UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

DESARROLLO DE ÚTILES GÉNICOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN DOBLE MUTANTE DE *Mycobacterium tuberculosis* DEFECTIVO EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA MMPL7 Y ATPasas TIPO P"

Vanessa Vásquez Godoy

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Grupo "Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias"

Bogotá, Colombia

2021

DESARROLLO DE ÚTILES GÉNICOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN DOBLE MUTANTE DE *Mycobacterium tuberculosis* DEFECTIVO EN PROTEÍNAS DE MEMBRANA MMPL7 Y ATPasas TIPO P.

Vanessa Vásquez Godoy
Licenciada en Química, Universidad Distrital Francisco José de Caldas

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:
Máster 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
Grupo “Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias”
Bogotá, Colombia
2021

A mis papitos,

Por su amor incondicional, apoyo y dedicación.

Agradecimientos

A la vida, por darme la oportunidad de nacer en una familia tan amorosa que me ha apoyado en cada paso que he dado, a mi mamita, Blanca Godoy, por ser para mí el mejor ejemplo a seguir, su tenacidad, su incondicionalidad y por su amor infinito, a mi papito Juan Vásquez por brindarme todas las comodidades que me han permitido llevar a cabo esta maestría, por ser apoyo en todo momento, a mi hermana Heidy, por sus consejos, por ser mi confidente y mi mejor amiga y finalmente a Mauricio, por ser en estos últimos meses quien ha estado conmigo, brindándome su ayuda y apoyo.

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme los espacios para tener la mejor formación académica y personal. Su campus fue para mí un segundo hogar, fue mi refugio durante 4 años, que me albergo y siempre me cuido.

A la DIB - Dirección de Investigación Sede Bogotá por la financiación de la investigación a través del proyecto titulado “"Implicación de CtpH, una ATPasa tipo P, en el transporte de metales alcalino/ alcalinotérreos a través de la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis”.* También por sus múltiples apoyos para la asistencia a eventos científicos

Al Departamento de Química y a sus profesores por la formación que como mujer científica me dieron y por el acompañamiento constante que como estudiante siempre me brindo.

Al profesor Carlos Yesid Soto Ospina por su confianza, su apoyo y sus enseñanzas durante el desarrollo de la investigación. Por el acompañamiento y la constancia que ha tenido desde el primer día que ingrese al grupo de investigación, siendo para mí un apoyo fundamental.

Al Grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias por el entrenamiento y formación, por todos los momentos compartidos con sus integrantes, en especial le agradezco a Milena Maya, por ser mi tutora, mi guía, por acogerme y enseñarme, todo lo que pude aprender en el ámbito experimental se lo debo a ella, también a Marcela, porque sin su ayuda y guía en la última fase de desarrollo de mi tesis, no hubiera podido llegar a buen término. También agradezc o a las Profesoras Luz Mary Salazar y Martha Nancy Calderón por su apoyo académico y personal. A mis compañeros y amigos del grupo, Carolina, Tere, Alver, Danna, Edgar, Sandra, Henry, Paola y por supuesto Milena y Marcela.

A la FIDIC, por permitirme hacer los ensayos necesarios para el desarrollo de mi tesis en sus instalaciones, le agradezco de forma especial a la profesora Marisol Ocampo, por permitirme el ingreso a su laboratorio.

Al laboratorio de Microbiología Ambiental de la Universidad Nacional de Colombia por la colaboración brindada.

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

Resumen

La tuberculosis (TB) es la novena causa de muerte a nivel mundial, y la primera producida por un agente infeccioso de origen bacteriano. Según datos de la Organización Mundial de la Salud (OMS), las muertes por TB ascendieron a 1,7 millones en 2020, de las cuales 374.000 eran pacientes portadores del virus de inmunodeficiencia humana (VIH).

La morfofisiología del *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) dificulta su control patógeno bacteriano. *Mtb* se caracteriza por tener una pared celular compleja de naturaleza altamente hidrofóbica, parcialmente relacionada con su capacidad de evadir la unión fagosoma-lisosoma, y de entrar en un estado latente.

La identificación de dianas potenciales de atenuación del bacilo tuberculoso es fundamental para el desarrollo nuevas vacunas anti-TB. En este sentido, las proteínas de membrana han despertado un interés reciente como biomarcadores de atenuación y para el diseño de compuestos anti-TB. Las ATPasas son proteinas de membrana que están presentes en todos los reinos de la naturaleza e intervienen en variedad de procesos biológicos como la proliferación y viabilidad celular, procesos de desintoxicación de metales, transformación de energía metabólica entre otras. Específicamente las ATPasas tipo P de *Mtb* son enzimas claves que intervienen en la homeostasis iónica del bacilo tuberculoso y su atenuación estaría involucrada en su supervivencia en el ambiente intrafagosomal.

Por otra parte, las micobacterias contienen en su envoltura una capa externa o micomembrana compuesta, entre otros, por lípidos extraíbles reconocidos como factores de virulencia, tal como sulfolipido-I (SL-I) y dimicoserosato de fenoltiocerol

(PDIM). Este último glicolípido es transportado desde el interior de la célula a la micomembrana, por el Transportador *mmpL7* que también está involucrado en su biosíntesis. Por lo tanto, mutaciones en el gen *mmpL7* afectarían la virulencia del bacilo tuberculoso.

En el presente trabajo se desarrollaron útiles génicos para la construcción de un doble mutante de *Mtb* en: 1) una ATPasa tipo P, y 2) el transportador MmpL7 involucrado en la biosíntesis de PDIM. Se partió de cepas de *Mtb* previamente mutadas en los genes que codifican las ATPasas CtpF y CtpH (ΔCtpF y ΔCtpH), encargadas de la detoxificación frente altas concentraciones de los iones Ca^{2+} y Na^{+}/K^{+} respectivamente, que son activamente expresadas durante el proceso de infección.

Para lograr tal objetivo fue necesario eliminar la resistencia antibiótica introducida en la construcción de los mutantes (ΔCtpF y ΔCtpH) previamente obtenidos mediante recombinería. Por otro lado, se realizaron los constructos necesarios para remover también mediante recombinación el gen *mmpL7* en las cepas mutantes. El objetivo final ha sido obtener intermediarios en la construcción de cepas de *Mtb* doblemente mutadas y atenuadas, desprovistas de marcas de resistencia antibiótica, para poder ser consideradas posteriormente en estudios de atenuación en modelo animal.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, potencial vacunal, atenuación, MMPL7, ATPasa tipo P.

Abstract

DEVELOPMENT OF GENE TOOLS FOR THE OBTENTION OF A DOUBLE *Mycobacterium tuberculosis* MUTANT DEFECTIVE IN MEMBRANE PROTEINS MMPL7 AND ATPASE TYPE P".

Tuberculosis (TB) is the ninth leading cause of death worldwide, and the first caused by a bacterial origin. According to data from the World Health Organization (WHO) in 2020 it was registered 1.7 million deaths from TB of which 374,000 were patients coinfected with the human immunodeficiency virus (HIV).

The morphophysiology of *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) is one of the difficulties to overcome for the control of the tubercle bacillus. *Mtb* is characterized by a complex cell wall of a highly hydrophobic nature, partially related to its ability to evade phagosome-lysosome binding, and its ability to enter a dormant state.

The identification of potential tubercle bacillus attenuation targets is fundamental for the development of new anti-TB vaccines. In this regard, membrane proteins have been marked as potential biomarkers of attenuation and for the design of anti-TB compounds. ATPases are enzymes that are present in all kingdoms of nature and are involved in a variety of biological processes such as cell proliferation and viability, metal detoxification processes, metabolic energy transformation, among others. Specifically, the P-type ATPases of *Mtb* are key proteins involved in the ionic homeostasis of the tubercle bacillus and their attenuation would be involved in their survival in the intraphagosomal environment.

Moreover, mycobacteria contain in their envelope an outer layer or 'mycomembrane' composed of extractable lipids composed among others by recognized virulence factors such as sulfolipid-I and phenolthiocerol dimicoserosate (PDIM), transported from inside the cell to the mycomembrane by the *mmpL7* gene, likewise, this gene is also involved in its biosynthesis. Therefore, mutations in *mmpL7* would affect the virulence of the tubercle bacillus.

In the present work, genetic tools were developed for the construction of a double mutant of *Mtb* in: 1) a P-type ATPase, and 2) the MmpL7 transporter involved in

PDIM biosynthesis. We started from *Mtb* strains previously mutated in the genes encoding the *CtpF* and *CtpH* ATPases (ΔCtpF and ΔCtpH), responsible for detoxification against high concentrations of Ca^{2+} and Na^{+}/K^{+} ions, respectively , which are actively expressed during the infection process.

To achieve this objective, it was necessary to eliminate the antibiotic resistanc e introduced in the construction of the mutants (ΔCtpF and ΔCtpH) previously obtained by recombinant breeding. On the other hand, the genetic tools were constructed to additionally delete the *mmpL7* gene by recombinant breeding. The final objective was to obtain genetic tools for the construction of double-mutated and attenuated *Mtb* strains with vaccine potential, devoid of antibiotic resistanc e markers, to be considered later in attenuation studies in animal models.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, vaccine potential, attenuation, MMPL7, P-type ATPase.

Contenido

Pág.

Resumen ..... **IX**

Lista de figuras ..... **XVI**

Lista de tablas ..... **XVIII**

Lista de Símbolos y abreviaturas ..... **XIX**

Introducción **1**

Justificación **3**

1. Marco Teórico **5**
1.1 El género *Mycobacterium* 5
1.2 El complejo MTBC 6
1.3 Envoltura celular de las micobacterias 7
1.3.1 Membrana plasmática de las micobacterias 7
1.3.2 Pared celular de las micobacterias 8
1.3.3 La cápsula de las micobacterias 10
1.4 Infección por tuberculosis 10
1.4.1 Respuesta inmune de la infección por tuberculosis 12
1.4.2 Respuesta inmune innata a la infección por tuberculosis 13
1.4.3 Respuesta inmune adaptativa a la infección por tuberculosis 14
1.4.4 Características del granuloma micobacteriano 15
1.5 Reactivación de la TB 17
1.6 Regulación transcripcional del bacilo tuberculoso durante la infección 18
1.7 Tratamientos y vacunas contra la tuberculosis 20
1.7.1 Tratamiento contra la TB 20
1.7.2 Vacunas contra la TB 22
1.7.3 Posibles candidatos a vacunas sobre la TB 24
1.7.4 Vacunas terapéuticas 25
1.7.5 Vacunas preventivas 25
1.7.6 Vacuna BCG recombinante (rBCG) 26
1.7.7 Vacunas de subunidades 27
1.7.8 Vacunas integradas por vectores virales 27
1.7.9 Vacunas de proteínas recombinantes 27
1.7.10 Vacunas con cepas atenuadas de *Mtb* 28
1.8 ATPasas tipo P como blancos de atenuación de *Mtb* 29
1.8.1 Características estructurales de las ATPasas tipo P 30

1.8.2 ATPasas tipo P de *Mtb* 33
1.8.3 Relación de las ATPasas tipo P con la virulencia de *Mtb* 35
1.9 Lípidos de la envoltura de las micobacterias 38
1.9.1 Los dimicocerosatos de tiocerol (DIM-PDIM) y su relación con la virulencia de

Mtb 41
1.9.2 Transporte de lípidos en las micobacterias: proteínas MmpL y MmpS 44
1.9.3 Proteína MmpL7 de *Mtb* 47
1.10 Recombinación en micobacterias..... 49
1.10.1 El micobacteriófago Chec9c 50
1.10.2 Sustrato de intercambio alélico (AES) 52

2. Hipótesis experimental..... 54

3. Objetivos..... 55
3.1 Objetivo general..... 55
3.2 Objetivos específicos 55

- **Construcción de un sustrato de intercambio alélico para obtener un mutante de *Mycobacterium tuberculosis* defectivo en el gen *mmpL7*..... 55**

- **Transformación de una cepa de recombinería de *Mtb* con un sustrato de intercambio alélico del gen *mmpL7*..... 55**

- **Diseñar y aplicar una estrategia para el desmarcaje de un mutante de una ATPasa tipo P de *Mtb* de utilidad en la construcción de un doble mutante 55**

4. Materiales y métodos 56
4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo..... 56
4.2 Construcción de iniciadores 57
4.3 Construcción del AES..... 58
4.3.1 Obtención de amplimeros para obtención de AES..... 58
4.3.2 Clonación de regiones genómicas corriente arriba y corriente abajo del gen *mmpL7* 59
4.3.3 Clonación de fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen *mmpL7* en el vector pGEMT-easy 62
4.3.4 Sub-clonación del fragmento corriente arriba del gen *mmpL7 en* el plásmido pYUB854 63
4.3.5 Clonación de la sección corriente abajo del gen *mmpL7* en el plásmido pVVG3: obtención del plásmido pVVG4 y AES..... 64
4.4 Obtención de una cepa de recombinción de *MtbH37Rv* 69
4.5 Obtención de la cepa mutante de *MtbH37RvΔmmpL7*..... 71
4.5.1 Comprobación del genotipo mutante de *Mtb* H37Rv ΔmmpL7 71
4.6 Desmarcaje de cepas mutantes de *Mtb* y *M. smegmatis*..... 73

5. Resultados y Discusión..... 75
5.1 Precursores para la obtención del mutante de *MtbH37RvΔmmpL7* 75
5.1.1 OBTENCIÓN DE UN AES PARA MUTAR EL GEN *mmpL7* POR RECOMBINACIÓN 77
5.1.2 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANES pVVG1 y pVVG2 78

5.1.3 Obtención del AES en el vector pYUB54 85
5.2 Cepa de recombinanción *de Mtb*H37Rv 92
5.3 Obtención del mutante de *Mtb*H37Rv defectivo en el gen *mmpL7*.....93
5.4 Desmarcaje de cepas mutantes de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* 96
5.4.1 Experimento piloto de desmarcaje de un gen de resistencia a higromicina en micobacterias 97
5.4.2 Desmarcaje de *M. tuberculosis* H37Ra *ΔctpF* y *ΔctpH*.....101

A. B. 102

6. Conclusiones y perspectivas 113
6.1 Conclusiones.....113
6.2 Perspectivas.....114

7. Anexos: Material suplementario 115
7.2 Divulgación y presentaciones en eventos científicos.....124
7.3 PROTOCOLOS 127

8. Bibliografía.....136

Lista de figuras

Figura 1-1. Esquema de la envoltura celular de las micobacterias 9
Figura 1-2. Ciclo de vida de TB..... 11
Figura 1-3. Estructura del granuloma..... 12
Figura 1-4. Representación de la composición celular de un granuloma con *Mtb* .. 16
Figura 1-5. Morfologías del granuloma durante las etapas de la TB 17
Figura 1-6. Estrategias de vacunación contra *Mtb*...... 26
Figura 1-7. Organización estructural de las ATPasas tipo P..... 32
Figura 1-8. Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana ... 39
Figura 1-9. Estructuras de algunos lípidos de cadena larga que contienen múltiples ramificaciones de metilo en *Mtb* 41
Figura 1-10. Modelo de la estructura del PDIM..... 43
Figura 1-11. Representación esquemática de la organización topológica de los transportadores canónicos RND..... 47
Figura 1-12. Modelo de síntesis y exportación de DIM 49
Figura 1-13. Proteínas de recombinación codificadas por micobacteriófagos 52
Figura 1-14. Estrategia para la recombinación micobacteriana 53
Figura 4-1. Esquema de Clonación de regiones genómicas corriente arriba y corriente abajo del gen mmpL7 60
Figura 4-2. Esquema general de la técnica de recombinación usada para la construcción de la cepa mutanteMtbH37Rv ΔmmpL7 70
Figura 4-3. Esquema de la recombinación homóloga del AES del gen mmpL7 para la obtención del genotipo mutante H37RVΔmmpL7 72
Figura 4-4. Esquema general de la técnica de desmarcaje usando los plásmidos pCG124 y pWM19..... 75
Figura 5-1. Esquema el sustrato de intercambio alélico (AES) del gen mmpL7..... 76
Figura 5-2. Colonias obtenidas de la transformación de Mtb H37Rv con el AES del gen mmpL7 76
Figura 5-3. Esquema de las secciones A y B del gen mmpL7 78
Figura 5-4. Clonación del gen mmpL7 en pGEM-T easy..... 79
Figura 5-5. Clonación del gen mmpL7 en pGEM-T easy..... 83
Figura 5-6. Construcción de pVVG3 EN EL VECTOR pYUB854..... 88

Figura 5-7. Obtención de pVVG4 conteniendo la sección B y confirmación de AES mmpL7 90
Figura 5-8. Esquema general de la construcción del AES del gen mmpL7 91
Figura 5-9. Confirmación de las cepas de recombinería por PCR de colonia.....92
Figura 5-10. Comprobación del genotipo mutante de M. tuberculosis H37Rv ΔmmpL7.....94
Figura 5-11. Esquema de la región del genoma de M. smegmatis mc2155.....98
Figura 5-12. PCR de comprobación del plásmido pGH542 con los iniciadores hsp60_promotor_dir y hsp60_promotor_rev.....99
Figura 5-13. Mapa de los plásmidos usados para desmarcar cepas mutantes de *Mtb* 102
Figura 5-14. Colonias recuperadas de la transformación del plásmido pWM19 y pCG124 103
Figura 5-15. Representación del crecimiento de colonias con diferente tratamiento 105
Figura 5-16. Esquema de la cepa mutante MtbRa ΔctpH 108
Figura 7-1. Mapas de plásmidos usados en el desarrollo de la tesis.....115
Figura 7-2. Mapeos in silico de los plásmidos trabajados en la investigación 118
Figura 7-3. Información de marcadores de peso molecular.....119
Figura 7-4. Secuenciación pVVG2 con Up Dir
Figura 7.5. Secuenciación pVVG2 con Down rev
Figura 7.6. Secuenciación MtbRa *ΔctpF* con Fmc2Dir
Figura 7-7. Secuenciación

Lista de tablas

Tabla 1-1.Algunos genes implicados en la resistencia antibiótica de algunos fármacos en *Mtb* 22
Tabla 1-2. Candidatos a vacunas en desarrollo contra la TB..... 24
Tabla 1-3. Genes de MmpL y MmpS que codifica Mtb H37Rv..... 46
Tabla 4-1. Cepas empleadas durante la investigación..... 56
Tabla 4-2. Iniciadores utilizados en el estudio para amplificación del gen mmpL7. 61
Tabla 4-3. Plásmidos obtenidos y construidos durante el transcurso de la investigación 65
Tabla 4-4. Condiciones de las PCR realizadas en el presente estudio..... 66

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviatura	Término
ABC*	Casete de unión a ATP
AEM*	Metales alcalinos y alcalinotérreos
AES*	Sustrato de intercambio aléico
AG	Arabinogalactano
AM	Ácidos micolicos
Amp	Ampicilina
ATP	Adenosin 5´ trifosfato
BCG	Bacilo de Calmette y Guérin
BSA	Albúmina sérica bovina
Cmbt	Carboxymycobactins solubles
CDR	Región de complementariedad
dNTP *	Desoxirribonucleótido (base A, C, T o G)
DIM	Dimicocerosatos de tiocerol
FPM	Fuerza protón-motriz
HM*	Metales pesados
H37Ra	Cepa de referencia no virulenta *M. tuberculosis* H37Ra
H37Rv	Cepa de referencia virulenta *M. tuberculosis* H37Rv
Hyg	Higromicina
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LAG	Lipoarabinogalactano
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Medio Luria-Bertani
LM	Lipomanano
mAGP	Complejo micolilarabinogalactanopeptidoglicano
MBT	Micobactinas asociadas a las células
MCS*	Sitio múltiple de clonación
MFS	Superfamilia facilitadora mayor
MmpL*	Mycobacterial membrane protein Large
MmpS*	Mycobacterial membrane protein small
MP	Marcador de peso molecular
MATE*	Familia de multifármacos y extrusión de compuestos tóxicos
MMT	Monomicolato de trehalosa
MTBC*	*Mycobacterium tuberculosis* complex
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
NAAT*	Test de amplificación de ácidos nucleicos
NOS_2	Nitrógeno reactivo
OADC	Ácido oleico, albumina de suero bovino, dextrosa y catalasa
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PAT	Poliaciltrehalosas
PDIM*	Dimicoserato de ftiocerol
PGL*	Glicolípido fenólico

PIM*	Fosfatidilinsitolmanosido
PCR *	Reacción en cadena de la polimerasa
ORFs*	Marcos abiertos de lectura
RND*	Superfamilia de nodulación-división-resistencia
ROS*	Especies reactivas del oxígeno
SERCA*	Retículo sarco-endoplásmico
SDS *	Dodecil sulfato de sodio
SL	Sulfolípidos
SMR*:	Familia de resistencia a drogas de pequeño tamaño molecular
TB	Tuberculosis
TB-MDR	Tuberculosis multifármacoresistente
TB-XDR	Tuberculosis extremadamente fármaco resistente
TDM*	Dimicolato de trehalosa
TMD	Dominios transmembrana
VIH	Virus de inmuno-deficiencia humana
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido

*** Las siglas provienen del inglés**

Introducción

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), la enfermedad que causa el mayor número de muertes por un único agente infeccioso [1]. A pesar de que hace más de un siglo se desarrolló una vacuna anti-TB (BCG), desde hace 60 años se cuenta con agentes quimioterapéuticos (antibióticos), y desde hace un par de décadas existen herramientas moleculares para descifrar el genoma de *Mtb* [1], no ha sido posible controlar la expansión de la TB. actualmente *Mtb* está adquiriendo mayor resistencia a los tratamientos antibióticos generando un problema aún más grave de salud pública.

La vacuna BCG (Bacillus Calmette-Guérin) es la única vacuna antituberculosa aprobada por la OMS y distribuida ampliamente por todo el planeta. BCG presenta limitaciones por ser ineficiente al prevenir la infección pulmonar en adultos y la TB latente, la forma más común de propagación de la TB [3].

Frente a esta problemática es necesario implementar nuevas estrategias de control contra la TB, entre ellas el desarrollo de nuevas vacunas que prevengan la infección primaria y la reactivación a partir de la infección latente. El desarrollo de vacunas anti-TB se logra mediante el conocimiento profundo del genoma de *Mtb*, y la aplicación de diferentes estrategias como la modificación de BCG mediante recombinación genética, la construcción de mutantes atenuados de *Mtb*, o el diseño de vacunas de subunidades y de ADN [4].

Para la construcción de cepas atenuadas de *Mtb* es importante conocer los factores de virulencia del bacilo tuberculoso. En este sentido, las ATPasas tipo P, reconocidas bombas de transporte de metales a través de la membrana plasmática

de *Mtb*, se han considerado recientemente como blancos interesantes en la viabilidad del bacilo tuberculoso [5]. Las ATPasas tipo P de *Mtb* se sobreexpresan en las condiciones intra-fagosomales como: hipoxia, estrés oxidativo, inanición, tratamiento con sustancias nocivas y latencia [6].

En este trabajo se propuso mediante recombinación la construcción de útiles génicos para la obtención de un doble mutante de *Mtb* a partir de cepas previamente mutadas en ATPasas tipo P. Como segunda mutación se propone la deleción del gen *mmpL7* que codifica para un transportador involucrado en la biosíntesis del factor de virulencia Dimicoserosato de fenoltiocerol (PDIM). La inhibición MmpL7 bloquearía la ubicación de PDIM en la pared, de paso atenuando el bacilo tuberculoso [7].

