for epitope prediction: Implications on vaccine development. *J Biomed Inform.* 2015;53:405–14.
170. Pfeiffer MS, Padrón G. GENÓMICA FUNCIONAL Fundamentos y Aplicaciones. USM, editor. Valparaíso; 2013. 205 p.
171. Bethke J, Rojas V, Berendsen J, Cárdenas C, Guzmán F, Gallardo JA, et al. Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *J Fish Dis.* 2012;35(5):379–88.
172. Biology M in M. Peptide Synthesis and Applications. 2nd ed. Jensen KJ, Tofteng Shelton P, Pedersen SL, editors. New York: Humana Press; 2013. 253 p.
173. Katzen F, Chang G, Kudlicki W. The past, present and future of cell-free protein synthesis. *Trends Biotechnol.* 2005;23(3):150–6.
174. Merrifield R. Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J Am Chem Soc.* 1963;85:2149–54.
175. Merrifield R. Solid phase synthesis. *Science (80- ).* 1986;232:341–347.
176. Albericio F. Orthogonal protecting groups for N alpha-amino and C-terminal carboxyl functions in solid-phase peptide synthesis. *Biopolymers.* 2000;55(2):123–39.
177. Kimmerlin T, Seebach D. “100 Years of Peptide Synthesis”: Ligation Methods for Peptide and Protein Synthesis With Applications To Beta-Peptide Assemblies. *J Pept Res.* 2005;65(2):229–60.
178. Leenaars PPAM, Hendriksen CFM, De Leeuw WA, Carat F, Delahaut P, Fischer R, et al. The production of polyclonal antibodies in laboratory animals. *ATLA Altern to Lab Anim.* 1999;17:79–102.
179. Kelly SM, Jess TJ, Price NC. How to study proteins by circular dichroism. *Biochim Biophys*

Acta - Proteins Proteomics. 2005;1751(2):119–39.

180. Swindells MB, MacArthur MW, Thornton JM. Intrinsic  $\phi/\psi$  propensities of amino acids, derived from the coil regions of known structures. *Nat Struct Biol.* 1995;2(7):596–603.
181. Kabsch W, Sander C. Dictionary of protein secondary structure: Pattern recognition of hydrogen bonded and geometrical features. *Biopolymers.* 1983;22:2577–637.
182. Chou P., Fasman G. Predictions of the secondary structure of proteins from their amino acid sequence. In: *Adv Enzmol.* 1978. p. 45–148.