Pensando en estudios posteriores de protección, la construcción de un doble mutante a partir de los útiles génicos obtenidos en este trabajo, implican la eliminación del marcador de selección antibiótica introducido en la construcción de los mutantes de cepas de ATPasas tipo P previamente obtenidas (ΔCtpf y ΔCtph), con el objetivo de producir una cepa mutante libre de marcador de resistencia. Se utilizará la recombinasa γδ resolvasa y plásmidos con los respectivos sitios de recombinación “res sites” o sitios res que permitirán que se lleve a cabo el desmarcaje dirigido a cepas previamente mutadas con algún antibiótico de selección [8].

Las metodologías aportadas en la presente investigación servirán de punto de referencia para la construcción de mutantes atenuados desmarcados de *Mtb* con potencial para la innovación y generación de nuevas vacunas.

Justificación

Hacia mediados del siglo XX se consideraba que la TB había sido erradicada, pero en la década del 90 la OMS declaró esta enfermedad como un problema de salud pública, debido a los casos de coinfección con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) y la aparición de cepas resistentes a los fármacos anti-TB [4]. La TB anualmente cobra la vida de millones de personas a nivel alrededor del mundo. Datos del último reporte emitido por la OMS reportó un total de 484 000 personas diagnosticadas con TB resistente a la rifampicina (RR-TB), el fármaco de primera línea más eficaz. En 2018 se reportaron 7 millones de nuevos casos de TB de los que 862000 tenían coinfección con VIH; de las 1.5 millones de muertes a nivel mundial, 251000 fueron asociadas a esta condición [1]. También en 2018 se reportaron 187000 casos de TB-MDR/RR (TB multirresistente), de los que solo 156000 iniciaron tratamiento con un régimen de fármacos de segunda línea. Colombia durante este mismo año, reportó 14 446 nuevos casos, de los cuales 1336 fueron casos con coinfección de VIH [2].

La actual vacunación con BCG en lactantes no evita la infección por *Mtb*, aunque sí proporciona una protección considerable contra la meningitis tuberculosa [1]. La protección inducida por la vacunación con BCG disminuye con el tiempo y es probable que desaparezca transcurridos entre 10 y 20 años [1]. Si bien la actual vacuna salva vidas y es una parte importante del conjunto de medidas estándar de lucha contra la TB en la mayoría de los países endémicos, la vacunación con BCG no evita la reactivación de la TB latente, la principal fuente de propagación de la enfermedad [1].

Actualmente, se trabaja intensamente en el diseño de cepas de BCG modificadas por recombinación genética, atenuación de *M. tuberculosis*, vacunas de subunidades y vacunas de ADN [9]. Por ejemplo, el candidato a vacuna MTBVAC (mutante viva atenuada de *Mtb*) ha mostrado seguridad, inmunogénicidad y en una segunda fase ensayada en recién nacidos mostró ser tan segura como la actual BCG [3].

Contar con mutantes atenuados de *Mtb* sería una gran alternativa en el diseño de una nueva generación de vacunas anti-TB. Un candidato de vacuna viva atenuada a ser probado desde fases preclínicas idealmente debe incluir la inactivación de mínimo dos genes no relacionados y asociados individualmente con la virulencia. El objetivo de esta estrategia es disminuir al máximo la probabilidad de una reversión natural de la virulencia del mutante.

Por lo descrito anteriormente, en el presente trabajo se constuyeron útiles génicos que permitan mediante la técnica de recombinación el desarrollo de cepas de *Mtb* doblemente mutadas y atenuadas. De manera complementaria se propuso la deleción dirigida de la marca de resistencia antibiótica introducida al mutar utilizando recombinación, con el fin de obtener genotipos mutantes de *Mtb* desprovistas de genes de resistencia a antibióticos y con potencial uso en vacunas.

1. Marco Teórico

1.1 El género *Mycobacterium*

El término *Mycobacterium* proviene del prefijo griego *Myco* que significa hongo, nombre otorgado a este género por la apariencia de sus colonias al ser cultivadas en medio sólido [10]. El género *Mycobacterium* pertenece a la familia Mycobacteriaceae que hace parte del orden Actinomycetales [11], que incluye actualmente 154 especies y 13 subespecies, de las que se destacan los patógenos *Mtb* y *M. leprae*, los agentes etiológicos de la TB y la lepra respectivamente [12]. Sin embargo, la mayoría de las micobacterias se encuentran presentes en el ambiente sin causar daños.

El género *Mycobacterium* está integrado por bacilos rectos o ligeramente curvos, con una longitud de 1,0 a 10µm y un grosor 0,2 y 0,7µm; no esporulan ni se encapsulan. Algunos de ellos son aerobios y otros microaerófilos [13]. En cuanto a la velocidad de crecimiento, el género *Mycobacterium* se clasifica en dos grupos de acuerdo con el tiempo necesario para la formación de colonias en medio sólido: algunas especies son de crecimiento rápido (menor a 7 días) y otras de crecimiento lento (mayor a 7 días), lo que coincide con la separación filogenética entre las micobacterias.

Se destaca una alta concentración de lípidos (20-60%) en su pared celular, lo que convierte a las micobacterias en hidrofóbicas y en ocasiones resistentes a los agentes químicos. Por otra parte, poseen un alto contenido de bases de guanina y citosina en su genoma, entre el 62 y el 70% [14].

Otra característica que permite clasificar las micobacterias es su capacidad para sintetizar pigmentos carotenoides proporcionando coloraciones entre amarillentas y rosáceas [15]. Las especies fotocromógenas, como por ejemplo *M. marinum,* son capaces de producir pigmentos en presencia de luz; las escotocromógenas como *M. gordonae* no necesitan luz para generar la pigmentación; y las no cromógenas, como su nombre lo indica no se pigmentan, como es el caso de *Mtb* [15].

Las micobacterias no se pueden teñir con colorantes comunes; sin embargo, una vez teñidas son resistentes a la decoloración con una mezcla de alcohol ácido, es decir, son bacilos ácido-alcohol resistente (BAAR). De acuerdo al análisis taxonómico de su DNA, las micobacterias son consideradas como Gram positivas [12]; sin embargo, al observar la organización de su envoltura, son más parecidas a las bacterias Gram negativas [16]. La naturaleza química de la envoltura dificulta su clasificación Gram, su alto contenido de lípidos (aproximadamente el 60 % del peso seco de la célula) es muy alto al compararlo con el de bacterias Gram positivas (5%) y Gram negativas (10%) [16] impidiendo una adecuada tinción Gram, por lo que se consideran como bacterias Gram- indeterminadas.

1.2 El complejo MTBC

Mtb, es una bacteria que pertenece al complejo tuberculoso (MTBC), que incluye micobacterias que causan TB en humanos y animales [17]. Actualmente el complejo MTBC está constituido por 6 especies: *M. tuberculosis, M. bovis*, *M. africanum*, *M. pinnipedii*, *M. microti* y *M. canetti*. Las relaciones filogenéticas y la taxonomía de las especies que componen este grupo han sido estudiadas a partir de una zona con alta variabilidad genética (500 pb) que se encuentra presente en la secuencia 16S del rRNA, distinguible en todos las especies [18], [19]. Las especies del MTBC muestran un porcentaje de identidad del 99.9% en su genoma, por lo que solo difieren en algunas características fenotípicas particulares, entre ellas, la patología y la preferencia por el hospedero [20].

En cuanto a *Mtb*, la bacteria posee una pared celular hidrófoba con estructura única, la cual es crucial para su supervivencia. Esta micobacteria tiene tiempos de

duplicación de hasta de 24 horas en condiciones óptimas (a 37°C y pH neutro) lo que equivale a formación de colonias entre 3 a 6 semanas en medio sólido [18], [21]. *Mtb,* es sensible al calor, la luz solar y ultravioleta, no obstante es resistente al frío, congelación y desecación [21].

Como agente etiológico de la TB, *Mtb* es capaz de entrar en estado latente, donde exhibe una actividad metabólica limitada, dificultando la acción de los medicamentos anti-TB, entre ellos la estreptomicina, un aminoglicósido que actúa a nivel del ribosoma inhibiendo la síntesis de algunas proteínas bacterianas [22], la rifampicina que actúa a nivel de síntesis de ácidos nucleídos [23], la isoniazida que actúa inhibiendo la síntesis de ácidos micólicos (AM), la pirazinamida que actúa como profármaco e inhibe la síntesis de ácidos grasos, el etambutol que interrumpe la síntesis de arabinogalactano (AG) y las fluoroquinonas que participan en la inhibición de la ADN girasa [16].

1.3 Envoltura celular de las micobacterias

La envoltura micobacteriana está compuesta por la membrana plasmática, la pared celular y la cápsula [16] [24]. La envoltura tiene como función proteger a las micobacterias del ambiente exterior, dar forma, y proporcionar los mecanismos necesarios para el tráfico de sustancias entre el interior y exterior celular. Su baja permeabilidad dificulta la toma de nutrientes y la internalización de compuestos antimicrobianos [25], dificultando el control de las micobacterias con medicamentos [12].

1.3.1 Membrana plasmática de las micobacterias

La membrana de las micobacterias es similar en apariencia, función y composición a la de las otras bacterias [16]. A su bicapa lipídica están asociados lípidos polares y a algunos lipopolisacaridos como el lipoarabinomanano (LAM) y el lipomanano (LM) [26]. LAM posee moléculas de manosa en los extremos, produciendo una

estructura conocida como ManLAM [18], [27]. LAM puede contener moléculas de glicerol, inositol y fosfato, en unión a arabinosa, manosa, lactato, succinato, palmitato y tuberculestereato [18]. Por otra parte, LM contiene manosa en su estructura, la que es reconocida por la membrana de las células huésped a través de los receptores Toll, activando vías de señalización en la respuesta del hospedero [28].

Las proteínas de membranas de las micobacterias, como en otras bacterias, se encargan de procesos celulares tales como la unión y transporte de aminoácidos, iones, carbohidratos, ácidos orgánicos y medicamentos a través de la bicapa lipídica [29]. Específicamente las ATPasas tipo P hacen parte de las proteínas de membrana, realizando funciones de homeóstasis celular estableciendo un equilibrio de entrada y salida de metales para mantener su concentración a nivel de nutrientes, además, realizan funciones de desintoxicación de iones, lo que mejora la supervivencia de *Mtb* [6].

1.3.2 Pared celular de las micobacterias

La pared celular rodea la membrana celular y se encuentra inmediatamente después del espacio periplásmico en las micobacterias. Está conformada básicamente por péptidoglicanos (PG) unidos covalentemente a arabinogalactano (AG) y este a su vez a los ácidos micólicos (AM) (**Figura 1-1**) [18], [24]. A la pared celular se le atribuye parte de la resistencia de las micobacterias a los antibióticos [12]. En el complejo micolil–arabinogalactano-peptidoglicano (mAGP), el PG se compone de unidades repetitivas de N-acetilglucosamina y ácido N-acetilglicolil-murámico conectadas por pequeños péptidos [16].

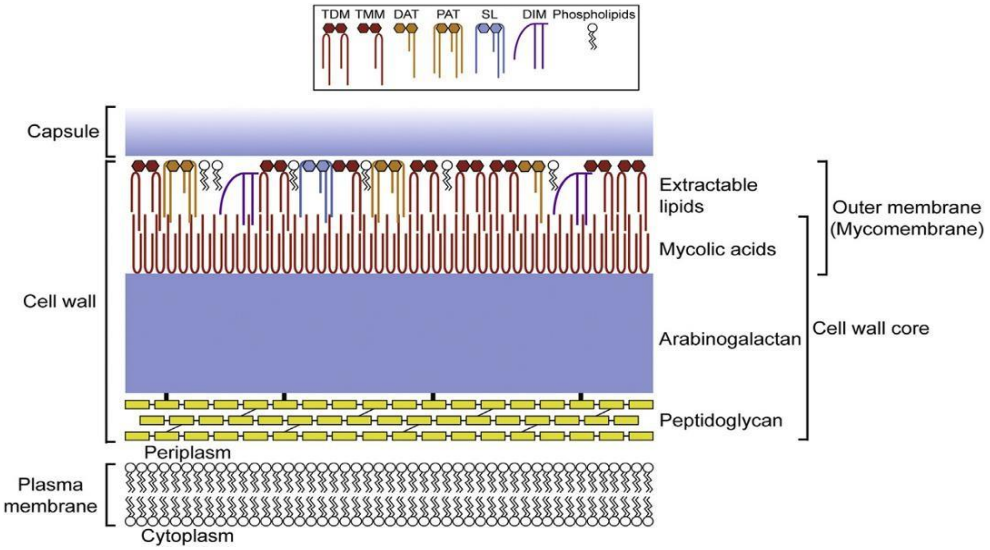


Figura 1-1. Esquema de la envoltura celular de las micobacterias. La envoltura celular está conformada por tres estructuras complejas: la membrana plasmática, constituida por fosfolípidos, la pared celular de péptidoglicano, que se enlaza covalentemente a arabinogalactano, que en los extremos distales se une a ácidos micólicos formando una pseudo-bicapa lipídica externa o micomembrana. Finalmente se encuentra la cápsula, para especies patogénicas, la cual interactúa directamente con el hospedero. Tomado de [30]

El AG es uno de los principales constituyentes de la pared celular, está conformado por arabinano y galactano en su forma furanosa, formando un complejo heteropolisacarido ramificado [12]. Por otra parte, los AM, son una variedad de ácidos grasos de cadena larga (60 a 90 carbonos) α-alquilados y β-hidroxilados, que son activamente importantes en la permeabilidad de la pared celular [12]. En su mayoría, los AM se encuentran unidos covalentemente al mAGP, pero algunos de ellos se pueden encontrar de forma libre en la pared micobacteriana [12], [16].

Las micobacterias presentan una estructura altamente hidrofóbica comprendida por AM unidos covalentemente al mAGP (capa interna), y los lípidos libres (capa externa), que hace las veces de membrana externa (**Figura 1-1**) [16], [24]. Los lípidos libres se unen de manera no covalente con el mAGP, y son extraíbles fácilmente con solventes orgánicos. Dentro de este grupo de lípidos se encuentran manosidos de fosfatidil inositol manosidos (PIM), glicolípido fenólico (PGL), dimicoserosato de fenoltiocerol (PDIM), dimicolato de trehalosa (TDM) y sulfolípidos (SL) [31], [16].

1.3.3 La cápsula de las micobacterias

La cápsula es la sección más externa de la envoltura micobacteriana y tiene como función principal mantener la hidratación de la célula [32]. La cápsula se encuentra en especies patógenas como *Mtb* y *M. avium*, la que se pierde en los cultivos *in vitro*. Se compone de polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos [16]. Las moléculas que componen la cápsula han sido relacionadas en la señalización celular, debido a su rol en la interacción con el sistema inmune [12]. Polisacáridos como el glucano, son los principales componentes de la cápsula de las micobacterias de crecimiento lento, y especialmente de las patógenas como *Mtb* [31].

1.4 Infección por tuberculosis

Mtb es el agente etiológico de la TB humana, bacilo identificado por Robert Koch en 1882 [33]. Debido a que *Mtb* tiene la capacidad de adaptarse a cambios ambientales como la hipoxia, la privación de nutrientes y diversas condiciones de estrés durante todo el proceso de infección, ningún fármaco ni vacuna han tenido total éxito en la erradicación de la TB [24].

Mtb se propaga vía aerosoles mediante gotículas formadas en el sistema respiratorio de las personas con TB, las que son expulsadas cuando la persona tose, estornuda o habla, transmitiéndose a individuos sanos, los que portarán TB latente, siempre y cuando su sistema inmune responda de manera adecuada. (**Figura 1-2**) [4].

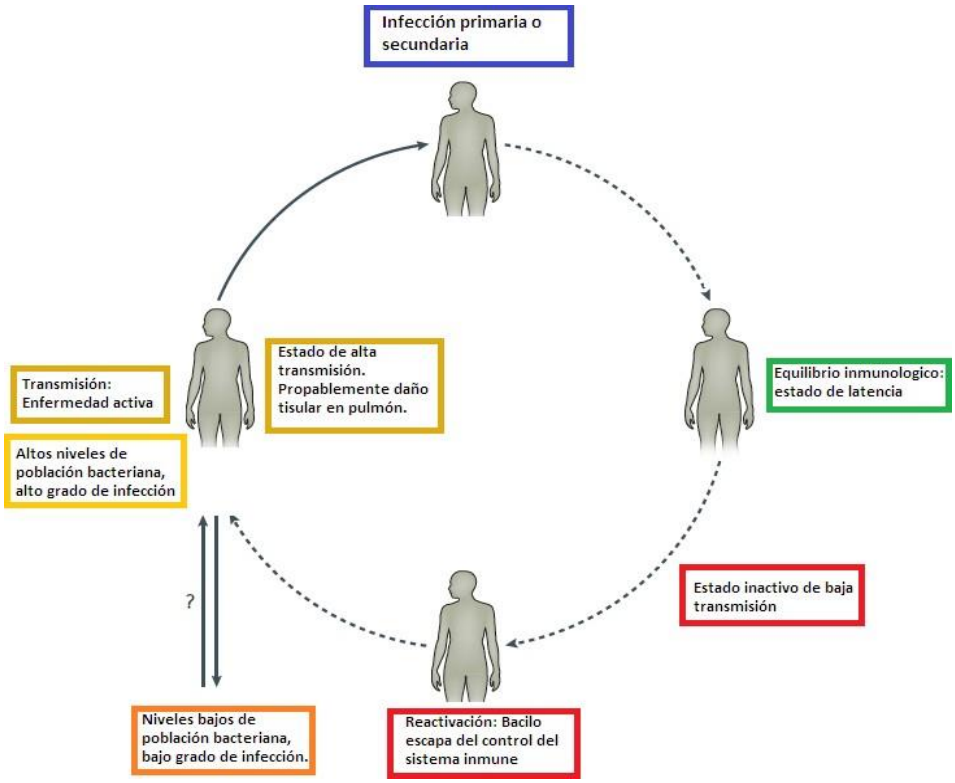


Figura 1-2. Ciclo de infección por tuberculosis Inicia por la inhalación del bacilo tuberculoso, el que se puede albergar en los alveolos pulmonares formando lo que se conoce como infección primaria. Se genera un equilibrio inmunológico si el individuo está sano, donde la bacteria entra en un estado de latencia, es decir, un estado no replicativo donde los bacilos son viables, pero no se dividen o presentan mínima replicación celular. Si el sistema inmune se deprime, 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 [34]

Generalmente la enfermedad activa progresa en niños y en adultos mayores; el riesgo de desarrollar la enfermedad desde un estado latente representa entre un 5-10% [33]. Comúnmente *Mtb* coloniza los alveolos pulmonares generando infección en vías respiratorias; sin embargo, el bacilo puede diseminarse a otros órganos a través de vía linfática y hemática causando infección en huesos, meninges y ganglios linfáticos ocasionando TB extrapulmonar [35]. Aunque los pulmones son el órgano más común que desarrolla TB, la enfermedad extrapulmonar se puede producir en más del 20% de pacientes inmunodeprimidos.

La infección primaria puede tomar una de estas dos vías: enfermedad activa o infección latente. El riesgo de infección activa aumenta por inmunosupresión,

diabetes, malnutrición y alcoholismo; sin embargo, aún con una detección temprana del bacilo tuberculoso, su erradicación es difícil ya que *Mtb* sobrevive gracias a su capacidad de persistir a la respuesta inmune del huésped [36].

1.4.1 Respuesta inmune de la infección por tuberculosis

Cuando se establece la interacción hospedero-patógeno, la producción de varias citoquinas pro-inflamatorias induce el reclutamiento celular en el sitio de infección, conduciendo a la proliferación y acumulación de macrófagos, neutrófilos y linfocitos T, entre otras células inmunes importantes, formando el granuloma (Ver **Figura 1-3**).

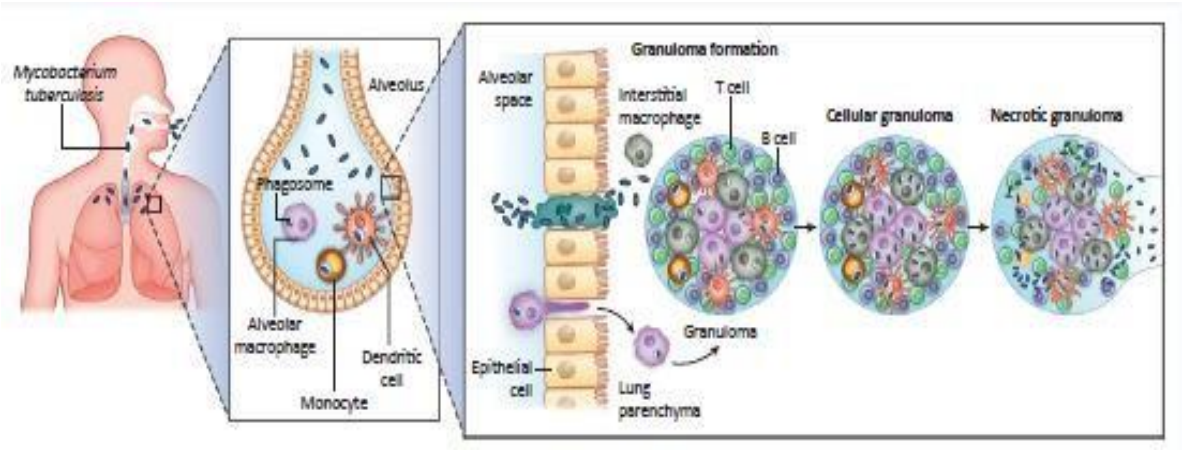


Figura 1-3. Estructura del granuloma. El granuloma es un conglomerado celular que se forma como parte de la respuesta inmune celular, contra M. tuberculosis. El bacilo tuberculoso es rodeado principalmente de macrófagos, neutrófilos, células dendríticas y fibroblastos, entre otras líneas celulares importantes. Tomado y editado de [34]

Específicamente, durante la etapa inicial de infección se activa la respuesta inmune innata, la que se encarga de reclutar células inflamatorias en los pulmones (macrófagos alveolares, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos B.) A continuación, se induce una respuesta inmune adaptativa provocada por la diseminación de *Mtb* en los ganglios linfáticos drenantes; durante este proceso, la presentación de antígenos de micobacterias por las células dendríticas amplifica la respuesta de células T efectoras que migran a los pulmones y junto con los leucocitos estimulan la formación del granuloma quedando el bacilo en estado latente (**Figura 1-4**). Dentro de esta estructura, los macrófagos son activados por interferón gamma (IFN-γ), una citosina secretada por las células T $CD4^+$ cuyo fin es

restringir la dispersión y la replicación de *Mtb.* En latencia, la carga bacteriana permanece estable, pero una población continua el proceso de replicación. La TB latente por lo tanto no representa un estado estático, sino es un estado dinámico entre la micobacteria y su hospedero [37]. En latencia las personas infectadas no presentan síntomas de la enfermedad y no pueden contagiar a otras personas, sin embargo, al presentarse alguna deficiencia en el sistema inmunitario la enfermedad se reactiva [35] ya que se restablece la actividad metabólica y replicativa de la micobacteria [36].

1.4.2 Respuesta inmune innata a la infección por tuberculosis

El bacilo tuberculoso al ingresar por las vías respiratorias superiores evade con éxito la primera barrera de defensa, el sistema mucociliar, mostrando tropismo e instalándose en los alvéolos pulmonares. Una vez allí el bacilo tuberculoso es fagocitado por los macrófagos alveolares, y capturados por neutrófilos y células dendríticas, activando la respuesta inmune innata mediada por péptidos antimicrobianos [33]. La presentación del bacilo por células dendríticas supondría la muerte bacteriana [35], sin embargo, las cepas virulentas de *Mtb,* interrumpen la señalización evitando la maduración del fagosoma una vez se encuentra en los macrófagos [38]. Inicialmente las micobacterias son ingeridas por fagocitosis, un proceso que invagina la membrana y que finaliza en la formación del fagosoma. Durante este estadio de infección, el bacilo responde a condiciones adversas dentro del fagosoma como bajos niveles de oxígeno y de nutrientes, altos niveles de especies de nitrógeno reactivo (NOS) y oxígeno reactivo (ROS) [39], bajo pH y acción de enzimas hidrolíticas, péptidos antimicrobianos y alta concentración de metales pesados [36]. El metabolismo del bacilo es inhibido, a su vez que los macrófagos promueven la producción de enzimas proteolíticas para la degradación de proteínas y lípidos bacterianos [36].

La formación del fagolisosoma no detiene la supervivencia de *Mtb*, quien evade su propia destrucción afectando la maduración del fagosoma y llevando el pH del

compartimiento fagocítico hasta 6.4. Las rutas por las que las micobacterias sobreviven dentro del macrófago son variadas; sin embargo, se conoce que uno de los mecanismos usados es a través de la exclusión de la ATPasa vacuolar del macrófago, ya que el proceso de degradación y presentación de antígeno no es eficiente. Por otro lado está la secreción de la ureasa micobacterial (UreC) una enzima que hidroliza la urea para formar amoniaco y dióxido de carbono; una vez en solución, el amoniaco forma carbonato de amonio, sustancia que usa la micobacteria para responder a la disminución del pH y aumentar la alcalinidad del medio [36].

En los seres humanos, la infección por *Mtb* promueve la producción de una citosina antiinflamatoria, la interleucina-10 (IL-10), que afecta la maduración del fagosoma por medio de mecanismos dependientes de STAT-3 que favorecen la supervivencia y la proliferación de *Mtb* [33].

Los mecanismos ROS y RNS que actúan dentro del fagosoma para la eliminación de *Mtb* son evadidos por el bacilo mediante la producción de enzimas como la catalasa y la superóxido dismutasa, proteínas capaces de degradar los intermediarios reactivos de oxígeno. Usando estos mecanismos, *Mtb* es capaz de sobrevivir durante largos períodos en este ambiente intracelular [36] [40].

Existen otras células que desempeñan un rol importante en la línea de defensa primaria contra *Mtb* tales como los neutrófilos, los monocitos y las células dendríticas que son reclutadas hacia los pulmones para destruir al bacilo. Estas células establecen la formación de un granuloma temprano, [36], [41] en donde la micobacteria encuentra un ambiente propicio para su expansión poblacional [37].

1.4.3 Respuesta inmune adaptativa a la infección por tuberculosis

La protección contra *Mtb* se da gracias a la capacidad de las células T $CD4^+$ para producir IFN-γ, que activa a su vez los fagocitos infectados. IFN-γ actúa como un activador de macrófagos y dirige la diferenciación de linfocitos T $CD4^+$ en linfocitos

T_H1 cuya función es la de inducir una mayor secreción de interleucina 12 (IL-12) que promueve la diferenciación a T_H1, lo que amplifica la respuesta inmune [4].
Durante la diferenciación de células T $CD4^+$ a células T_H1 se produce también interleucina IL-17 que regula el reclutamiento de células T_H1 en los pulmones infectados. El aumento de células T $CD4^+$ reguladores (T_{reg}) durante el progreso de la infección asegura que la respuesta de T_H1 no sea excesiva y cause daño pulmonar [42]. Un equilibrio entre la respuesta inmune y su regulación se da a través de moléculas de inhibición de la respuesta inflamatoria como las PD1 que se expresan por las células T_{reg}, es por tanto que la activación de estos mecanismos es fundamental en la protección contra *Mtb* [42].

El factor de necrosis tumoral (TNF) y la linfotoxina (LT-α3) median la inmunidad de *Mtb* en humanos; su función es la de regular la formación y mantener la integridad de los granulomas [42]. La respuesta inmune adaptativa a *Mtb* en sus primeras etapas logra contener el crecimiento progresivo del bacilo, lo que genera síntomas transitorios como fiebre y erupción cutánea. Luego de haberse establecido esta inmunidad adaptativa, la mayoría de personas infectadas transitan a un estado asintomático [36], [37].

1.4.4 Características del granuloma micobacteriano

El granuloma es un mecanismo de defensa del sistema inmune que se forma alrededor de la micobacteria (Figura 4). Esta formación es un tipo de lesión típica de la TB y en ella convergen macrófagos, células gigantes multinucleadas que se forman por la fusión de la membrana plasmática, y por la acumulación de múltiples macrófagos que desarrollan un microambiente que se caracteriza por tener bajos niveles de oxígeno, nutrientes y presentar un pH muy ácido. Todo en su conjunto restringe la replicación y la propagación de la bacteria [41].

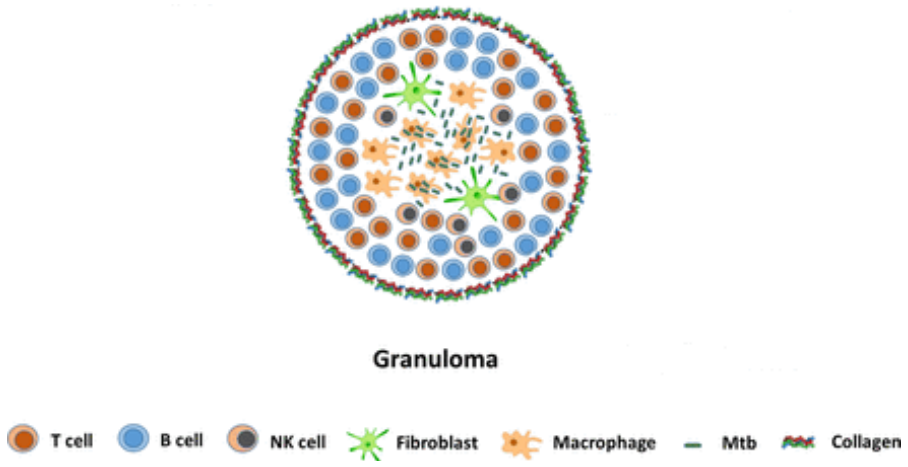


Figura 1-4. Representación de la composición celular de un granuloma con *Mtb.*
Tomado de Squeglia, 2018 [43]

El bacilo es controlado en este estadio frenando su propagación y estableciéndose en un estado latente en la mayoría de personas infectadas [36]. *Mtb* puede modificar su expresión fenotípica con el objetivo de optimizar su supervivencia en el ambiente del granuloma restringiendo su crecimiento [41]. En este estado de latencia los bacilos no presentan tasas altas de replicación y mantienen su viabilidad en un estado metabólico de restricción energética, en donde la micobacteria es viable pero no se divide [36].

Estudios realizados en seres humanos, el granuloma puede distinguirse en tres tipos principales: el granuloma sólido que contiene el bacilo, el granuloma necrótico característico de las primeras etapas de la TB activa y finamente el granulom a caseoso caracterizado por un ambiente hipóxico y que es resultado de la etapa terminal de la TB (**Figura 1-5**) [33] [36].

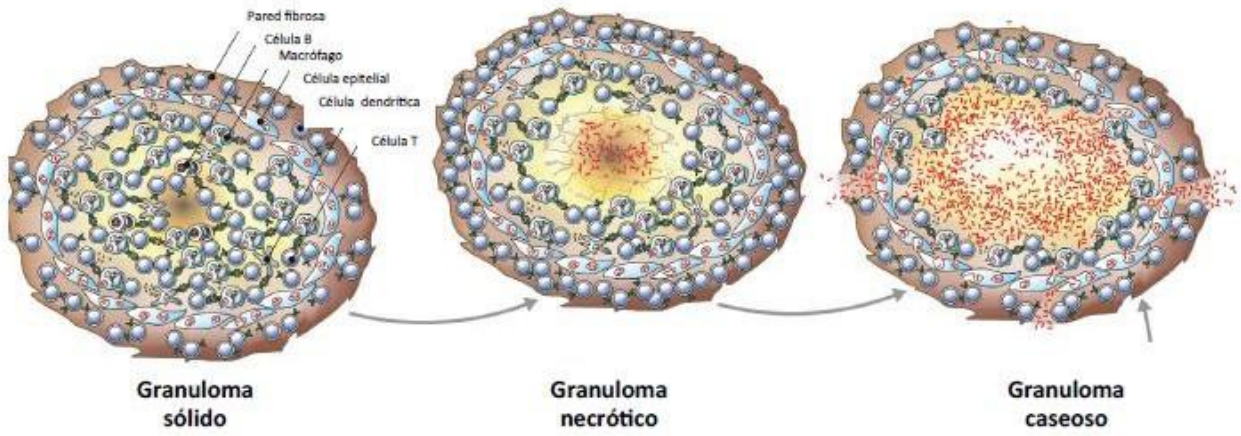


Figura 1-5. Morfologías del granuloma durante las etapas de la TB. Tomado de Gengenbacher, 2012 [36].

En la TB activa, las distintas etapas del granuloma proporcionan diferentes microambientes en los cuales el bacilo puede adaptarse, y las diferentes etapas coexisten durante todo el proceso [36].

El granuloma sólido es la formación típica durante la TB latente, está conformado por fagocitos mononucleares, células dendríticas y linfocitos T y B. El granulom a sólido se encuentra rodeado por una pared fibrótica que sirve como barrera y lo separa del tejido circundante en donde la carga de *Mtb* es baja (**Figura 1-5**) [36].

En la etapa de granuloma necrótico, su núcleo se encuentra compuesto por células dendríticas sólidas y por tener un ambiente hipóxico (**Figura 1-5**). En el granulom a caseoso, el núcleo se inestabiliza lo que produce la formación de cavidades ricas en oxígeno lo que le proporciona al bacilo una fuente de nutrientes **(Figura 1-5)** [36].

1.5 Reactivación de la TB

Cuando recae el sistema inmune de una persona infectada con *Mtb* la reactivación puede presentarse a través de dos mecanismos:

El primer mecanismo comprende defectos cuantitativos de células T $CD4^+$ en pacientes co-infectados con VIH; las evidencias demuestran que en personas VIH^+

hay una disminución de células T CD4+ específicas de antígenos de *Mtb*, aumentando la probabilidad de desarrollar TB activa [36].

El segundo mecanismo está asociado con la neutralización terapéutica de TNF por anticuerpos monoclonales. El bloqueo del TNF está relacionado con la disminución de la actividad antimicrobiana facilitada por los macrófagos y con la reducción de células T CD8+ que secreta moléculas citosólicas que contribuyen a la muerte de *Mtb* [36].

El bacilo tuberculoso cuenta además con mecanismos para evadir y neutralizar su eliminación, uno de estos mecanismos es la manipulación del metabolismo de los lípidos del macrófago. Las evidencias han demostrado que un evento de necrosis favorece más al bacilo en lugar de un evento de apoptosis y esto lo consigue manipulando los mecanismos de muerte celular del macrófago [41]. La micobacteria manipula la biosíntesis de eicosainodes, induciendo la síntesis de lipoxinaA_4 (LXA_4) que inhibe la producción de ciclooxigenasa 2 (COX2) una enzima esencial para la biosíntesis de la prostanglandina E_2 (PGE_2).

1.6 Regulación transcripcional del bacilo tuberculoso durante la infección

Las bases moleculares permiten comprender los mecanismos de patogenicidad, virulencia y persistencia que utiliza de *Mtb* para sobrevivir y persistir en las células hospederas. *Mtb* posee diferentes factores de virulencia, los cuales se clasifican de acuerdo a su función, característica molecular o localización celular, [44].

La envoltura celular de *Mtb* contiene una amplia variedad de glicolípidos y lípidos que cumplen un rol importante en su patogénesis como ligandos claves reconocidos por receptores de la célula hospedera. De esta forma la superficie del bacilo se acopla a la membrana de los fagocitos iniciando la invasión celular. Una vez dentro del macrófago, el bacilo activa mecanismos que evitan la fusión lisosómica, la

acidificación del fagosoma, modifican la señalización, e interrumpen la secreción de citocinas [44].

Mtb posee un grupo de genes relacionados con la síntesis de proteínas quinasas que modulan eventos celulares, tales como la adaptación ambiental, la diferenciación y la división celular. Las proteasas por su parte, tienen un rol fundamental en la homeostasis celular; estas proteínas controlan el proceso de transcripción, regulación y metabolismo y desempeñan funciones de degradación de tejidos y de moléculas de defensa de la célula hospedadora. Por su parte, las proteínas transportadoras de metales le brindan a la micobacteria una ventaja adaptativa que les permite subsistir en entornos tan hostiles como en el fagosoma, en donde están expuestos a altas concentraciones de metales [44].

Dentro de los genes regulatorios de *Mtb* se incluyen una amplia variedad de sistemas de dos componentes, factores de transcripción y quinasas, que se encargan mediante regulación transcripcional, de adaptar el bacilo a los diferentes ambientes durante el proceso de infección como: baja tensión de oxígeno, agotamiento de nutrientes, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno, pH alterado y otras tensiones ambientales [44]. Un ejemplo de regulación transcripcional es el sistema dos componentes DosR-DosS/T que se activa en respuesta a la hipoxia, a la presencia de óxido nítrico y al monóxido de carbono. También el sistema PhoP/PhoR que controla la respuesta a hipoxia y estrés, el metabolismo respiratorio, la secreción de antígenos como ESAT-6 y la síntesis de lípidos [45], [46].

Entre *los* reguladores transcripcionales, *Mtb* también cuenta con los factores sigma que se activan en respuesta a condiciones de estrés. El factor sigma e (SigE) se sobre-expresa durante la infección a macrófagos; SigF cuando la bacteria se encuentra en condiciones de inanición e infección de macrófagos humanos [44], SigG durante la infección de macrófagos humanos y se ha visto que es

indispensable para el crecimiento intracelular. Finalmente SigH en respuesta al choque térmico y al estrés oxidativo y nitrosativo [44].

Proteínas similares al factor Rpf (factor promotor de resucitación) son codificadas dentro del genoma de *Mtb.* Rpf tiene la habilidad de resucitar a *Mtb* desde un estado de latencia; la interrupción de alguno de los genes que codifica para una de estas proteínas tiene un impacto en la recuperación de la micobacteria, por lo que son necesarias durante los procesos de reinfección.

1.7 Tratamientos y vacunas contra la tuberculosis

Dado que la infección por TB cobra anualmente millones de vidas, un diagnóstico temprano y un tratamiento continuo evitarían millones de muertes además de la propagación de cepas TB-MDR y TB-XDR. En la actualidad existen 22 fármacos probados en ensayos clínicos fase 3, y 12 vacunas candidatas probados en fases clínicas 2a y 3.

1.7.1 Tratamiento contra la TB

El tratamiento de infección por TB abarca un régimen estricto de medicamentos que deben suministrarse por un periodo de 6 a 9 meses, teniendo una tasa de curación del 95% para casos no complicados que se adhieren a el tratamiento [47] [48].
La OMS sugiere para casos de TB no resistente a fármacos antituberculosos , antibióticos y fármacos de primera línea como la isoniazida (INH), la rifampicina (RIF), el etambutol (ETB) y la pirazinamida (PZA). Los dos últimos deben suministrarse durante los dos primeros meses de tratamiento, lo que se conoce como fase intensiva, seguido a este régimen, se debe suministrar RIF e INH hasta completar los seis meses de tratamiento, lo que constituye la fase de continuación [47] [49].

MDR-TB (TB multidrogoresistente) es la enfermedad causada por cepas de *Mtb* resistentes al menos a los antituberculosos isoniazida y rifampicina. Por su parte, la XDR-TB (TB extremadamente resistente a fármacos) es la producida por cepas resistentes a isoniazida, rifampicina, a una fluoroquinolona (ciprofloxacino, ofloxacino, moxifloxacino, levofloxacino o gatifloxacino) y a un agente inyectable de segunda línea (etionamida, amicacina, kananicina o capreomicina). El abandono del tratamiento con fármacos de primera línea propicia la aparición, desarrollo y propagación de cepas MDR y XDR lo que impacta de modo negativo el control de la enfermedad, aún más cuando *Mtb* presenta resistencia natural a numerosos compuestos antibacterianos, consecuencia de su compleja pared celular de baja permeabilidad para muchos de estos compuestos.

El tratamiento estándar de 6 meses no es efectivo contra la MDR-TB, por lo que se opta por un método de 2 o más años usando fármacos mucho más tóxicos y costosos [49]. El tratamiento de MDR-TB incluye un aminoglucósido inyectable como la amikacina, capreomicina o kanamicina, una fluoroquinolona como moxifloxacino, gatifloxacino o levofloxacina y un fármaco de primera línea como ETB y PZA y dos o más fármacos orales de segunda línea etionamida, cicloserina, ácido para-aminosalicílico o terizidona [49]. La OMS designó tiempos de tratamiento para MDR-TB en el que la fase intensiva tiene una duración de 8 meses y la fase de continuación de 12 a 18 meses, sin embargo, la tasa de curación con este tratamiento solo es del 65% en los pacientes tratados [50].

El tratamiento de XDR-TB depende principalmente del estado inmune del paciente, del daño tisular y la resistencia de la cepa micobacteriana, es por esto, que debe ser diseñado para cada paciente, y su éxito dependerá del diagnóstico temprano, el apoyo médico y la adhesión al tratamiento [49]. La resistencia y la multirresistenc ia son consecuencia de mutaciones cromosómicas que se dan bajo la presión selectiva por el uso de los antibióticos [51].

La tabla 1 muestra alguna de las mutaciones en genes involucrados en la resistencia antibiótica adquirida en *Mtb* [51]

Tabla 1-1.Algunos genes implicados en la resistencia antibiótica de algunos fármacos en *Mtb.* Tomado de Smith, 2013 [51]

Fármaco	Modo de acción	Mutación en el gen	Función génica
Rifampicina	Inhibe la transcripción	*rpoB*	Subunidad β de ARN polimerasa
Isoniazida	Inhbición de la síntesis de ácidos micólicos	*katG* *inhA* *ndh* *ahpC*	Catalasaperoxidasa Enoil-ACP reductasa NADH Deshidrogenasa II Acil-hidroproxidasa
Etambutol	Inhibición de arabinogalactano	*embCAB* *embR*	Arabinosil-transferasa Regulador transcripcional
Pirazinamida	Inhibición de la traducción	*pncA* *rspA*	Pirazinamidasa Proteina ribosomal S1
Kanamicina	Inhibición de la traducción	*rrs* *eis*	16S rARN Acetil transferasa
Estreptomicina	Inhibición de la traducción	*rpsL* *rrs* *gidB*	Proteína ribosomal S12 16S rARN 16SrARN metiltransferasa
Etionamida	Inhibición de biosíntesis de ácidos micólicos	*mshA* *ethA*	Glicosil-tranferasa Flavin monooxigenasa
Fluoroquinolonas	Inhibición de DNA girasa	*gyrA* *gyrB*	Subunidad A DNA girasa Subunidad B DNA girasa

1.7.2 Vacunas contra la TB

La actual vacuna contra la TB llamada Bacillus Calmette-Guérin (BCG) es la única vacuna que hasta el momento ha sido aprobada por la OMS. BCG se obtuvo de una cepa *M. bovis* aislada de una vaca infectada a la cual se le hicieron 231 pases sucesivos durante 13 años, como efecto de estos pases se obtuvo una cepa

atenuada que no causaba TB en vacas, caballos y otros modelos animales [52].La vacuna BCG es una de las vacunas más seguras y por lo tanto mayormente administrada, aproximadamente 3,5 billones de personas han sido vacunadas con BCG, demostrando que esta vacuna es efectiva en la prevención de TB miliar y meníngea en niños [53]; sin embargo, no impide el establecimiento de TB latente o la reactivación de TB en adultos [52]. El uso de BCG como vacuna contra la TB pulmonar ha sido tema de debate, ya que las razones que llevan discutir la validez de esta vacuna es que BCG no induce respuesta de memoria a largo plazo y no estimula la respuesta de células T $CD4_+$ y $CD8_+$ [54], [52],[9].

Diversos estudios luego de la inoculación con BGC en humanos han demostrado que se incrementa la producción de IFN-γ y que induce la expresión de células T $\gamma\delta$ que se activan para controlar la progresión de TB, inclusive la vacuna induce la producción de anticuerpos a niveles moderados [55], [56], pero estas reacciones no son suficientes para que la vacuna alcance un nivel de protección que abarque un 100%. La exposición previa a micobacterias ambientales interfiere con la eficiencia de BCG, diferentes estudios han demostrado que los individuos desarrollan inmunidad hacia estas micobacterias, lo que suscita un bloqueo en los efectos de la vacunación, inhibiendo la replicación de BCG y previniendo la respuesta protectora enmascarando los efectos de la vacuna [53].

Algunos análisis moleculares demuestran que BCG ha perdido un amplio número de genes debido al número de pases realizados provocando en su genotipo una atenuación que la hace poco efectiva. El segmento RD1 que codifica antígenos como ESAT-6 y CPF-10 que están ausentes en BCG y que son marcadores de enfermedad como de inmunidad de TB, es un ejemplo de esta pérdida de genes [54] [9].

Debido a la funcionalidad debatible de BCG se hace necesario encontrar nuevas vacunas contra la TB seguras y eficaces que permitan la expresión génica de antígenos durante todas las etapas de la infección. La compresión de la patogénesis

de la enfermedad y la respuesta inmune a *Mtb* es probablemente la ruta más segura para diseñar una vacuna eficaz contra la TB [41].

1.7.3 Posibles candidatos a vacunas contra la TB

Diferentes candidatos a vacunas contra la TB se encuentran en ensayos clínicos o en fases de estudio. Entre ellos, las vacunas terapéuticas y las vacunas preventivas son las más estudiadas (Tabla 2) [53].

De acuerdo a la OMS, las etapas de desarrollo y evaluación de una vacuna incluyen diferentes fases. El modelo de estudio es animal durante la etapa de ensayos preclínicos y tiene como objetivo evaluar la seguridad, toxicidad e inmunidad de los animales de experimentación. Los ensayos clínicos se dividen en las siguientes etapas en: Fase I: evalúa la seguridad, tolerabilidad e inmunogenicidad en diferentes poblaciones; Fase IIa: abarca estudios más amplios de entre 100 a 300 voluntarios y el objetivo es hacer un diagnóstico del rango de dosis en la población para identificar la dosis óptima; Fase IIb: son estudios que abarcan más de 1000 voluntarios y tienen como fin demostrar evidencia de prevención de la enfermedad; Fase III: Son estudios de registro para la licencia de la vacuna, están diseñados para demostrar que los resultados son estadísticamente significativos en la prevención y tratamiento de la enfermedad y que son seguros a largo plazo [57].

Tabla 1-2. Candidatos a vacunas en desarrollo contra la TB. Tabla adaptada de Weiner, 2013 [5]

Población objetivo	Tipo de Vacuna	Candidatos
Recién nacidos	Preventiva	**Micobacterias vivas:** rBCG: VPM 1002 ***Mtb* atenuada** MTBVAC
Niños/Adolescentes	Preventiva	**Vectores virales:** Ad5 Ag85A; TB.FLU-04L MVA85A **Proteínas recombinantes con adyuvantes:** H4 + IC31 H56 + IC31 M72F + AS01
Individuos con TB	Terapéutica	**Micobacterias muertas:** RUTI® *M.vaccae* DAR-901 **Proteínas recombinante con adyuvantes:** ID93/GLA-SE

1.7.4 Vacunas terapéuticas

Estas vacunas tienen como fin el fortalecimiento del sistema inmune del paciente con TB para eliminar células infectadas con *Mtb*, prevenir la reactivación de la infección y reducir el tiempo de tratamiento con fármacos antituberculosos [52], de hecho, estas vacunas pueden reducir el desarrollo de resistencia a medicamentos y mejorar la eficacia de la terapia dirigida contra MDR/XDR-TB [52]. Una de las ventajas de las vacunas terapéuticas es guiar la respuesta inmune contra la TB latente debido a que usan antígenos de *Mtb* en dormancia. En la actualidad tres de estas vacunas se encuentran en ensayos clínicos, RUTI®, *M. vaccae* y DAR-901 (Tabla 3).

1.7.5 Vacunas preventivas

El diseño de este tipo de vacunas tiene como fin mejorar, potenciar o reemplazar a la vacuna BCG; se desarrollan con el propósito de impulsar una memoria

inmunológica a largo plazo contra *Mtb*. El esquema de inmunización para mejorar e inducir la memoria inmunológica iniciaría en recién nacidos con la vacuna BCG, rBCG o cepas atenuadas de *Mtb* y se necesitaría una vacunación de refuerzo en la infancia y la adolescencia haciendo uso de vacunas de subunidades [54] (**Figura 1-6**).

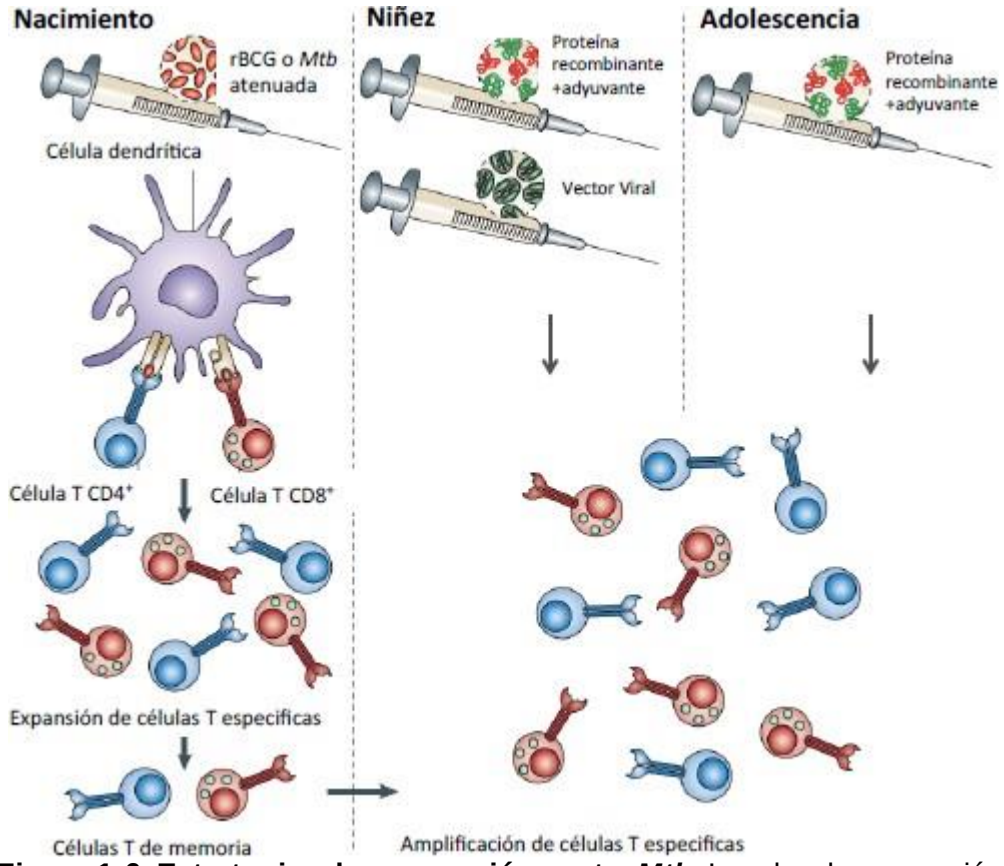


Figura 1-6. Estrategias de vacunación contra *Mtb*. Impulsar la vacunación con BCG o BCG modificado recombinante (rBCG), en lugar de tratar de reemplazarlo por completo, es un enfoque práctico para futuras inmunizaciones contra la TB. Tomado y modificado de Skeiky, 2006 [54]

1.7.6 Vacuna BCG recombinante (rBCG)

Las vacunas recombinantes usan como vector la cepa parental BCG para expresar antígenos ausentes en esta cepa atenuada del complejo tuberculoso, con el objetivo de mejorar la respuesta inmune en el huésped. rBCG30 es un recombinante de BCG desarrollado para sobre-expresar el antígeno 85B de *Mtb* y de esta manera

estimular el sistema inmunológico. Toda vez que se obtuvo una inmunogenicidad menor a la esperada, rBCG30 ya no se encuentra en desarrollo clínico [59]. Por el contrario, rBCG VPM1002 que expresa la hemolisina listeriolisina (*Hly*) (proveniente de *Listeria monocytogenes)* y que cuenta con la deleción del gen *ureC* [60] (Tabla 3), es un candidato que se encuentra en ensayos clínicos fase III, y dará inicio a ensayos en recién nacidos y voluntarios sanos de Europa y África.

1.7.7 Vacunas de subunidades

El objetivo de estas vacunas es inducir la respuesta inmune de células T $CD4_+$ y $CD8_+$ dependiendo de los adyuvantes utilizados para su estimulación. Estas vacunas contienen antígenos inmunodominantes de *Mtb* en forma de genes integrados en vectores virales o en forma de proteínas recombinantes [52].

1.7.8 Vacunas integradas por vectores virales

Los poxvirus y los adenovirus son los vectores virales más comúnmente usados en estrategias de vacunación debido a que expresan el antígeno 85A (Ag85A) de *Mtb*, una enzima con actividad micoliltransferasa que cataliza la síntesis de glicolípidos de la pared celular de la micobacteria [52],[55]. Un ejemplo de este tipo de vacunas es el desarrollo MVA85A/AERAS-485 un recombinante atenuado de vaccinia Ankara, un poxvirus que expresa Ag85A de *Mtb* (Tabla 2) [60].

1.7.9 Vacunas de proteínas recombinantes

Estas vacunas se desarrollan a partir de subunidades proteicas de diferentes antígenos o proteínas de fusión de *Mtb* y son suministradas en combinación con adyuvantes [52], [60]. El candidato vacunal de subunidades H4 está integrado por una proteína de fusión de dos antígenos de *Mtb* Ag85B y TB10.4, y exhibe una actividad protectora junto al adyuvante IC31 en modelos de ratones y cobayos; en la actualidad está en ensayos clínicos fase II en adolescentes sanos y recién nacidos vacunados con BCG [52].

1.7.10 Vacunas con cepas atenuadas de *Mtb*

La construcción de estas vacunas tiene como eje central el desarrollo de cepas atenuadas de *Mtb* en donde se eliminen genes relacionados con la virulencia [59]. Este tipo de vacunas tiene la ventaja de recuperar genes que han sido naturalmente eliminados en BCG, dentro de los cuales se podrían encontrar antígenos inmunodominantes que pueden generar una respuesta inmunológica más fuerte [61]. La construcción de un candidato a vacuna atenuada debe considerar que los mutantes conserven la capacidad de crecer y de sobrevivir en el hospedero para inducir la inmunidad protectora [61], permitir la supervivencia prolongada de los animales de estudio durante los ensayos preclínicos, mostrar baja carga bacilar en los pulmones y bajo número de lesiones patológicas y finalmente demostrar una fuerte respuesta celular T_H1 en modelos con animales [61].

Para diseñar este tipo de vacunas además de tener en cuenta los aspectos anteriormente mencionados, debe contemplar problemas de seguridad en las personas con inmunosupresión y debe ser segura para su uso en humanos. Por esta razón, las mutaciones que se realicen deben contemplar al menos dos deleciones no reversibles e independientes con el fin de evitar reversión hacia cepas silvestres.También se debe considerar eliminar los marcadores de resistencia a antibióticos usados durante la construcción del mutante [59].

En la actualidad, MTBVAC es un candidato de vacuna viva atenuada desarrollado en la universidad de Zaragoza. MTBVAC se caracteriza por tener dos importantes deleciones, la primera de ellas en el gen *phoP* que codifica un regulador transcripcional de genes relacionados con la virulencia y lípidos de pared, y la segunda en el gen *fadD26*, indispensable para la biosíntesis de dimicocerosato de ftiocerol (DIM), un lípido constituyente de la envoltura celular de *Mtb* y reconocido factor de virulencia [60], lo que se produce un genotipo altamente atenuado [59] (Tabla 2).

Varios candidatos de este tipo de vacunas ofrecen buena respuesta por su inmunogenicidad y eficacia en ensayos clínicos, pero ninguno ha demostrado la capacidad de prevenir y erradicar la TB. Para lograr este objetivo se hace necesario desarrollar nuevos candidatos vacunales, para lo que es necesario comprender la patogénesis de la micobacteria y la interacción que tiene con el sistema inmune de su hospedero.

1.8 ATPasas tipo P como blancos de atenuación de *Mtb*

Las ATPasas tipo P conforman una amplia familia de proteínas que permiten el transporte activo de cationes, metales pesados y lípidos a través de la membrana celular usando la energía de la hidrólisis del ATP [58], [62]. De acuerdo a su función como facilitadores del transporte de sustancias, las ATPasas tipo P cumplen un rol fundamental en el mantenimiento de la homeostasis celular, la regulación del metabolismo y la eliminación de iones a concentraciones tóxicas, proporcionando un ambiente crítico para la supervivencia celular. En organismos patógenos como *Mtb* estas proteínas son fundamentales para su supervivencia y virulencia, ya que estos sistemas de transporte les permiten establecer un equilibrio entre la entrada y salida de metales lo que le permite mantener su concentración a nivel de nutrientes [63].

Las ATPasas tipo P interconvierten la energía metabólica en gradientes electroquímicos aprovechados para procesos de captación de nutrientes que pueden ser ligandos de metaloenzimas, sustratos encargados de la señalización celular, además de participar en la homeostasis iónica al remover iones tóxicos de la célula [58], [64], [65]. En este sentido, las ATPasa tipo P protegen a la célula de sustancias tóxicas dentro del fagosoma [5], [66].

El genoma de *Mtb* codifica un amplio número de ATPasas tipo P en comparación con otras micobacterias saprofitas como *M. smegmatis,* lo que sugiere que estas

enzimas cumplen un rol fundamental en la virulencia de la micobacteria causante de la TB [5]. Las ATPasas tipo P reciben esta denominación por la formación de un intermediario fosforilado en un residuo conservado de asparato (Asp) durante su ciclo catalítico [65], [67].

1.8.1 Características estructurales de las ATPasas tipo P

Todas las ATPasas tipo P se caracterizan por contener entre 8-10 segmentos transmembranales (TMS) y un núcleo estructural conservado entre arqueas, procariotas y eucariotas. La mayoría están involucradas en el transporte de cationes a través de los sistemas membranales celulares y subcelulares. Actualmente se han identificado bombas específicas para iones de Na^+, K^+, H^+, Ca^{2+}, Mg^{2+},Cu^+, Cd^{2+}, Ag^+, Cu^{2+}, Co^{2+}, Ni^{2+}, Pb^{2+} y Zn^{2+}, y también para aminofosfolípidos [58], [68]. Todas las ATPasas tipo P reportadas están conformadas por cinco dominios funcionales y estructurales distintos (**Figura 1-7**), entre ellos tres citoplasmáticos (A, actuador; N, unión a nucleótido; P, fosforilación) y dos membranales (T, transporte; S, dominio de soporte específico de la clase). Cada uno de estos dominios tiene una función específica durante cada ciclo catalítico [58]. Primero el dominio N produce una fosforilación en un residuo D (Aspartato) situado en el dominio P; posteriormente, el dominio A produce la defosforilación del residuo D para dejar a la enzima en su estado inicial [58]. Se puede considerar, por lo tanto, que el dominio N actúa como una quinasa, y el dominio A como una fosfatasa que tienen el mismo sustrato. El sitio de fosforilación se encuentra en la región citoplasmática de la proteína, al igual que los sitios de unión al ATP. La región de unión del metal tiene motivos altamente conservados y dependen de la especificidad del catión transportado [58].

En la membrana citoplasmática se ubican entonces los segmentos transmembranales que rodean los sitios de unión de iones en la membrana. Estos segmentos se encuentran conectados a los dominios citoplasmáticos a través de cinco regiones de unión que forman las conexiones estructurales necesarias entre los pasos de liberación de energía en el lado citoplasmático y su conversión a la translocación física de iones a través de la membrana [62].

El dominio P de fosforilación es altamente conservado ya que no contiene inserciones o deleciones significativas y el residuo de Asp fosforilado se ubica en la secuencia conservada (Asp-Lys-Thr-Gly). Las demás secuencias conservadas de este dominio se encuentran involucradas en la unión del ATP en el sitio de fosforilación. El ATP se une a un bolsillo conservado en el dominio N con el residuo de fosfato orientado hacia el residuo de Asp situado en el dominio P [62].

Por su parte el dominio N actúa como sitio de unión a nucleótido y es el dominio más variable entre los dominios citoplasmáticos; sin embargo, la parte funcional es la más conservada, ubicándose dentro de estos residuos la lisina (Lys) que se une al adenosin del ATP dejando expuesto los tres grupos fosfato desde el sitio de unión para fosforilar el dominio P. Este dominio se encuentra insertado dentro del dominio P uniéndose a través de una estructura en forma de bisagra [69], [70], [71].

El dominio A o actuador tiene actividad fosfatasa debido al motivo treonina (Thr) glicina (Gly) y glutámico (Glu), posee además dos o tres secuencias extendidas de unión a los 3 primeros segmentos transmembranales (M1, M2, M3) conectadas en el dominio de transporte T, lo que le confiere cierta flexibilidad y facilidad de rotación [58].

El dominio T o de transporte es el encargado de unir el ion que va a ser transportado por la enzima. Está formado por 6 a 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, es decir, durante la translocación del ión, permitiendo el transporte de distintos tipos de iones que se ubican en la parte media de la membrana [58], [71]. Este dominio tiene motivos altamente conservados que dependen de la especificidad del catión transportado para adaptarse de manera precisa de acuerdo a su carga, radio y geometría [65].

Por último, el dominio S de soporte funciona como una unidad auxiliar para el dominio T, ya que a diferencia de este dominio 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; este dominio a su vez se conserva poco entre las ATPasas tipo P [58], [70].

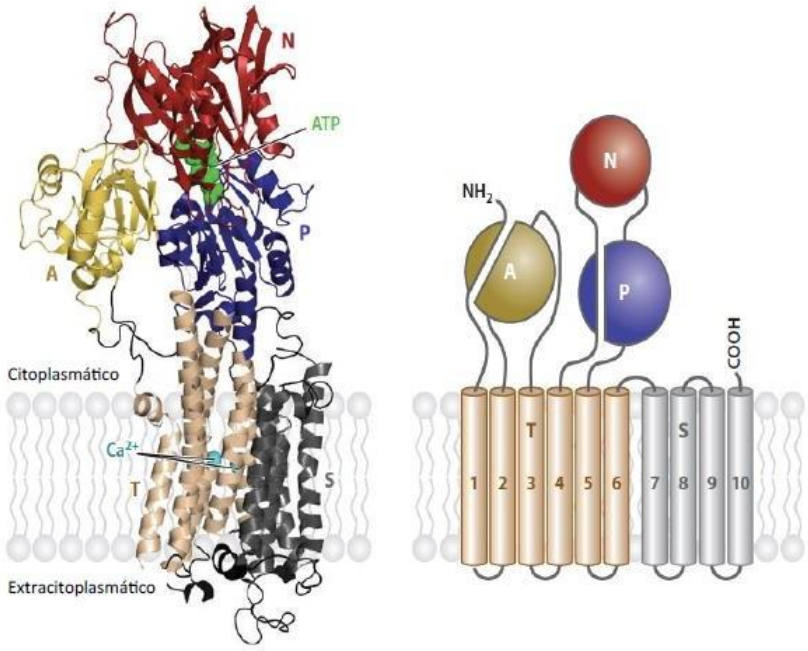


Figura 1-7. Organización estructural de las ATPasas tipo P. Se ilustran los dominios citoplasmáticos (A, P y N) y dominios embebidos en la membrana (T y S). Tomado de Palmgren, 2011 [58].

Las ATPasas tipo P pueden transportar protones, cationes de metales pesados, alcalinos y/o alcalinotérreos. Estas enzimas se caracterizan por formar durante su ciclo catalítico un intermediario fosforilado que no está presente en los demás tipos de ATPasas, involucrando un enlace covalente entre el fosfato del ATP y el residuo de ácido aspártico (Asp) del dominio de fosforilación [67]. Se ha visto que en TB latente disminuye la concentración intracelular de ATP, lo que limita la actividad de las ATPasas en general. Sin embargo, las bombas ATPasas tipo P siguen funcionando de forma activa, por lo que se les considera fundamentales en la persistencia de la infección latente cuando el bacilo tuberculoso se encuentra en un estado no replicativo [5].

1.8.2 ATPasas tipo P de *Mtb*

Las ATPasas tipo P tienen un rol esencial en la regulación de iones metálicos en *Mtb* dentro de las células hospederas, otorgándole al bacilo tuberculoso un amplio espectro de supervivencia dentro del huésped [6]. 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-} [64], [72], 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 el cobre es el cofactor de las oxidasas y superóxido dismutasas, sin embargo son tóxicos en concentraciones altas [73].

Mtb es uno de los microorganismos que presenta mayor número de genes que codifican para ATPasas tipo P, comparado con otras especies del género *Mycobacterium*, además de presentar una mayor expresión de ATPasas tipo P en comparación con cualquier otro transportador de metales [72]. *Mtb* posee un total de 12 ATPasas tipo P de las que probablemente siete son P_{1B} (CtpA, B, C, D,G, J y V) o bombas de metales pesados, tres del tipo P_{2A} (CtpF, H e I), una del tipo P_{1A} o transportador del tipo KdpB y una que no ha sido clasificada [72], lo que sugiere un importante rol de estos transportadores en la supervivencia intracelular [72]. Conocer la expresión de genes de transportadores durante la infección en *Mtb* provee información muy útil para el diseño de nuevas estrategias terapéuticas [72]. Además, se conoce que las ATPasas tipo P son mucho más conservadas en la estructura terciaria que en su secuencia de aminoácidos [5], [64], lo que también establece una información útil en el diseño de inhibidores [64].

Existen 7 ATPasas tipo P de transporte de metales pesados, que incluye a CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ y CtpV, las que pueden transportar Cu^{2+}, Cu^+, Co^{2+}, Ag^+, Hg^{2+}, Cd^{2+}, Pb^{2+} y Zn^{2+}, bombas que están altamente implicadas en la supervivencia intrafagosomal de *Mtb*. 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 infectado es incrementar la concentración intrafagosomal de metales pesados [74].

También se han asignado a CtpE, CtpF, CtpH y CtpI, como bombas de transporte de metales alcalinos y alcalinotérreos, con posible especificidad para Na^+, K^+, Ca^{2+}, H^+ y Mg^{2+}. Es probable que algunas de estas enzimas sean bombas Na^+/K^+ ATPasa y H^+/K^+ ATPasa [5], [74].

Las ATPasas tipo P de *Mtb* que se sobreexpresan en los macrófagos humanos son: CtpA, CtpC, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI y CtpV [5]. Se ha sugerido que CtpF y CtpG se expresan en condiciones de hipoxia, inanición y en presencia de sustancias tóxicas como altas concentraciones de metales pesados 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 toxicas, o cuando el bacilo se encuentra en estado activo o de latencia [5].
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_2O_2 y óxido nítrico, conjuntamente se sobre expresa aproximadamente 60 veces cuando es expuesto a RNS [74]. Finalmente, CtpG, CtpV y CtpC responden a intoxicación por metales pesados [5]. Quitian [75] sugirió que CtpG podría ser una bomba encargada del eflujo de cadmio (Cd^{2+}), por lo que este transportador podría ser considerado un blanco terapéutico y ensayos de actividad ATPasa han revelado que Cd^{2+}, Cu^{2+}, Co^{2+} y Pb^{2+} inducen la actividad de CtpG.

1.8.3 Relación de las ATPasas tipo P con la virulencia de *Mtb*

Diferentes estudios han demostrado que CtpC y CtpD, dos ATPasas transportadoras de metales pesados son necesarias para que se lleve a cabo la infección en modelo de ratón con *Mtb* [5]. La presencia de concentraciones toxicas de metales pesados en macrófagos humanos infectados con *Mtb* ha evidenciado que las bombas del bacilo CtpC, CtpG y CtpV se inducen durante el proceso de infección para la desintoxicación [76], con base a estas evidencias se ha propuesto que estas ATPasas forman parte de un mecanismo de defensa que tiene la bacteria y que se activa para sobrevivir dentro de las células fagociticas humanas cuya función es protegerse contra sustancias toxicas del ambiente intrafagosomal [5].

Investigaciones de Botella y colaboradores; concluyeron que la deleción de CtpC tiene un efecto en la micobacteria ya que la hace más sensible a concentraciones fisiológicas de Zn^{2+}, lo que afecta su capacidad de crecimiento en macrófagos humanos debido a que esta ATPasa está involucrada en el eflujo de Zn^{2+} [76], [77] Por otro lado, Padilla y colaboradores; determinaron que CtpC muestra su máxima actividad en presencia de Mn^{2+} y comprobaron la importancia de esta ATPasa en relación con la virulencia de *Mtb* en ensayos realizados en ratones C57BL/6 usando *Mtb* silvestre y la cepa mutante Δ*ctpC.* Durante la realización de estos ensayos observó una reducción significativa en la viabilidad de la población micobacteriana Δ*ctpC* después de un mes de infección. De acuerdo a estos resultados se sugirió que CtpC está involucrada en la adaptación de la micobacteria al medio intracelular y en la resistencia frente a los mecanismos inmunes del hospedero [78].

Ensayos con otra cepa mutante *ΔctpV* demostraron que la deleción de CtpV reduce la resistencia que ofrece el bacilo frente a los niveles tóxicos de cobre y disminuye la capacidad de *Mtb* para crecer y generar daño en el tejido pulmonar de ratones y cobayos. También observaron que los ratones infectados con este mutante

exhibieron una respuesta inmune disminuida frente a la micobacteria y un aumento en la supervivencia de los ratones infectados en comparación de aquellos infectados con *Mtb* de tipo silvestre, concluyendo de este estudio que CtpV se activa a concentraciones tóxicas de cobre en la micobacteria y que usa esta bomba para mantener intacta su virulencia [80]. Wolschendorf y colaboradores demostraron que CtpV en conjunto con MctB, un exportador de cobre, son necesarios para el mantenimiento de la virulencia de *Mtb* en modelos animales, sugiriendo que la micobacteria responde a un exceso de Cu^{2+} en el ambiente intrafagosomal usando estos sistemas de desintoxicación [77].

De acuerdo a estas investigaciones se ha encontrado que mutaciones en ATPasas exportadoras de cobre tienen un efecto en la reducción de la virulencia y la colonización de la micobacteria debido a que estas ATPasas pueden estar involucradas en la desintoxicación de cobre, metal usado por las células del sistema inmune para intoxicar elementos patógenos, pero la micobacteria hace uso de estas bombas de exclusión para protegerse de la fagocitosis [79].

Otra de las ATPasas estudiadas ha sido CtpD, Raimunda y colaboradores; demostraron la importancia de CtpD un transportador de Co^{2+} y Ni^{2+} en el crecimiento y supervivencia de *Mtb* durante el periodo de infección. Una mutación en el gen *ctpD* exhibió una capacidad reducida de *Mtb* para crecer en pulmones de ratón después de 28 días de infección en comparación con *Mtb* de tipo silvestre[80].

Las investigaciones realizadas sobre el rol de las ATPasas tipo P demuestran que estas bombas cumplen un rol especial en la micobacteria al neutralizar los efectos tóxicos de metales pesados y de esta manera logran que el bacilo sobreviva durante largos periodos de tiempo al interior de las células fagociticas [76].

Como se ha recogido de diferentes investigaciones, las ATPasas tipo P podrían ser blancos de atenuación de la micobacteria, ya que las diferentes mutaciones realizadas sobre estos genes afectan los sistemas de captación de nutrientes y desintoxicación contribuyendo a la atenuación de *Mtb* debido a que estas enzimas podrían ser necesarias para la persistencia del bacilo durante los procesos de infección [5]. Diferentes estudios han sugerido que las cepas que tienen atenuación

en diferentes ATPasas tipo P pueden inducir la apoptosis de macrófagos humanos y de ratón en contraste con las cepas virulentas que tienen la capacidad de inhibir la apoptosis evadiendo la respuesta inmune innata diseminándose la infección [41], [81].

Teniendo en cuenta la importancia de las ATPasas tipo P en el proceso de infección, ctpF es la ATPasa tipo P que muestra un perfil transcripcional más sensible a diversas condiciones de estrés como la presencia de ROS, RNS e hipoxia, demostrando así que este transportador se activa como parte de la estrategia de *Mtb* para responder a las condiciones adversas dentro de los fagosomas en los procesos de infección [74]. Maya y colaboradores a través de diferentes análisis funcionales demostraron que *CtpF* contribuye al eflujo de calcio en las células micobacterianas. Esta hipótesis fue probada mediante construcción de mutantes de *Mtb* defectuosos en CtpF (MtbΔctpF), demostrando que estos acumulan más Ca^{2+} en comparación con células salvajes (*MtbWT)*, por lo que la actividad ATPasa dependiente de Ca^{2+} se ve reducida en las células mutantes. Los ensayos también demostraron que la supresión de CtpF en *Mtb* afecta significativamente la tolerancia de la bacteria al estrés oxidativa y nitrosativo [82].
Por otro lado, ensayos preliminares realizados por nuestro grupo de investigación (Bioquímica y Biología Molecular de las micobacterias de la Universidad Nacional) han demostrado que ctpF es necesario para el crecimiento de *Mtb* en los macrofagos alveolares en modelo murino. Experimentos realizados con cepas mutantes *MtbΔctpF* mostraron que los ratones infectados con la cepa mutante tenían una mayor tasa de supervivencia en comparación con los animales infectados con *MtbWT* en un modelo de TB pulmonar en ratones (Resultados no publicados)

En modelos que simulan falta de nutrientes (una de las principales características del granuloma caseoso en los que puede albergarse el bacilo tuberculoso durante la infección latente), se demostró que los genes que codifican las bombas de

metales pesados CtpC y CtpG se sobreexpresan, mientras que CtpH se suprime en estas condiciones de estrés.

Experimentos *in silico*, realizados por nuestro grupo de investigación han descrito que algunas de las ATPasas son transportadoras de metales alcalinos y alcalinoterreos, tales como Ca^{2+}, K^{+} y/o Cl^{-} que son expresados por diferentes patógenos intracelulares y que tendrian un rol importante en el control de las concentraciones intrafagosomales [77]. En el genoma de *Mtb*, el gen ctpH (Rv0425c) ha sido caracterizado como una posible ATPasa tipo P transportadora de catión metálico, experimentos computacionales han sugerido a CtpH como un posible transportador de metales como Na^{+} , K^{+} y $Ca2^{+}$ [74] por lo que este transportador podría ser de importancia en la regulación iónica y en la viabilidad de *Mtb*.

1.9 Lípidos de la envoltura de las micobacterias

La envoltura celular de las micobacterias como se vio en el aparato "pared celular de las micobacterias" se caracteriza por su alto contenido lipídico, conteniendo dentro de sus conformaciones lípidos extraíbles metil-ramificados que tienen como función la modulación de la respuesta inmune del hospedero y actúan como señaladores del progreso de la infección, estando así involucrados con la virulencia. En la **Figura 1-8** se pueden observar algunos de estos lípidos metil-ramificados.

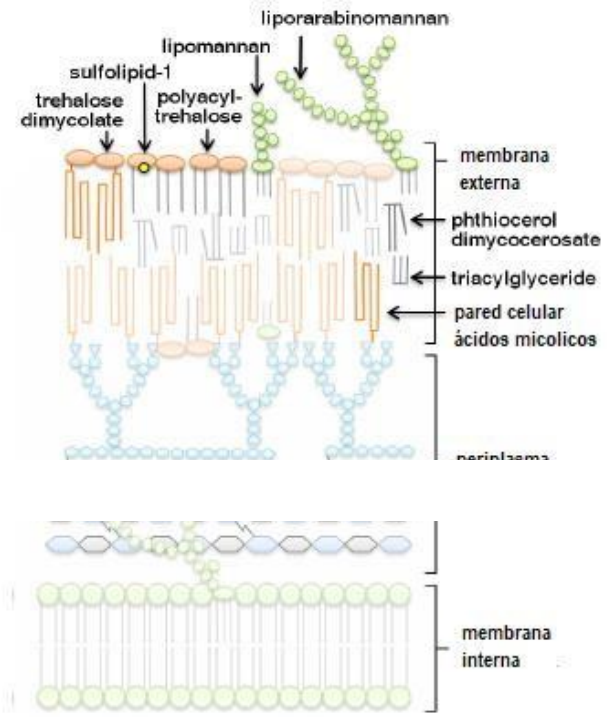


Figura 1-8. Representación esquemática de la envoltura celular micobacteriana.
Tomado y adaptado de Touchette (2017) [83]

En la biosíntesis de algunos de estos lípidos intervienen asociaciones de genes entre los que se destacan los policétidos sintasas (PKS), los acil-AMP o ligasas de acil-CoA, proteínas aciltransferasas asociadas a policétido (Pap) y finalmente enzimas serin hidrolasas.

Los lípidos derivados de policétidos sintasa comprenden varias familias de glicolípidos que contienen un núcleo de trehalosa, como los monomicolatos de trehalosa (TMM) y los dimicolatos de trehalosa (TDM), componentes esenciales abundantes en la envoltura celular micobacteriana, y tienen un rol fundamental en las interacciones hospedero-patógeno [30]. Los derivados de trehalosa: di-acyltrehalosa, tri-acyltrahalosa, poli-acyltrhealosa (DAT, TAT, PAT) y los sulfolípidos (SL) también llamados sulfatidas, están presentes en el MTBC. Los (TPP) se encuentran en micobacterias no tuberculosas como *M. smegmatis*; los lipooligosacáridos (LOS) se han aislado de especies

micobacterianas de rápido y lento crecimiento como *M. kansasii*, *M. smegmatis* y *M. canettii*, pero no se han detectado en las especies del complejo MTBC [30].

Otro grupo de lípidos extraíbles derivados de policétidos incluye familias estructuralmente relacionadas como los dimicocerosatos de tiocerol (DIM / PDIM) y los dimicocerosatos de fenoltiocerol glicosilados también llamados fenolglicolipidos (PGL). Estas moléculas se encuentran en especies patógenas de crecimiento lento como *M. leprae*, *M. ulcerans*, *M. marinum* y en miembros del complejo *Mtb* [84]

Finalmente un tercer grupo de lípidos conformado por glicopeptidolipidos (GPL) que se encuentran en varias especies de micobacterias no tuberculosas como *M. smegmatis, M. abscessus y M. avium* [84].

Específicamente en *Mtb* son característicos lípidos como DIM, PDIM, PGL, SL, DAT, TAT y PAT y la familia recientemente caracterizada de manosil-β-1fosfomicocétidos (MPM) (**Figura 1-9**) sugiriendo que la presencia de estos lípidos guarda estrecha relación con la patogénesis de *Mtb* [85].

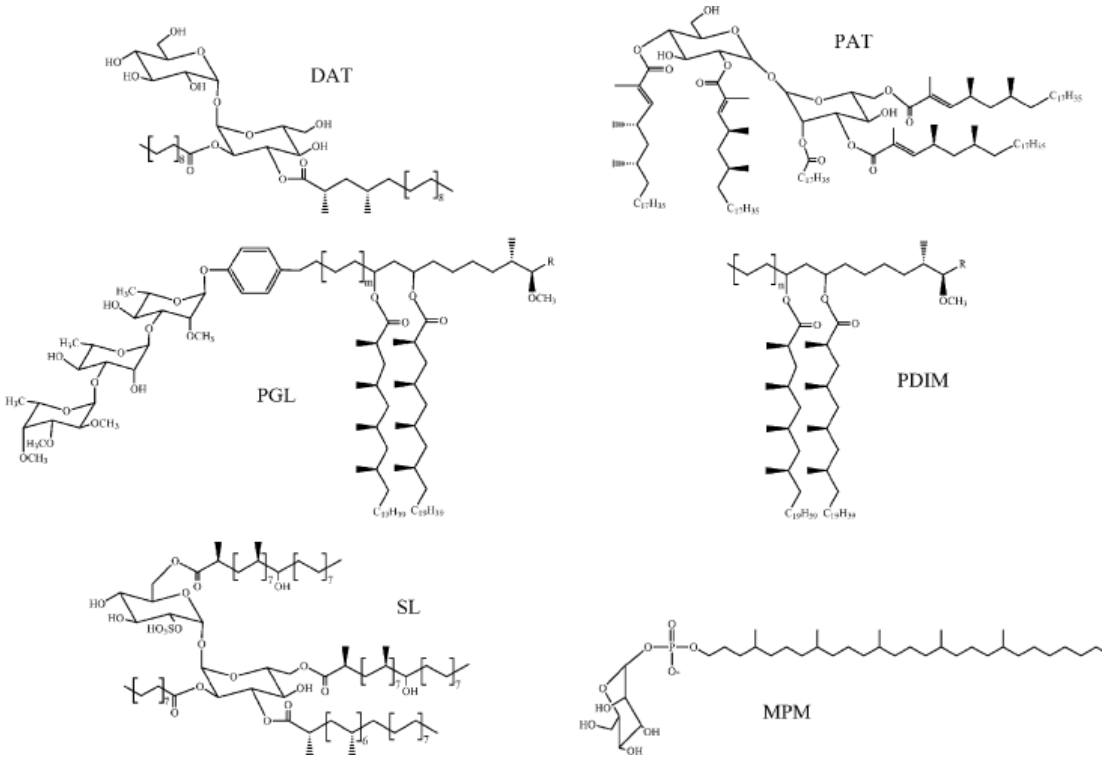


Figura 1-9. Estructuras de algunos lípidos de cadena larga que contienen múltiples ramificaciones de metilo en *Mtb*. SL-I (2, 3, 6,6´-tetraacil α-α´-trehalosa-2´-sulfato). En SL la trehalosa se sulfata en la posición 20 y se esterifica con ácido palmítico y los ácidos fitoceranico e hidroxitioceranico multimetil-ramificados. En DAT (2,3-di-*O*-acillthalosa), la trehalosa se esterifica con ácido esteárico y el ácido micosanoico multimetil-ramificado. En PAT (poliaciltrehalosa), la trehalosa se esterifica con ácido esteárico y los ácidos micolipénicos multimetil-ramificados. En PDIM (dimiocerosatos de tiocerol), el β-diol (resto de tiocerol) de cadena larga se esterifica con dos ácidos micocérosicos; n=10 –11; R = CH_2 - CH_3 o CH_3. El núcleo lipídico de PGL de *Mtb* está compuesto de fenolftiocerol esterificado por ácidos micocérosicos; m= 7–8; R = CH_2-CH_3 o CH_3. El sustituyente trisacárido consiste en 2,3, 4-tri-*O*-metil-α-L-Fucp-(1 3)-α-L-Rhap-(1 3)-2-*O*-metil-α-L-Rhap. Los manosil-β-1 fosfomicoctídos (MPM) predominantes de *Mtb* H37Rv consisten en un fosfoisoprenoide mannosil-β-1– con una cadena C32 4, 8, 12, 16,20-pentametilpentacosilo. Tomado de Jackson 2006 [85].

Muchos estudios *in vivo* e *in vitro* han relacionado el carácter virulento del bacilo tuberculoso y la presencia de estos lípidos complejos. Por ejemplo, se ha demostrado que SL es capaz de inhibir la fosforilación oxidativa mitocondrial, evitando la fusión fagosoma.-lisosoma en macrófagos cultivados, también se ha especulado que modula la respuesta oxidativa y disminuye la secreción de citocinas de monocitos y neutrófilos humanos [85]. En 2001, Sirakova y colaboradores; construyeron un mutante atenuado totalmente defectuoso en la síntesis de SL lo que les permitió cuantificar la contribución de este lípido a la patogénesis en diferentes células y modelos animales y encontraron que la deficiencia de SL no altera significativamente la replicación, la persistencia y la patogenicidad de *Mtb* en ratones y cobayas o en macrófagos cultivados [86].

1.9.1 Los dimicocerosatos de tiocerol (DIM-PDIM) y su relación con la virulencia de *Mtb*

El PDIM se caracteriza por ser un lípido polar en comparación con los demás glicolípidos de la pared micobacteriana, ya que está conformado por un núcleo lipídico conservado compuesto de dimicocerosatos de fenoltiocerol. A su vez este puede estar unido a cuatro azúcares O-metilados dependiendo de la especie

micobacteriana, (**Figura 1-10**). Entre sus funciones, el PDIM sirve como anti-permeablilizante y protector contra agentes antimicrobianos [85]

La elucidación del genoma de *Mtb* permitió establecer que un locus de genes involucrados en su patogenicidad era a su vez responsable de la biosíntesis de DIM. Este locus (50Kb) contiene 13 genes y se subdivide en tres unidades transcripcionales, esta región contiene genes que codifican un transportador MmpL, un transportador tipo ABC (drrABC) y una lipoproteina (lppX) [87]

La biosíntesis de DIM involucra los genes *ppsA-E* que codifican un policétido sintasa encargado de la síntesis del tiocerol y el fenoltiocerol mediante elongación de cadenas de acillo de 20 y 22 carbonos, o desde cadenas conteniendo un residuo fenólico y tres unidades de maloniles CoA y dos de metilmalonilCoA. Un gen *mas* que codifica un policétido sintasa y produce ácidos micocerocicos luego de dos o cuatro ciclos de elongación con unidades de metilmalonilCoA de ácidos grasos de 18 o 20 carbonos. Finalmente el gen *fadD28* que codifica para una acil-CoA sintasa que está involucrada en la transferencia y liberación del ácido micocerocico [87].
Entre los demás genes del locus se encuentra: 1) genes que codifican para transportadores similares a los tipos ABC (drrA, drrB y drrC), 2) un gen que codifica para el gen *mmpL7* perteneciente a la familia de los transportadores de la familia RND, que junto con el transportador drrC transloca y localiza a los DIM fuera del citoplasma, 3) un ORF que codifica para un acil-CoA sintasa, Y 4) el gen fadD26 y finalmente un gen papS que codifica para una proteína aún con función desconocida [87].

Figura 1-10. Modelo de la estructura del PDIM. Se ilustran los sitios de incorporación del ácido propiónico por la acción de los productos de los genes *ppsA-E* y *mas* y el diagrama esquemático y transcripcional del locus de DIM. Tomado y modificado de Camacho 2001 [87]

Camacho y colaboradores construyeron mutantes de los genes *fadD26*$^-$, *fadD28*$^-$, *mmpL7*$^-$ y *drrC*$^-$, incapaces de sintetizar o translocar los DIM, además de dar mayor permeabilidad de la pared y sensibilidad a detergentes, sugieriendo que estos lípidos no solo están relacionados con la virulencia, sino también en la conformación y la permeabilidad de la envoltura celular. De acuerdo a estos estudios, la integridad de la pared puede ser uno de los mecanismos moleculares por los cuales los DIM están involucrados en la virulencia de *Mtb* [87].

PDIM es un lípido derivado de DIM, que posee un radical O-metilado en la cadena principal. PDIM fue uno de los primeros factores de virulencia identificados en *Mtb* y relacionado con la evasión del bacilo al fagosoma, resistencia a RNS e invasión de macrófagos. Sin embargo, muchas de estas funciones aún no están totalmente esclarecidas y se tiene gran incertidumbre sobre los mecanismos moleculares de la regulación de la virulencia mediada por PDIM de *Mtb* [88].

Por otra parte, PDIM aumenta el proceso de necrosis celular, se ha demostrado que contribuye al escape fagosómico de *Mtb* y a la inducción de autofagia de la célula huésped.

Mutantes en el transportador *mmpL7* no tienen la capacidad de transportar PDIM, y muestran disminución significativa de la autofagia en células infectadas indicando que PDIM tiene un rol importante en la inducción de la autofagia en células infectadas con *Mtb* [88].

PDIM por sí solo no influye en el escape de *Mtb* del fagosoma, este proceso también depende de la formación de poros en la membrana, ESX-1 secreta el antígeno ESAT-6, una proteína involucrada en la ruptura fagosomica y en la muerte celular, sugiriendo que si bien ESAT-6 es fundamental para que *Mtb* tenga acceso al citosol, PDIM trabaja sinérgicamente con esta proteína para ayudar al bacilo a escapar del fagosoma [89].

1.9.2 Transporte de lípidos en las micobacterias: proteínas MmpL y MmpS

Las proteínas MmpL pertenecen a la familia nodulación-división-resistencia (RND), proteínas de membrana que transportan activamente una amplia variedad de compuestos a través de la envoltura bacteriana haciendo uso de la fuerza protón motriz (H^+ o Na^+) [90], [7]. Las proteínas RND son una familia de bombas de resistencia a múltiples fármacos que reconocen y median el transporte de una gran diversidad de compuestos catiónicos, aniónicos o neutros, incluyendo diversos fármacos, metales pesados, disolventes alifáticos y aromáticos, sales biliares, ácidos grasos, detergentes y colorantes [91].

Las proteínas RND están presentes en todos los reinos de la vida. En bacterias Gram negativas, las proteínas RND funcionan en combinación con proteínas accesorias que incluyen una proteína de fusión de membrana periplásmica (MFP) y el factor de membrana externa que forma canales. Este sistema de transporte tripartito permite la extrusión de sustratos a través de las membranas interna y externa al medio externo [91], [92].

Las proteínas transportadoras de membrana MmpL (Mycobacterial membrane protein Large) tienen un papel importante en la exportación de lípidos de *Mtb* desde el interior celular. Estas proteínas trabajan estrechamente en la exportación eficiente de lípidos y / o la exportación de los precursores para la biosíntesis de los mismos; sin embargo, sus mecanismos moleculares no están plenamente definidos. Las MmpL también están implicadas en la secreción de un tipo de sideróforo denominado micobactinas, que se unen con alta afinidad al hierro y lo entregan a la micobacteria a bajas concentraciones de este elemento [30], [93]. Las proteínas MmpL también pueden contribuir a los procesos de desintoxicación, mediante la exportación de una amplia gama de compuestos, incluidos los medicamentos y antibióticos [94].

Todas las micobacterias expresan genes *mmpL*, pero su número puede variar entre especies. El genoma de *Mtb* contiene 14 genes *mmpL* (Tabla 3); entre ellos, *mmpL6* codifica un transportador truncado, *mmpL13a* y *mmpL13b* que surgen probablemente de un único gen ancestral que se ha dividido en dos marcos abiertos de lectura, lo que sugiere que estos genes no tienen función específica. Cepas de *Mtb* mutantes en el gen *mmpl7* evidencian su papel en el transporte de (DIM), [7], [95]. También se conoce que *mmpL8* y *mmpL10* están involucrados en el transporte de SL y PAT, respectivamente [96], [97] y que *mmpL3*, es el único gen *mmpL* esencial en *Mtb,* ya que se requiere para el transporte de micolatos [91], [98]. Recientemente, se reportó que MmpL11 media la exportación de monomeromicolil diacilglicerol (mmDAG) y de un éster de micolato a la pared celular en *M. smegmatis*. Al complementar una cepa mutante de *M. smegmatis* con *mmpL11* de *Mtb,* se restauró la exportación de mmDAG, lo que sugiere que MmpL11 desempeña un papel similar en ambas especies [99]. Finalmente, MmpL4 y MmpL5 forman sistemas de exportación del sideróforo micobactinas involucrado en la exportación y el reciclaje de carboxi- micobactinas solubles (cMBT) y micobactinas asociadas a las células (MBT). El papel de otras proteínas MmpL en *Mtb* aún no se ha establecido [100], [101].

De acuerdo a lo anterior, queda claro que los transportadores MmpL poseen una amplia gama de posibles sustratos, como lípidos y ácidos micólicos presentes en la envoltura micobacteriana, algunos de los que han demostrado ser liberados de la envoltura micobacteriana dentro de los fagosomas de macrófagos infectados. De hecho MmpL7 y MmpL8, están implicados en el transporte de lípidos ramificados con metilo que contienen carbohidratos o policétidos presentes en la pared celular de *Mtb* [30].

Tabla 1-3. Genes de MmpL y MmpS que codifica Mtb H37Rv. Tomado y adaptado de Chalut 2016 [30]

Nombre del gen	Función
mmpL1	Función desconocida. Localizado cerca a *pks6*
mmpS1	
mmpL2	Función desconocida
mmpS2	
mmpL3	Exportación de TTM / TDM
mmpS3	Función desconocida
mmpL4	Sistema de exportación de sideróforos
mmpS4	
mmpL5	
mmpS5	
mmpL6	Función desconocida
mmpL7	Exportación DIM / PDIM
mmpL8	Exportación de SL
mmpL9	Función desconocida
mmpL10	Exportación DAT / PAT

mmpL11	Exportación mmDAG y cera de éster de micolato
mmpL12	Exportación LOS
mmpL13a	Función desconocida
mmpL13b	

1.9.3 Proteína MmpL7 de *Mtb*

MmpL7 es una proteína de 920 aminoácidos con una masa molecular de 95,1 kDa, que contiene 12 dominios transmembrana (TMD) y dos grandes dominios hidrofílicos extracitoplásmicos: dominio 1 y dominio 2 característico de las bombas de eflujo RND [102]. El dominio 2 interacciona con un fragmento de 373 aminoácidos de PpsE, la enzima requerida para el paso final de la síntesis de tiocerol [103] (Figura 11).

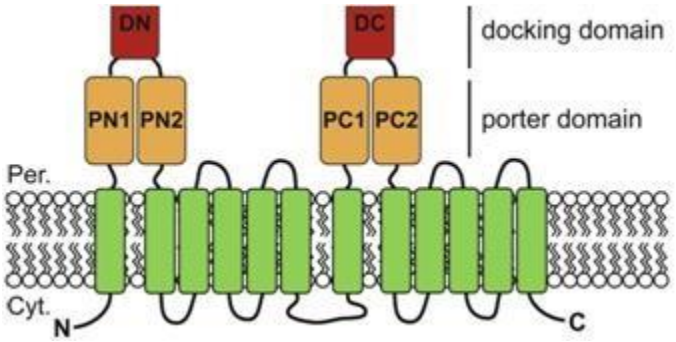


Figura 1-11. Representación esquemática de la organización topológica de los transportadores canónicos RND Las 12 hélices transmembranales se representan en color verde. La región periplásmica se conforma en un dominio compuesto de 4 subdominios (PN1 y PN2, PC1 y PC2) y un dominio de acoplamiento compuesto de 2 subdominios (DN) y (DC). Tomado y adaptado de Chalut 2016 [30].

En este sentido, se ha propuesto que MmpL7 interactúa con la maquinaria sintética PDIM para formar un complejo que sintetiza y transporta coordinadamente PDIM a través de la membrana celular. Sin embargo, la ausencia de MmpL7 no tiene implicaciones en la activación ni en la inhibición de la síntesis de PDIM [103]. Se conoce que las proteínas MmpL actúan no solo como transportadoras sino como mecanismos de andamiaje para acoplar la síntesis y la secreción de lípidos policétidos [103].

MmpL7 está presente en el mismo grupo que codifica las enzimas responsables de la biosíntesis de los fragmentos de ftiocerol (ppsA-E) y ácido micoacérico (*mas*) de PDIM (**Figura 1-12**) [104]. Un mutante de *mmpL7* mostró acumulación intracelular de PDIM, demostrando nuevamente su papel en la translocación de lípidos hacia la superficie de la pared celular [7]. MmpL7, al parecer transporta tanto PDIM, como a un glicolípido fenólico expresado sólo en un subconjunto de cepas de *Mtb* altamente virulentas [105]. Tanto DIM como PDIM requieren para su exportación desde la membrana citoplasmática a DrrABC, un complejo que funciona como antiportador dependiente de ATP, que probablemente es responsable de la translocación del sustrato a través de la membrana, que trabaja junto con MmpL7. Por lo tanto, un defecto en cualquiera de estos transportadores conlleva a la acumulación de PDIM y de DIM en el citoplasma (**Figura 1-12**) [44].

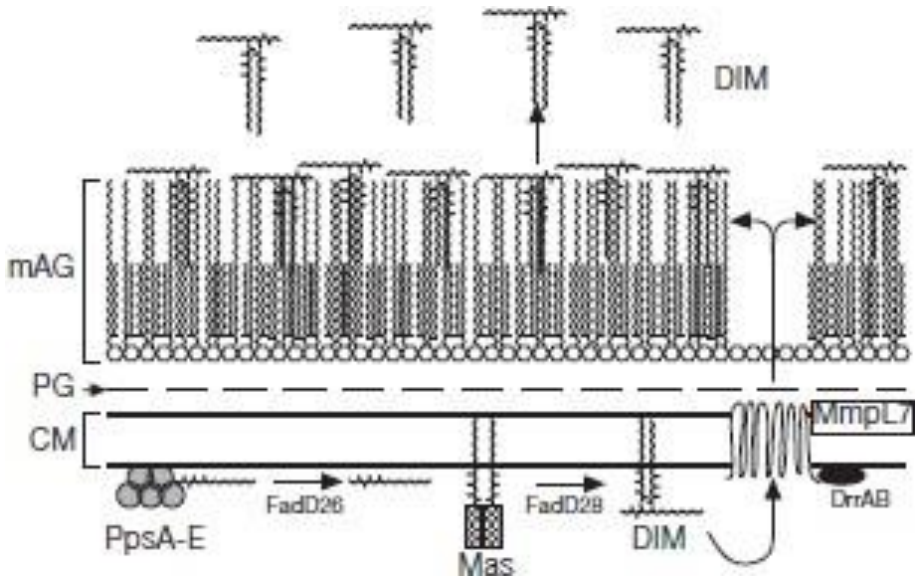


Figura 1-12. Modelo de síntesis y exportación de DIM. La síntesis de DIM es compleja y requiere la acción de las enzimas Pps similares a policétido-sintasa, Mas, al menos una proteína similar a acil-CoA sintasa y MmpL7. Tomado de Cox 1999 [7].

Camacho y colaboradores demostraron que los transportadores MmpL7 y DrrABC son necesarios para la correcta localización de PDIM, mutantes *drrC* y *mmpL7* producen PDIM con estructuras idénticas a las de los PDIM sintetizados por la cepa de tipo salvaje, sugiriendo que ambas proteínas cooperan en la translocación de PDIM y que no actúan como transportadores independientes translocando diferentes partes del lípido [87].

1.10 Recombinación en micobacterias

La manipulación genética de *Mtb* suele ser complicada debido a que es una bacteria de lento crecimiento, posee baja eficiencia de transformación y presenta altos niveles de recombinación ilegitima. Por lo tanto, la deleción de genes de *Mtb* suele ser un proceso largo y complicado. La falta de fagos transductores que infecten a *Mtb* complica la construcción de cepas mutantes isogénicas, sin embargo, la caracterización y el análisis de micobacteriófagos ha proporcionado herramientas moleculares para la construcción de mutantes de micobacterias [106].

1.10.1 El micobacteriófago Chec9c

Tanto en micobacterias de crecimiento lento y rápido, el micobacteriófago Chec9c puede aumentar en gran medida las frecuencias de recombinación homóloga, facilitando las mutaciones puntuales, las deleciones pequeñas, la clonación *in vivo*, la mutagénesis de cromosomas artificiales bacterianos y construcción de bibliotecas genómicas. Se han descubierto genes que codifican proteínas del sistema λRed RecE y RecT que son homologas al profago Rac de *E. coli*. RecE y RecT son análogos funcionales de las proteínas de recombinación de fago λ Red, Exo (exonucleasa) y Beta (recombinasa). Estas enzimas de recombinación actúan de manera coordinada para promover altos niveles de recombinación in vivo en *E. coli* y bacterias relacionadas utilizando regiones cortas de homología, facilitando el desarrollo de la técnica genética llamada 'recombinación' [107].

Para entender el mecanismo recombinación que lleva a cabo el micobacteriófago Chec9c se hace necesario explicar cómo funcionan sus proteínas homologas en el sistema λRed y el profago Rac de *E. coli*. La recombinación en *E. coli* usando el sistema λRed involucra tres proteínas: Exo, Beta y Gam codificadas por fagos, mientras que el sistema del profago Rac codifica solamente RecE y RecT equivalentes en función a λExo y Beta [7]. Tanto Exo como RecE son proteínas con acción exonucleasa 5´--3´que degradan una sola cadena de ADN lineal de cadena doble (ADNds), exponiendo una sola cadena de ADN de cadena simple (ADNss) donde se unen las proteínas Beta o RecT. El evento de recombinación se origina entonces por la asociación de estos complejos con las dianas cromosómicas o plasmídicas residentes dentro de las células mediante el emparejamiento de secuencias complementarias, intercambio de cadenas o invasión de cadena. Las proteínas λ Beta y RecT hacen parte de una gran familia de proteínas de recocido de ssDNA, denominado (SSAP). Finalmente la tercera proteína en el sistema λ, Gam, aumenta las frecuencias de recombinación uniéndose a la subunidad RecB de RecBCD e inhibiendo la degradación de los sustratos de dsDNA [107].

La región amino (N) -terminal de RecE que está ausente en Che9c gp60 no es necesario para la actividad de la exonucleasa RecE51. Che9c gp61 comparte un 29% de identidad de aminoácidos con *E. coli* RecT, y por lo tanto es claramente un miembro de la superfamilia de SSAPs pero con una extensión C-terminal más larga (**Figura 1-13**). Aunque Che9c gp60 y gp61 son parientes lejanos de RecE y RecT y las proteínas λ Exo y Beta, poseen funciones bioquímicas similares. Che9c gp60 tiene actividad de exonucleasa *in vitro* que depende de la presencia de extremos de dsDNA, y Che9c gp61 se une a ssDNA corto (20 nucleótidos) así como a sustratos de dsDNA en ausencia de Mg^{2+} [106].

La expresión de gp60 / gp61 en *M. smegmatis* y *Mtb* aumenta sustancialmente la recombinación homóloga de tal manera que aproximadamente 90% de las colonias recuperadas son los mutantes de reemplazo génico deseados, la facilidad para obtener estos mutantes requiere segmentos desde 50 pb de homología de ADN, y los sustratos mutagénicos construidos por PCR pueden introducirse mediante electroporación en cepas de micobacterias que expresan las proteínas de recombinación [108].

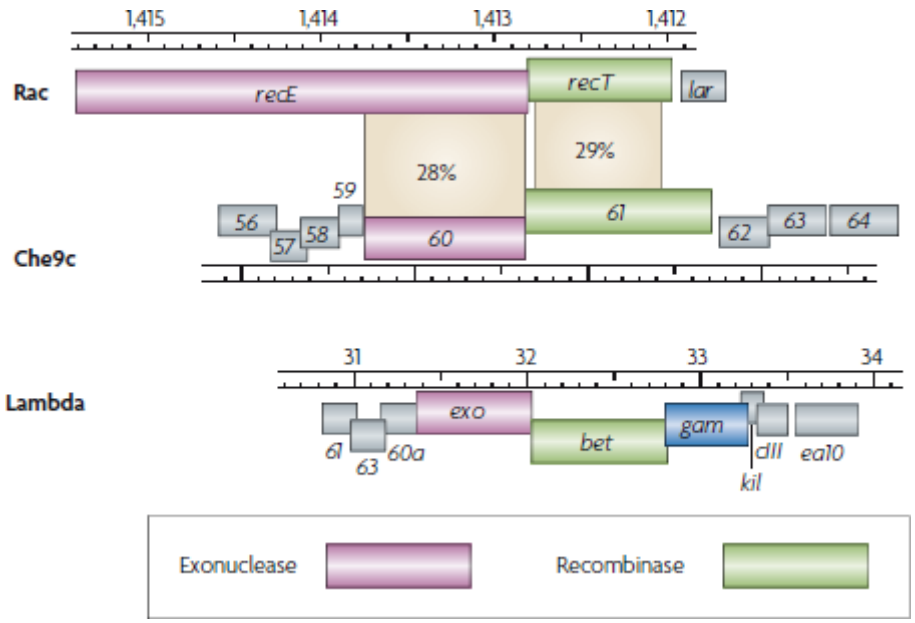


Figura 1-13. Proteínas de recombinación codificadas por micobacteriófagos Los productos génicos del Micobacteriofago Che9c 60 gp60 y gp61 son homólogos del profago Rac que codifican proteínas RecE y RecT en *Escherichia coli*. Las proteínas de recombinación y λRed no están estrechamente relacionadas con las proteínas de micobacteriófagos o las proteínas RecE o recT. Ninguno de los micobacteriófagos o del profago Rac de *E. coli* codifica un homólogo λ Gam. Tomado y editado de van Kessel 2008 [107].

1.10.2 Sustrato de intercambio alélico (AES)

Las cepas de micobacterias pueden recombinarse tanto con sustratos de dsDNA como de ssDNA. Para ello se hace necesario contener un plásmido extracromosómico en el que los genes de recombinación de fagos pueden estar bajo el control de un promotor de acetamidasa que tiene un sitio de unión al ribosoma (RBS) haciendo que el promotor se ubique en el codón de inicio de un gen en el sitio NdeI dando lugar a una fusión traslacional a este RBS. Dicho modelo fue propuesto por van Kessel para la recombinación inducible por promotores en cepas de lento crecimiento como *Mtb.*

Para obtener niveles óptimos de recombinación se usan derivados de plásmidos que expresan de forma regulada los genes Che9c 60 y 61; por ejemplo, el plásmido

pJV53 (**Figura 1-14**), que es de utilidad para construir mutantes con reemplazo de genes que pueden obtenerse mediante la electroporación de sustratos de ADNds lineal en cepas recombinantes de *M. smegmatis o Mtb* [8] (**Figura 4-1**). Para este fin, se construye un sustrato de intercambio alélico o AES que contiene regiones de homología corriente arriba y corriente abajo del gen diana y que flanquean un casete de resistencia antibiótica. Durante el evento de recombinación la proteína gp61 puede unirse a regiones cortas de ssDNA, aumentando la frecuencia de recombinación cuando se usan fragmentos con 500pb de homología y se usa una cantidad desde 100ng de AES linealizado [7] (**Figura 1-14**).

Para la generación del AES se puede partir de fragmentos obtenidos por PCR o de fragmentos obtenidos a partir de la digestión con enzimas de restricción. Los AES también se pueden diseñar para desmarcar posteriormente mutantes; por ejemplo, al incluir sitios resolvase γδ que flanquean el casete de resistencia a antibióticos [107].

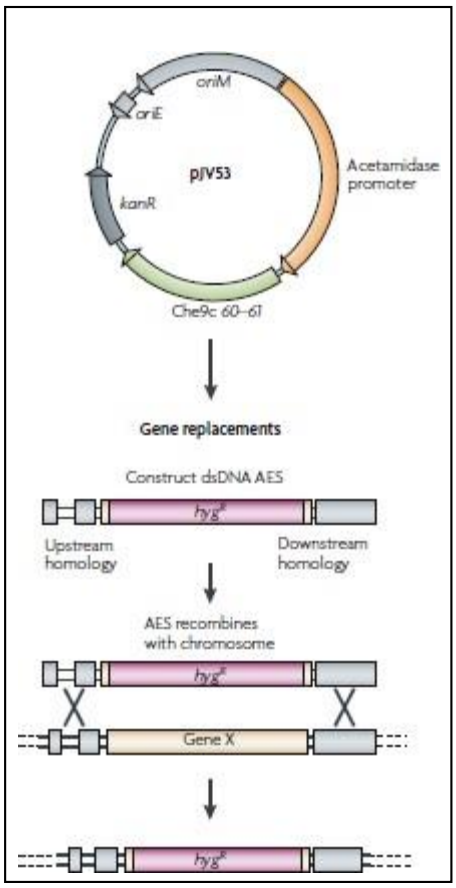


Figura 1-14. Estrategia para la recombinación micobacteriana .El plásmido pJV53 expresa productos del gen Che9c 60 gp60 y gp61 para facilitar la recombinación de ADN bicatenario (dsDNA). La eliminación de genes se realiza mediante el reemplazo de genes específicos con un sustrato de intercambio alélico (AES) lineal de ADNds que contiene 500 pb de homología con el locus diana que flanquea un gen de resistencia a antibióticos (por ejemplo, resistencia a higromicina (hygR)). Tomado y editado de van Kessel 2008 [107].

2. Hipótesis experimental

Para la identificación de dianas potenciales de atenuación es indispensable conocer los mecanismos que *Mtb* utiliza para sobrevivir y persistir dentro de la célula hospedadora. Las ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos/alcalinotérreos y/o metales pesados podrían ser dianas claves para la viabilidad y virulencia de *Mtb* [58]. También está demostrada la implicación de la proteína transportadora MmpL7 en la biosíntesis de los factores de virulencia PDIM y DIM de *Mtb*. La deleción del gen *mmpL7* también supondría una disminución de la patogenicidad o virulencia en el bacilo tuberculoso.

Al remover en *Mtb* dos genes no relacionados, individualmente implicados en la virulencia y metabólicamente independientes, existiría muy baja probabilidad que el bacilo tuberculoso por mutaciones naturales recupere su virulencia.

En este sentido un mutante doble de *Mtb* en el gen *mmpL7* implicado en el transporte y biosíntesis de PDIM, y una ATPasa tipo P implicada en la homeóstasis iónica, además de ser un mutante atenuado que difícilmente recuperaría naturalmente su virulencia, podría además ser un candidato a estudio en fases preclínicas y clínicas durante el desarrollo de una vacuna atenuada contra la TB.

3. Objetivos

3.1 Objetivo general

Diseñar y poner en marcha una estrategia para la mutación del gen *mmpL7* y para el desmarcaje de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* previamente mutadas en ATPasas tipo P de membrana plasmática

3.2 Objetivos específicos

- Construcción de un sustrato de intercambio alélico para obtener un mutante de *Mycobacterium tuberculosis* defectivo en el gen *mmpL7.*

- Transformación de una cepa de recombinería de *Mtb* con un sustrato de intercambio alélico del gen *mmpL7*.

- Diseñar y aplicar una estrategia para el desmarcaje de un mutante de una ATPasa tipo P de *Mtb* de utilidad en la construcción de un doble mutante

4. Materiales y métodos

El desarrollo metodológico de la presente investigación se dividió principalmente en técnicas microbiológicas y de biología molecular, que responden a los objetivos propuestos.

4.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas empleadas y generadas en este trabajo de investigación (Tabla 4) se conservaron como stocks glicerinados a -80°C. *E.coli* fue cultivada con agitación en medio Luria-Bertani (LB) caldo o agar, a 37°C durante 12-24 h. Aquellas cepas que contenían plásmidos fueron inoculadas en medio suplementado con el antibiótico adecuado a la siguientes concentraciones: ampicilina (Amp) 100 µg/mL, Hygromicina (Hyg) 100 µg/mL y kanamicina (Km) 25 µg/mL; los medios sólidos se prepararon sin NaCl. En los ensayos que se utilizó la selección blanco-azul por acción de la β-galactosidasa, los medios de cultivo se suplementaron con 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-galactopiranosido (X-Gal a 80 µg/mL) e isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG a 0,5 mM).

Mtb H37Rv se cultivó en medio Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de OADC (Albumina 0.5%, dextrosa 0.2%, catalasa 0.004% y ácido oleico 50 µg/mL) a 37°C con agitación para el crecimiento y replicación de la bacteria en incubación. Se cultivó también la bacteria en medio sólido Middlebrook 7H10 o 7H11 –OADC sin agitación durante 4-5 semanas. Cuando se hizo necesario se empleó el medio sólido con: Gm (10 µg/mL), para hacer la selección de los mutantes atenuados desmarcados e Hyg 50 µg/mL y Km 20 µg/mL para la selección del mutante con AES incorporado.

Tabla 4-1. Cepas empleadas durante la investigación. [1]Abreviaturas: RecA-Recombinasa; endA-endonucleasa; str-estreptomicina; chx-cicloheximida; cb-

carbenicilina; tet-tetraciclina; hyg-higromicina; Gm-gentamicina; Km-kanamicina; hyg^{R*} Resistencia antibiótica generada por el plásmido no por la cepa.

Cepa	Características[1]	Referencia/fuente
	E. coli	
E. coli JM109	*recA*$^{-}$ deficiente en actividad β-galactosidasa	Life Technologies [9]
***E.coli* HB101**	str^{R}, $RecA^{-}$, $endA^{+}$, actividad γδ negativa	ATCC catalogo [10]
	M. smegmatis	
$mc^{2}155$Δ*msmeg_5014*: pGH542	Micobacteria no patógena de crecimiento rápido,(transformada con el plásmido pGH542) tet^{R}	Presente estudio
	M. tuberculosis	
***M. tuberculosis* H37Ra**	Micobacteria avirulenta de referencia de crecimiento lento, amp^{R}, chx^{R}, cb^{R}	Zheng, 2008
***M. tuberculosis* H37Rv: pJV53**	Cepa de recombinería (transformada con el plásmido pJV53) ampR, chxR, cbR, KmR	Presente estudio
***M. tuberculosis* H37Ra ΔctpF: pCG124**	Cepa sin hyg^{R} transformada con el plásmido pCG124 (chx^{R})	Presente estudio
***M. tuberculosis* H37Ra ΔctpH: pJV53:pWM19**	Cepa sin hyg^{R} transformada con el plásmido pWM19 (Km^{R},Gm^{R}, hyg^{R*})	Presente estudio
***M. tuberculosis* H37Rv ΔmmpL7:**	Cepa mutante (transformada con AES mmpL7) Hyg^{R}	Presente estudio

4.2 Construcción de iniciadores

Los iniciadores (Tabla 5) se diseñaron con la ayuda de los programas GeneRunner [109] y A Plasmid Editor – ApE [110]. El diseño de los iniciadores incluyó las siguientes características: longitud entre 18 y 29 nucleótidos, %GC entre 50 y 60 %, Tm entre 55 y 71 °C, garantizando que la secuencia diana esté solo una vez en el molde, evitando las auto-complementariedades y la formación de dímeros. Adicionalmente se buscó en su extremo (3') la presencia de una G o C, o GC, CC, CG, GG, para evitar la apertura de los extremos e incrementar la eficiencia de anillamiento.

Los iniciadores usados para las clonaciones dirigidas se diseñaron introduciendo los sitios de restricción adecuados teniendo en cuenta que estuvieran presente en el sitio múltiple de clonación (MCS) del vector y ausentes en el gen clonado. El sitio de restricción en los iniciadores se encuentra en su extremo 5', pero para mejorar la eficiencia de digestión por parte de la enzima de restricción se adicionaron cuatro T en este mismo extremo, para que la diana de restricción quedara más lejos del extremo del iniciador. En **Figura 7-1**, se muestran los mapas de los vectores usados en el presente estudio, y la lista de iniciadores utilizados en el estudio se muestra en la Tabla 5.

4.3 Construcción del AES

La construcción del sustrato de intercambio alélico (AES) tuvo como objetivo la producción de una mutación defectiva en el gen *mmpL7* de *M. tuberculosis* H37Rv mediante la técnica de recombinación [108]. Para la construcción del AES de *mmpL7 se* usó como marcador de selección un cassette de resistencia a Hyg(Hyg^R) siguiendo la estrategia de doble clonación en donde las regiones corriente arriba y abajo del gen *mmpL7* son insertas en el vector pYUB854, que a su vez posee un cassette Hyg^R flanqueado por sitios γδ resolvasa y MCSs (**Figura 4-2**).

Para obtener el sustrato de intercambio alélico (AES) por la metodología de clonación doble en el vector pYUB854 (**Figura 7-1**), los iniciadores diseñados amplifican secciones de aproximadamente 500 pb corriente arriba y abajo del gen *mmpL7* (**Figura 4-2**) con sitios de restricción para la clonación dirigida dentro de los sitios múltiples de clonación (MCS I) en el vector pYUB854.

4.3.1 Obtención de amplimeros para obtención de AES

A partir de DNA genómico de *Mtb* H37Ra se hicieron las amplificaciones de las secciones A y B del gen *mmpL7*. La PCR para amplificar la sección A del gen

mmpL7 (región corriente arriba) flanqueada por los sitios de restricción KpnI y BspHI se hizo utilizando los iniciadores up dir mmpl7/ up rev mmpl7 (tabla 5). Por su parte, la PCR para amplificar la sección B (región corriente abajo) flanqueada por los sitios de restricción *HindIII* y *XhoI* se hizo con los iniciadores usando mmpL7 Down dir y mmpL7 Down rev. Ambos fragmentos se clonaron en el vector lanzadera pYUB854. Las amplificaciones se hicieron con la enzima *Taq* DNA Polymerasa (Thermo Fisher) utilizando las condiciones de reacción mostradas en la Tabla 7. Los productos obtenidos por PCR fueron purificados con el kit *FavorPrep Gel/PCR Purification Mini Kit* (Favorgen) siguiendo las especificaciones del proveedor. La cuantificación de ADN se realizó en nanodrop (thermo scientific™ nanodrop 2000 and 2000c), y su visualización a través de electroforesis en gel de agarosa al 0,7-2 % en buffer TAE (Tris, acetato y EDTA) y visualizados por tinción con HydraGreen™ (Protocolo 1).

4.3.2 Clonación de regiones genómicas corriente arriba y corriente abajo del gen *mmpL7.*

Para la obtención del AES fue necesario producir los plásmidos intermedios pVVG1, pVVG2, pVVG3 y pVVG4, en los que primero se hizo la subclonación de la sección corriente arriba y abajo del gen *mmpL7* en el vector tipo T pGEMTY- Easy (pVVG1 y pVVG2), seguida de la clonación de la sección corriente arriba del gen *mmpL7* entre los sitios KpnI y BpHI del vector pYUB854 (pVVG3) y finalmente de la clonación de la sección corriente abajo del gen *mmpL7* se entre los sitios XhoI y HindIII (pVVG4). El plásmido pVVG1 contiene la sección corriente arriba del gen *mmpL7* entre los sitios BspHI y KpnI en el vector pGEMTY-easy, por otro lado, el plásmido pVVG2, contiene la sección corriente abajo del gen, entre los sitios XhoI y HindIII, en el vector pGEMT-easy. El plásmido intermedio pVVG3 contiene la sección corriente arriba del gen en el vector lanzadera pYUB854 y finalmente el plásmido pVVG4 que contiene las dos secciones del gen *mmpL7* en el vector pYUB854 entre los sitios BspHI y KpnI y XhoI y HindIII respectivamente (**Figura 4-1**).

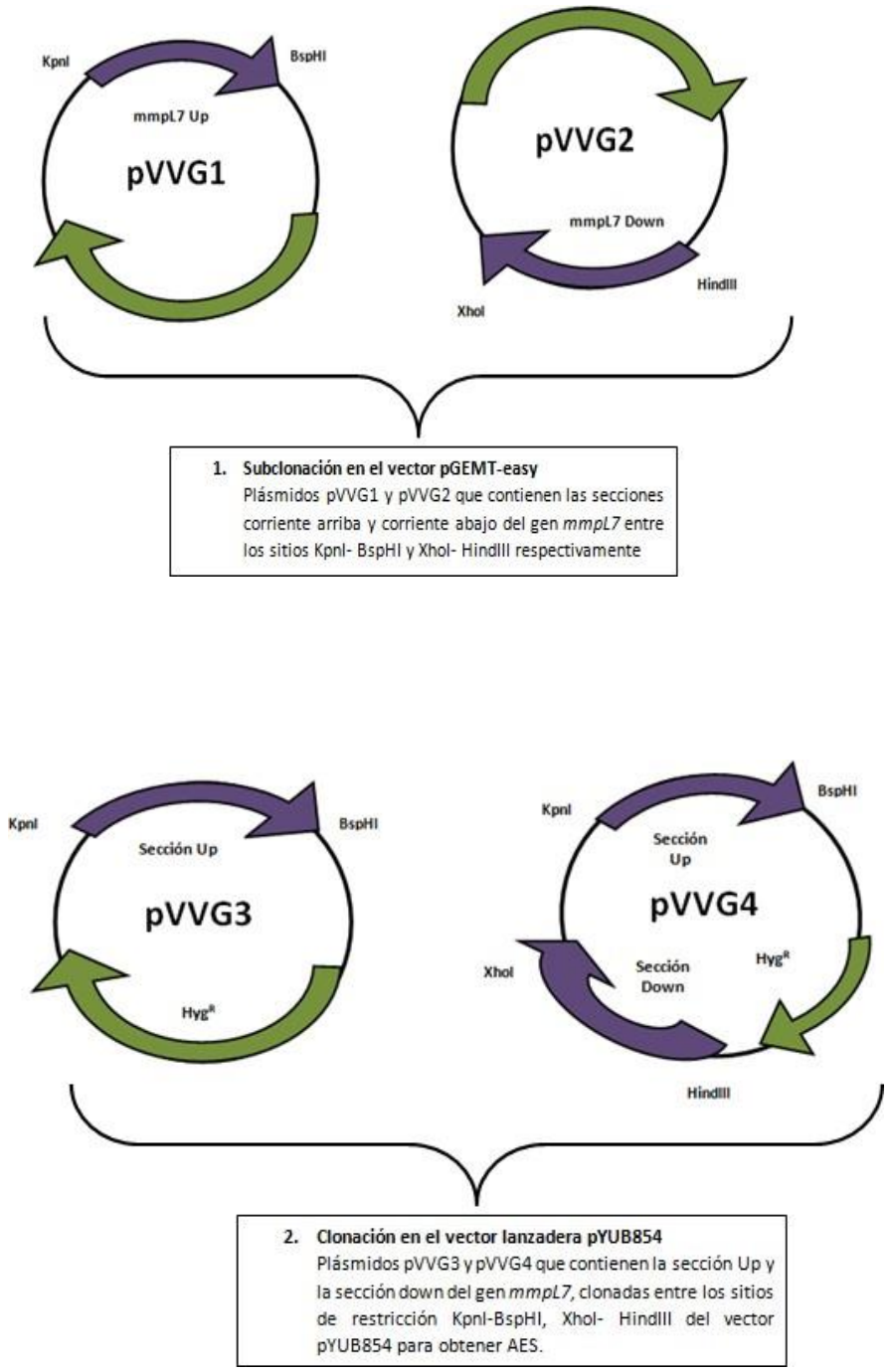


Figura 4-1. Esquema de Clonación de regiones genómicascorrientearriba y corriente abajo del gen mmpL7. pVVG1 y pVVG2 clonados en el vector pGEMT- easy y pVVG3 y pVVG4 clonados en el evector lanzadera pYUB854.

Tabla 4-2. Iniciadores utilizados en el estudio para amplificación del gen mmpL7. La clonación, construcción del AES, PCRs de confirmación del genotipo mutante y de confirmación de desmarcaje. *Iniciadores facilitados por el laboratorio de genética de micobacterias (Universidad de Zaragoza-España), ** Cepa mutante e iniciadores facilitados por Andrés Felipe León Torres- Msc, PhD Ciencias – Bioquímica – Universidad Nacional de Colombia, ***Plásmidos facilitados por el Doctor Wladimir Málaga del Departamento de Tuberculosis y biología de infecciones del Instituto de farmacología y biología estructural - (Francia), {*}Plásmido facilitado por Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Pittsburgh {**} Cepa facilitada por Milena Maya Hoyos- Msc,(c) PhD Ciencias – Bioquímica – Universidad Nacional de Colombia

Nombre	Secuencia 5´- 3´(sitio de restricción subrayado)	Sitio de restricción	Función
Iniciadores para la obtención del AES de mmpL7			
mmpL7 Up Dir	TTTTTCATGAGAAAGATTGTCACCCCTTCG	BspHI	Amplificar sección A
mmpL7 Up Rev	TTTTGGTACCCGGGGAGGACTTTTTCAAAC	KpnI	Amplificar sección A
mmpL7 Down Dir	TTTTAAGCTTTTCAGCGTGCTCAGTCAGAT	Hind III	Amplificar sección B
mmpL7 Down Rev	TTTTCTCGAGCGTCATATCAGTCGCACCAG	XhoI	Amplificar sección B
Iniciadores para la comprobación de clonaciones			
SP6	ATTTAGGTGACACTATAG	___	Comprobación en pGEM-T easy
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	___	Comprobación en pGEM-T easy
Primer pYUB854 Rev	GTGGCTCCCTCACTTTCTGG	_____	Comprobación en pYUB854
T7-2	GCGTATCACGAGGCCCTTTC	___	Comprobación en pYUB854
Hyg dir out	ACTTCGAGGTGTTCGAGGAG	___	Comprobación cassette Hyg ^{R}*
Comp Down Rev	GATAGGCCTGCAACAACTCC	___	Comprobación AES
Comp Up Dir	GTTCTTCGTGCCGCTAGTTC	___	Comprobación *AES*
Tm903 A	CTCGTGAAGAAGGTGTTGCT	___	Comprobación cassette Km^{R}
Tm903 B	CCGACCATCAAGCATTTTAT	___	Comprobación cassette Km^{R}
Hyg dir	GAAGGCGTTGAGATGCAGTT	___	Comprobación cassette Hyg ^{R}

Hyg rev	GTGGCTCCCTCACTTTCTGG	___	Comprobación cassette Hyg ^{R}
pJV53_comp_dir	CGAAATTCCGCTGGGAGATG	------	Comprobación pJV53
pJV53_comp_rev	CCACTTGCCCGATTCCATG	------	Comprobación pJV53
Iniciadores para comprobación de plásmidos de desmarcaje			
Δresolvasa dir	CGCGAGCACACCTGTTACTA	___	Comprobación actividad resolvasa en pCG124/ pWM19***
Δresolvasa rev	CATACGTGATCCGGAATCCT	___	Comprobación actividad resolvasa en pCG124/pWM19***
hsp60_promotor_ dir	CGACCATTTACGGGTCTTGT	-------	Comprobación plásmido pGH542{**}
hsp60_promotor_r ev	CCATTGCGAAGTGATTCCTC	-------	
Iniciadores para comprobación de desmarcaje en *M. smegmatis* mc^{2}155 Δ*msmeg_5014* **			
UP 5014 dir (UpDir)	TTTTTCTAGAAACCACGAGAAAGACCTGC	*Xba*I	**Construcción AES de Msmeg_5014
DOWN 5014 rev (DownRev)	TTTTCTCGAGCATCAAGAAGGCGCTGACG	*Xho*I	**Construcción AES de Msmeg_5014
Iniciadores para comprobación de desmarcaje de MtbRa ΔCtpF			
Adir2013	TTTTCTCGAGCGGATGGCAAGACC	XhoI	Comprobación mutante ctpF{*}
Comp-Down-ctpF	CGTCCGCAACCTAGTTGAAT	___	Comprobación mutante ctpF{**}
Iniciadores para comprobación de desmarcaje MtbRa ΔCtpH			
ctpH-pYUB-D	CCTCGAGGACCCGGTTG	XhoI	Comprobación mutante ctpH{*}
ctpH-pYUB-A	TTTTTCATGACAGCAACGGCGACCACAGC	BspHI	Comprobación mutante ctpH{*}

4.3.3 Clonación de fragmentos corriente arriba y corriente abajo del gen *mmpL7* en el vector pGEMT-easy

Los amplímeros obtenidos por PCR y correspondientes a regiones genómicas corriente arriba y corriente abajo del gen *mmpL7*, se clonaron inicialmente en el vector de clonación de productos de PCR, “pGMT-easy vector” siguiendo las instrucciones del proveedor (Promega, USA). En la reacción de ligación se probaron relaciones 1:3 y 1:5 (vector: inserto) para ambos productos de ligación. La reacción

de ligación se realizó con la enzima t4 DNA, a 4 °C durante 12 horas (protocolo 2). Los valores de las relaciones molares vector- inserto se calcularon usando el programa Biomath Ligations: Molar Ratio of Insert to Vector Calculator [111].
Los productos de ligación fueron transformados por electroporación (Protocolo 3) en células electrocompetentes de *E. coli* JM109 (Protocolo 4). La selección de recombinantes se hizo en placas de LB agar suplementadas con Amp X-Gal e IPTG. Las colonias de color blanco, que se espera sean recombinantes, se confirmaron por PCR de colonia usando iniciadores Up dir mmpL7 y Up rev mmpL7, para el recombinante conteniendo la sección corriente arriba, el que se denominó pVVG1 y mmpL7 Down Dir y mmpL7 Down Rev para el recombinante conteniendo la sección corriente abajo, el que se denomió pVVG2. Las colonias positivas se sometieron a extracción de plásmido con el kit *FavorPrep Plasmid Extraction Mini Kit* (Favorgen) (Protocolo 5) y posterior confirmación mediante digestión con NotI, PvuII KpnI y BspHI para la sección corriente arriba y HindIII y XhoI para la sección corriente abajo de *mmpL7*, respectivamente (Protocolo 6).

4.3.4 Sub-clonación del fragmento corriente arriba del gen *mmpL7 en* el plásmido pYUB854

El amplímero fue obtenido mediante digestión con las enzimas KpnI y BspHI a partir del plásmido pVVG1; estas mismas enzimas también se utilizaron para cortar simultáneamente el vector pYUB854. Las digestiones dobles se realizaron utilizando Buffer R 1X de Thermo Scientific y una relación de enzimas 1:1, de acuerdo con lo sugerido por el fabricante Thermo Scientific. La ligación para obtener el plásmido pVVG3 se hizo usando dos relaciones molares de vector e inserto (1:3 y 1:5). Los productos de ligación se confirmaron por PCR usando los iniciadores pYUB854/ mmpL7 Up Dir y T7-2/ mmpL7 Up Rev. Los plásmidos recombinantes se transformaron en células electrocompetentes de *E. coli* HB101, y se seleccionaron en medio sólido LB sin NaCl y suplementado con Hyg 50 µg/mL. Las colonias recombinantes fueron confirmadas por PCR usando el mismo juego de iniciadores de confirmación del producto de ligación. El nuevo plásmido recombinante (pVVG3)

fue analizado por mapeo de restricción con la digestión doble KpnI y BspHI (Tabla 6).

4.3.5 Clonación de la sección corriente abajo del gen *mmpL7* en el plásmido pVVG3: obtención del plásmido pVVG4 y AES

El amplímero del fragmento genómico corriente abajo de *mmpL7* fue obtenido mediante digestión con las enzimas HindIII y XhoI a partir del plásmido pVVG2 usando las condiciones sugeridas por el programa Doubledigest de Thermo Scientific usando en el plasmido pVVG3 estas mismas enzimas [11]. Una vez purificados, los productos de la ligación se ligaron probando relaciones molares de vector e inserto (1:3 y 1:5), y los productos de ligación se confirmaron por PCR usando los iniciadores Hyg dir out/ mmpL7 Down Rev y mmpL7 Down Dir/ mmpL7 Down Rev.

Las condiciones de la PCR utilizadas se registran en la tabla 7. La transformación se realizó en células electrocompetentes de *E. coli* HB101, haciendo la selección de recombinantes en medio sólido LB sin NaCl suplementado con Hyg 50 µg/mL. Las colonias recombinantes fueron confirmadas por PCR usando el mismo juego de iniciadores de confirmación del producto de ligación. El plásmido recombinante pVVG4 se analizó por mapeo de restricción con la digestión doble BspHI y XhoI.

Tabla 4-3. Plásmidos obtenidos y construidos durante el transcurso de la investigación

Plásmidos obtenidos por fuera del estudio				
Nombre	**Características**	**Ori**	**Resistencia**	**Referencia/Fuente**
pGEM-T Easy	Vector para clonación tipo T de fragmentos de PCR	E	Amp^R	Promega
pJV53	Genes 60 y 61 de Che9c clonado en el vector pLAM12, promotor acetamidasa	M	Km^R	[83], Unizar*
pYUB854	Vector para obtener el AES por doble clonación. Cassette HygR flanqueado por MCSs y δγ resolvasa	E	Hyg^R	[83], Unizar*
pCG124	Vector de expresión γδ resolvasa	E/M	Km^R	[8], Instituto de farmacología y biología estructural-(Francia)**
pWM19	Plásmido termosensible micobacteriano para la expresión γδ resolvasa, alberga el marcador de contraselección SacB	E/M	Hyg^R Gm^R	[8] Instituto de farmacología y biología estructural-(Francia)**
pGH542	Vector de expresión γδ resolvasa bajo el control del promotor *hsp60* de BCG	M	Tet^R	[138] Instituto y Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Pittsburgh, Pittsburgh***
Plásmidos construidos durante el desarrollo de la investigación				
Nombre	**Inserto**	**Ori**	**Resistencia**	**Esqueleto**
pVVG1	Sección A del gen *mmpL7 entre* KpnI y BspHI	E	Amp^R	pGEM-T Easy

pVVG2	Sección B del gen *mmpL7* entre HindIII y XhoI	E	Amp^{R}	pGEM-T Easy
pVVG3	Sección A del gen *mmpL7 entre* KpnI y BspHI	E	Hyg ^{R}	pYUB854
pVVG4	Gen *mmpL7* con sitios BspHI y XhoI	E	Hyg ^{R}	pYUB854

*Unizar: Obsequio del laboratorio de genética de micobacterias de la Universidad de Zaragoza – España
** Obsequio del Instituto de farmacología y biología estructural-Francia
*** Obsequio Instituto y Departamento de Ciencias Biológicas, Universidad de Pittsburgh

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

Producto	**Molde**	**Iniciadores**	**Denat. Inicial**	**Ciclos (C)**			**#C**	**Elong. Final**
				Denat.	**Anilla.**	**Elong.**		
Obtención del AES de mmpL7								
Sec A	DNA H37Rv	Up dir mmpL7/ Up rev mmpL7	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
SecB	DNA H37Rv	mmpL7 Down Dir y mmpL7 Down Rev	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
AES	pVVG4	-Up dir mmpL7/ Up rev mmpL7 y mmpL7 -Down Dir y mmpL7 Down Rev	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min

Comprobación de clonaciones								
mmpL7	pVVG1	Up dir mmpL7/ Up rev mmpL7	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
	pVVG2	mmpL7 Down Dir y mmpL7 Down Rev	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
pYUB854:A	pVVG3	primer pYUB/Up dir mmpL7 y T7-2 Up Rev mmpL7	94°C x 9min	94°C x 30 s	59°C x 30 s	72°C x 1 min	35	72°C x 10 min
pVVG3:B	pVVG4	Hyg dir out y mmpL7 Down Rev	94°C x 9min	94°C x 30 s	58°C x 30 s	72°C x 1 min	35	72°C x 10 min
Km^R	pJV53/pCG124	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
		pJV53_comp_dir pJV53_comp_rev	94°C x 9 min	94°C x 1 min	57°C x 1 min	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
Comprobación mutante Mtb H37RvΔmmpL7								
H37Rv ΔmmpL7	***H37Rv ΔmmpL7***	***Comp Up Dir/primer pYUB854***	94°C x 9min	94°C x 30 s	59°C x 45s	72°C x 1 min	35	72°C x 10
H37Rv ΔmmpL7		***Comp Up Dir/mmpL7 Up reverso***	94°C x 9 min	94°C x 30 s	58°C x 45 s	72°C x 1 min	***35***	72°C x 10

	H37Rv ΔmmpL7							
		Comp down rev/ Hyg dir out	94°C x 9 min	94°C x 30 s	58°C x 45 s	72°C x 1 min	***35***	72°C x 10
		Comp down rev/mmpL7 Down Dir	94°C x 9 min	94°C x 30 s	58°C x 45 s	72°C x 1 min	***35***	72°C x 10
Comprobación plásmidos desmarcaje								
Promotor hsp60	pGH542	hsp60_promotor_dir hsp60_promotor_rev	94°C x 9 min	94°C x 1 min	57°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
Sección γδ resolvasa	pCG124/ pWM19	Δresolvasa dir Δresolvasa rev	94°C x 9 min	94°C x 1 min	58°C x 30 s	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
Comprobación desmarcaje en *M. smegmatis* mc^{2}155 *Δmsmeg_5014*								
***Δmsmeg_5014*:Hyg -**	*M. smegmatis* mc^{2}155 *Δmsmeg_5014*	Down 5014 rev/ Hyg dir out	94°C x 9 min	94°C x 1 min	66°C x 1 min	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min
		UP 5014 dir/ Primer pYUB854 Rev	94°C x 9 min	94°C x 1 min	61°C x 1 min	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min

Comprobación desmarcaje *M. Tuberculosis* H37Ra ΔctpF y ΔctpH								
ΔctpF:Hyg -	MtbRaΔctpF	Adir2013 y Hyg dir out	94°C x 9 min	94°C x 30 s	58°C x 1 min	72°C x 1:30	35	72°C x 10 min
ΔctpH:Hyg-	MtbRaΔctpH	ctpHpYUBA y primerPYUB	94°C x 9 min	94°C x 30 s	59°C x 1 min	72°C x 1:30	35	72°C x 10 min
Comprobación expulsión plásmido pCG124								
ΔctpF:pCG124 -	ΔctpH:pCG124	Tm903A- Tm903B	94°C x 9 min	94°C x 30 s	58°C x 1 min	72°C x 45 s	35	72°C x 10 min

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

4.4 Obtención de una cepa de recombinción de *MtbH37Rv*

De acuerdo con el esquema general (**Figura 4-2**) una vez obtenido el AES del gen *mmpL7*, se construyó una cepa de recombinación. Para ello, células de *Mtb*H37Rv se transformaron por electroporación con el plásmido pJV53 (**Figura 7-1**;**Tabla 4-3**; Protocolo 9) que permite la expresión de las proteínas Gp60 y Gp61 del micobacteriófago Che9c bajo el control del promotor acetamidasa [12]. Luego de la transformación se seleccionaron las colonias transformantes por PCR de colonia usando los iniciadores Tm903 A y Tm903 B (Tabla 7) que amplifican un fragmento de 846 pb correspondiente a una parte del cassette de resistencia a Km.

La expresión de las proteínas recombinantes es inducida con acetamida, que funciona como fuente de carbono del medio de cultivo usado para preparar las células competentes durante la transformación del AES, o medio de inducción [12]

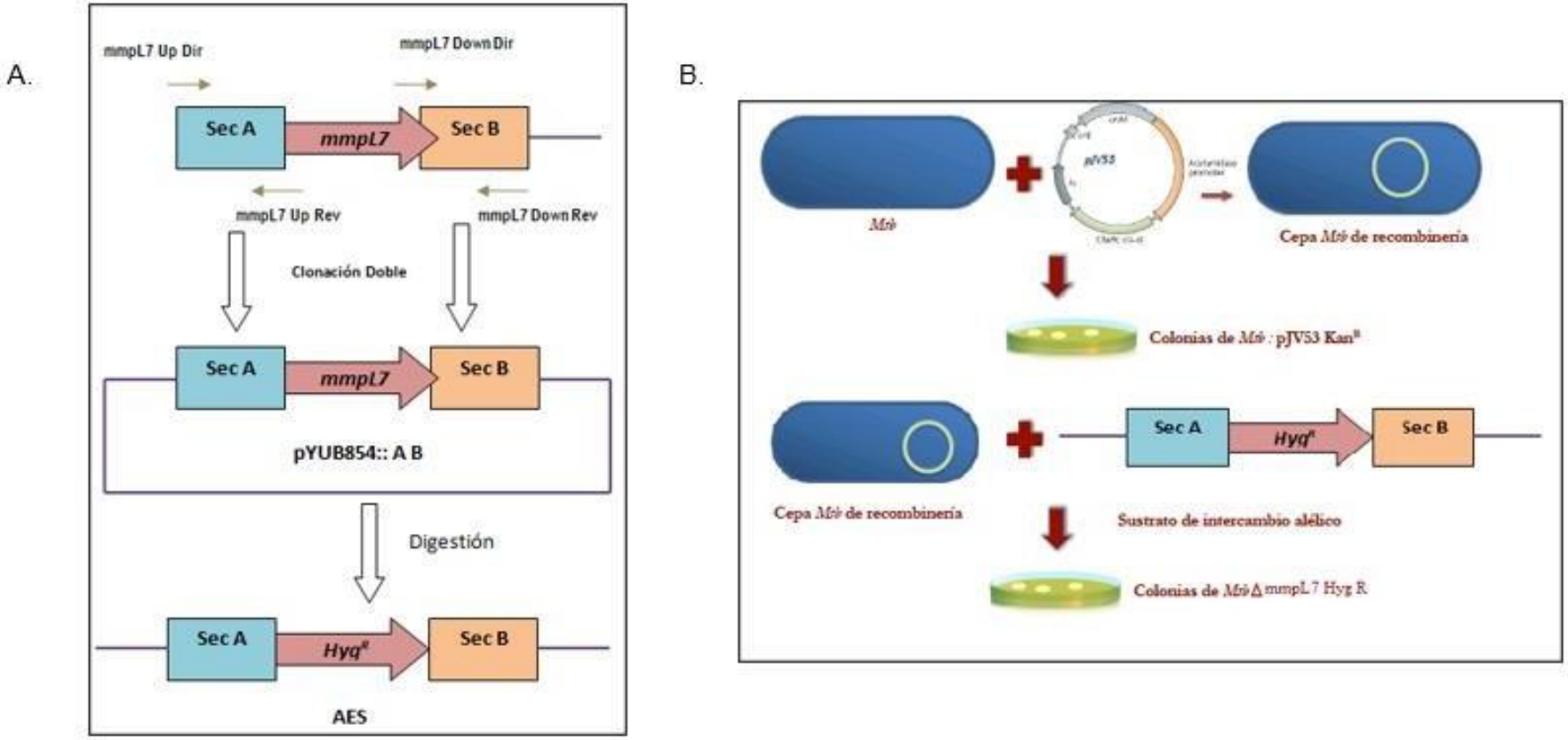


Figura 4-2. Esquema general de la técnica de recombinación usada para la construcción de la cepa mutante MtbH37Rv ΔmmpL7 A. Obtención del AES, que se hizo mediante la clonación doble de los segmentos corriente arriba y abajo del gen *mmpL7* en el vector pYUB854 y posterior liberación del AES por digestión. **B**. La cepa recombinante se obtiene con la transformación de la cepa silvestre *Mtb*H37Rv con el plásmido pJV53 que posteriormente se transforma con el AES para obtener el mutante defectivo en el gen *mmpL7.*

4.5 Obtención de la cepa mutante de *MtbH37RvΔmmpL7*

La cepa mutante H37Rv*ΔmmpL7* se obtuvo siguiendo la metodología empleada por Van Kessel [12] Al transformar las células de *Mtb* H37Rv con el AES del gen *mmpL7* (Protocolo 9), se induce la recombinación homóloga que sustituye el gen *mmpL7* original de la cepa H37Rv por un casete de resistencia a higromicina [12]. 7H9-OADC-Km-Chx suplementado con succinato 0,2 % se utilizó para cultivar la cepa recombinante. Las células electrocompetentes de la cepa recombinante se transformaron por electroporación con 200 ng de AES, y se dejaron recuperar en 7H9-OADC por 24 h a 37 °C y 80 rpm.

Las células transformadas se incubaron a 37°C hasta un OD_{600nm} de 0,6. Posteriormente, la expresión de las proteínas de recombinación fue inducida con acetamida al 0,2 % y glicina 1,5 %. Finalmente, las células inducidas se cultivaron a 37°C a 80 rpm con agitación durante 18 h, se plaquearon en 7H11-OADC-Km-Chx-Hyg (20 µg/mL-50 µg/mL- 50 µg/mL) hasta la aparición de colonias.

4.5.1 Comprobación del genotipo mutante de *Mtb* H37Rv ΔmmpL7

Dos colonias de posibles mutantes fueron recuperadas y se pasaron a cultivos en medios líquidos para la posterior extracción de ADN genómico usado como molde para de comprobación del genotipo mutante mediante PCR. Para la confirmar la inserción del AES en el genoma se emplearon los iniciadores Up dir mmpL7/ Up rev mmpL7 y mmpL7 -Down Dir y mmpL7 Down Rev que amplifican para 531 pb y 592 pb respectivamente (**Figura 4-3**).

Para comprobar que el gen *mmpL7* fue sustituido en su totalidad por el cassete de higromicina, se realizaron comprobaciones por PCR corriente arriba y corriente abajo del gen objetivo. Para tal fin, se emplearon los siguientes iniciadores para

amplificar la sección corriente abajo del gen delecionado: comp down rev y hyg dir out que amplifican un fragmento de 1259pb y comp down rev y mmpL7 -Down Dir que amplifican un fragmento de 955 pb. De igual modo, para comprobar la sustirución del gen *mmpL7* por el AES, en la sección corriente arriba se emplearon los iniciadores comp Up dir y primer pYUB que amplificaron para un fragmento de 1288 pb y Comp Up Dir y mmpL7 Up reverso que amplifico para un fragmento de 1005 pb.

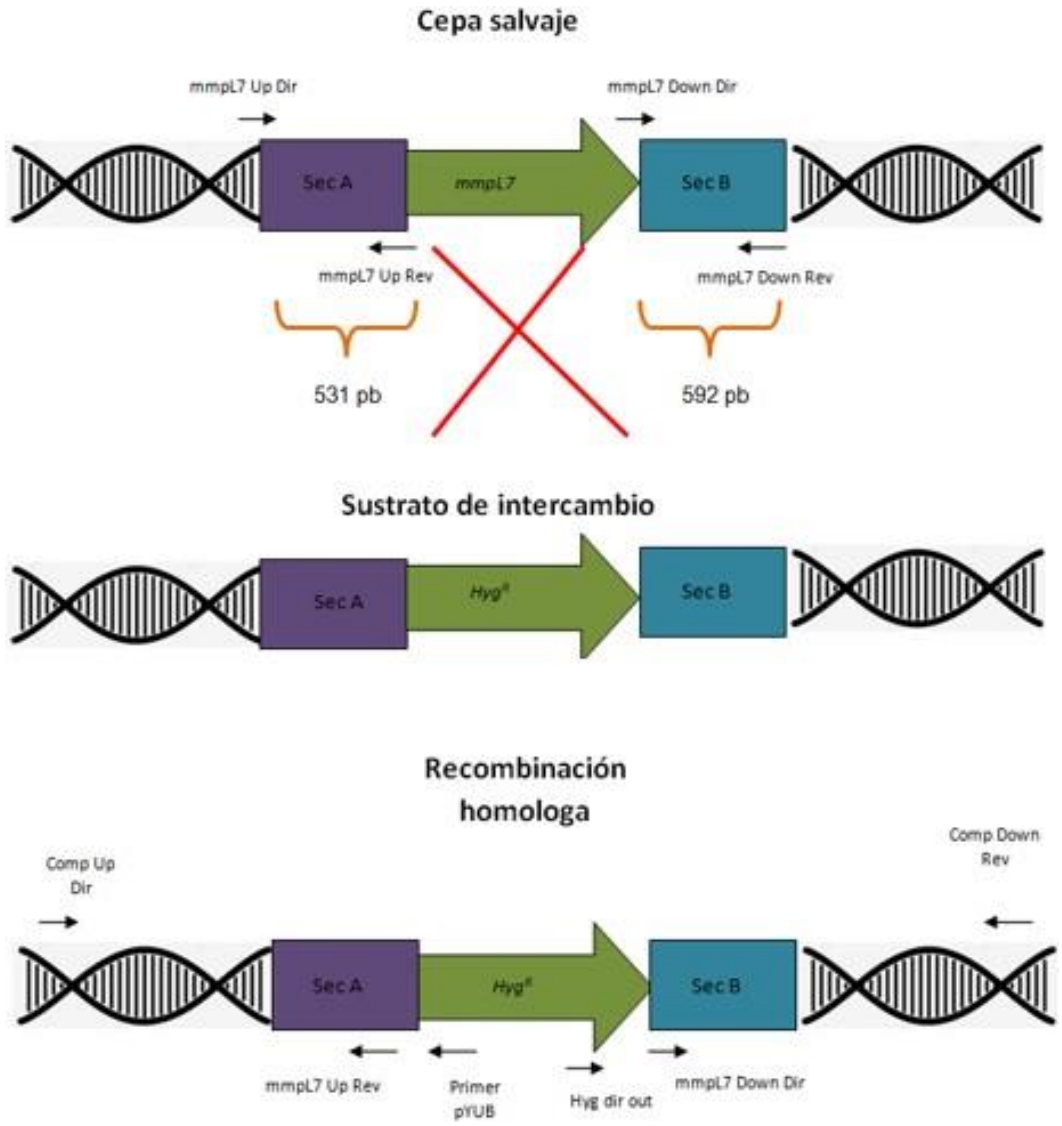


Figura 4-3. Esquema de la recombinación homóloga del AES del gen mmpL7 para la obtención del genotipo mutante H37RVΔmmpL7 La figura muestra los iniciadores empleados para hacer la comprobación por PCR de la mutación del genotipo salvaje.

4.6 Desmarcaje de cepas mutantes de *Mtb* y *M. smegmatis*

Con el objetivo de proponer un potencial a doble mutante, a cepas mutantes defectivas en ATPasas tipo P previamente obtenidas por recombinación homóloga se les retiró el casete de resistencia a higromicina valiéndose de la transformación con plásmidos que expresan actividad $\delta\gamma$ resolvasa, esta metodología es conocida como desmarcación de genotipos mutantes.

Para comprobar la funcionalidad de plásmidos con actividad $\delta\gamma$ resolvasa previamente adquiridos, el plásmido pGH542 (Tabla 6) se transformó en la cepa mutante *M. smegmatis* mc^2155 Δ*msmeg_5014* obtenido previamente en una tesis de doctorado en nuestro grupo de investigación [112]. El mutante en cuestión, es defectivo en el gen de la Cu^+ ATPasa endógena (*msmeg_5014*). Luego de la transformación se seleccionaron las colonias desmarcadas por selección antibiótica, utilizando el medio de cultivo Middlebrook 7H10 OADC suplementado con tetraciclina. Mediante una PCR de colonia usando los iniciadores Up 5014 dir y primer pYUB y Down 5014 Rev y Hyg dir out (Tabla7) se corroboró la ausuencia del gen de resistencia antibiótica.

El anterior procedimiento se aplicó a un primer mutante de *MtbRaΔctpF,* desarrollado en una tesis en curso [113].

MtbRaΔctpF se transformó por electroporación con el plásmido pCG124 que reconoce los sitios δγ resolvasa que flanquean el casete de resistencia a higromicina (**Figura 7-1**;**Tabla 4-3**;**Figura 4-4**). Luego de la transformación las colonias desmarcadas se seleccionaron suplementando el medio de crecimiento Middlebrook 7H10 OADC con kanamicina. Posteriormente se hizo una PCR de

colonia usando los iniciadores Adir2013 y Hyg dir out (Tabla 7). Luego se procede a hacer pases sucesivos en medio líquido Middlebrook 7H9 OADC suplementado con el antibiótico CHX con el objetivo de expulsar el plásmido pCG124 del mutante *MtbRaΔctpF::pCG124*. Mediante diluciones seriadas (10^{-0} hasta 10^{-4}) se buscan colonias individuales que se comprueban mediante PCR de colonia usando los iniciadores Tm903 A y Tm903 B (Tabla 7) para comprobar si existe resistencia a Kanamicina en el mutante de MtbRa*ΔctpF*.

Una segunda comprobación se realizó sobre el mutante *MtbRaΔctpH* transformaándolo con el plásmido pWM19 (**Figura 7-1**;**Tabla 4-4**) que reconoce los sitios δγ resolvasa que flanquean el casete de resistencia a higromicina [8] que contiene el AES (**Figura 4-4**). Luego de la transformación se seleccionaron las colonias desmarcadas por selección antibiótica, suplementando el medio de crecimiento Middlebrook 7H10 OADC con gentamicina y kanamicina, posteriormente se hizo una PCR de colonia usando los iniciadores ctpH-pYUB-D y Hyg dir out (Tabla7).

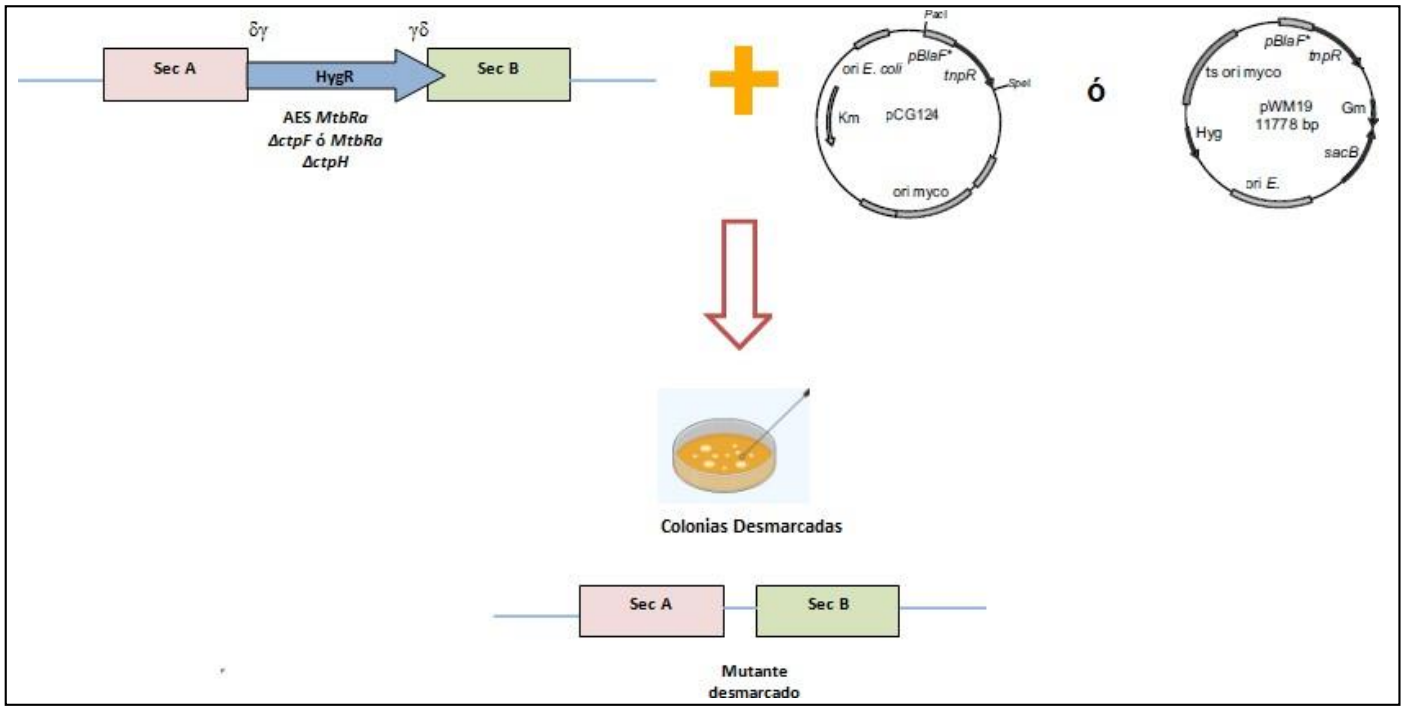


Figura 4-4. Esquema general de la técnica de desmarcaje usando los plásmidos pCG124 y pWM19. La cepa mutante se transforma con los plásmidos que tienen actividad δγ resolvasa obteniendo cepas mutantes sin el casete de resistencia a Higromicina.

5. Resultados y Discusión

En el presente trabajo se utilizó la técnica de recombinación para delecionar el gen *mmpL7* del genoma de bacilo *Mtb.* Mediante la técnica de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se pudo confirmar la obtención del sustrato de intercambio alélico (AES) del gen *mmpL7,* el que se transformó en células de *Mtb*H37Rv para la obtención del mutante. Por otra parte, se confirmó el desmarcaje en cepas defectivas en ATPasas tipo P de *Mtb* (*Mtb H37Ra ΔctpF* y *Mtb H37Ra ΔctpH*) previamente obtenidas, a las que se les retiró el casete de resistencia antibiótica.

5.1 Precursores para la obtención del mutante de *MtbH37RvΔ mmpL7*

La construcción del mutante defectivo en el gen *mmpL7* se realizó en la cepa virulenta H37Rv siguiendo todos protocolos de bioseguridad establecidos para el manejo de cepas patógenas. Para la obtención del mutante *Mtb*H37Rv *ΔmmpL7* por recombinación se hizo necesario construir un sustrato de intercambio alélico o

AES del gen *mmpL7* y una cepa recombinante, para lo que *Mtb*H37Rv, se transformó con el plásmido pJV53 que permite una expresión controlada de los genes del micobacteriófago Che9c involucrados en el proceso de recombinación, favoreciendo así el evento de recombinación homóloga [108].

El AES consistió en ensamblar una secuencia de ADN de doble cadena lineal de aproximadamente 3000 pb, conformado por un fragmento genómico corriente arriba del gen *mmpL7*, seguido de un cassete de higromicina, y este a su vez seguido de un fragmento genómico corriente abajo de *mmpL7* (**Figura 5-1**). Una vez obtenido, se transformaron 200 ng del AES en la cepa de recombinación [108].

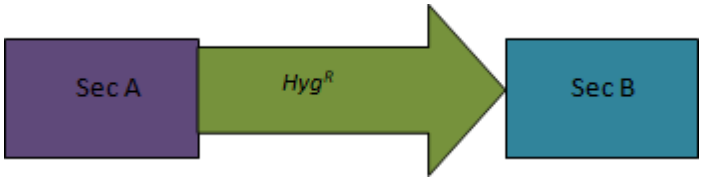


Figura 5-1. Esquema el sustrato de intercambio alélico (AES) del gen mmpL7

Después de 4-5 semanas de cultivo de las cepas transformadas, se obtuvieron colonias de la cepa mutante de *MtbH37Rv ΔmmpL7* (**Figura 5-2**)

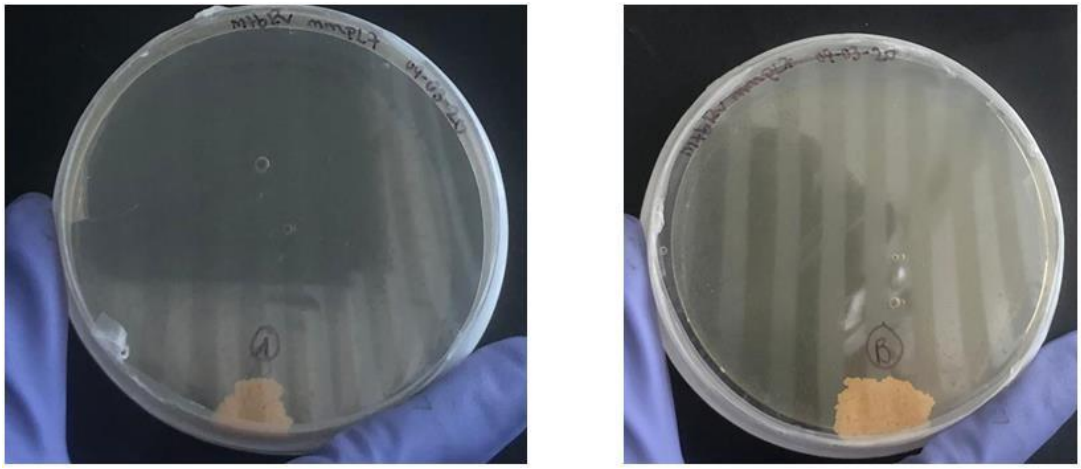


Figura 5-2. Colonias obtenidas de la transformación de Mtb H37Rv con el AES del gen mmpL7

5.1.1 OBTENCIÓN DE UN AES PARA MUTAR EL GEN *mmpL7* POR RECOMBINACIÓN

El gen *mmpL7 fue* inicialmente amplificado por PCR en el vector lanzadera pYUB854, un vector que contiene un casete de resistencia a higromicina y un origen de replicación de *E. coli*. Al intento inicial de clonar directamente el fragmento amplificado corriente arriba de *mmpL7* incluyendo en la PCR los sitios de restricción KpnI y BspHI en el vector pYUB854, no se obtuvieron colonias recombinantes. Como alternativa, se decidió subclonar en el vector para productos de PCR, pGEM-T easy.

La región genómica corriente arriba y parte de la región 5´de *mmpL7* (Sección A) se amplificó en un fragmento de 531 bp. La sección corriente abajo (Sección B) comprendiendo parte de la región 3´de *mmpL7* unida a una porción de la región genómica corriente abajo de este gen, se amplifico en un fragmento de 592 bp (**Figura 5-3**).

Los constructos obtenidos al clonar la sección corriente arriba (pVVG1) entre los sitios KpnI y BspHI y la sección corriente abajo flanqueada por los sitios de restricción HindIII y XhoI (pVVG2), de pGEMT-EASY, respectivamente, se dirigieron usando las mismas enzimas restricción y se ligaron posteriormente en el vector pYUB854.

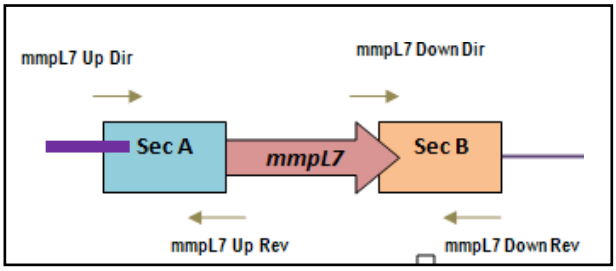


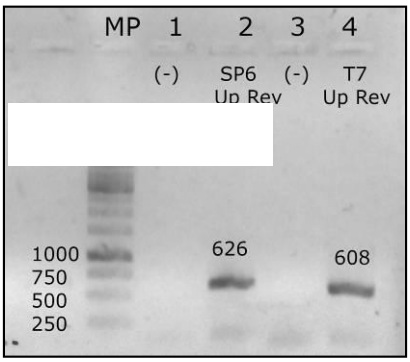
Figura 5-3. Esquema de las secciones A y B del gen mmpL7.

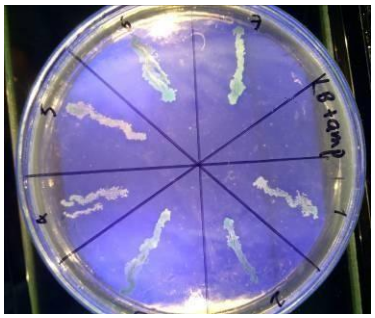
5.1.2 OBTENCIÓN DE LOS PLÁSMIDOS RECOMBINANES pVVG1 y pVVG2

El plásmido pVVG1 es producto de la clonación de la sección corriente arriba y parte de la secuencia 5´del gen *mmpL7* (531bp) en el vector pGEMT-easy que de ahora en adelante se conocerá como sección A. (**Figura 5-4**-A).

Para la obtención de este recombinante, los productos de ligación se comprobaron mediante PCR utilizando los iniciadores SP6 - mmpL Up rev y T7- mmpL7 Up rev que producen amplímeros de 626 pb y 608 pb, respectivamente (**Figura 5-4**-B). Una vez corroborado el éxito de la ligación, los plásmidos recombinantes se transformaron en las células competentes JM109, obteniendo al final 7 posibles colonias recombinantes (**Figura 5-4**-C).

A. **B.** **C.**





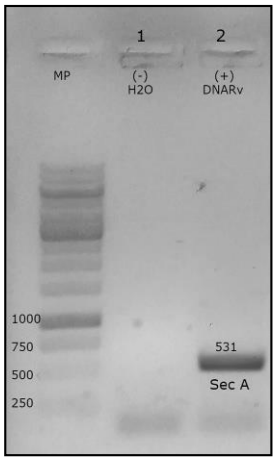
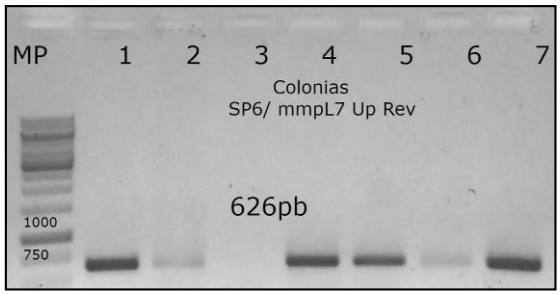


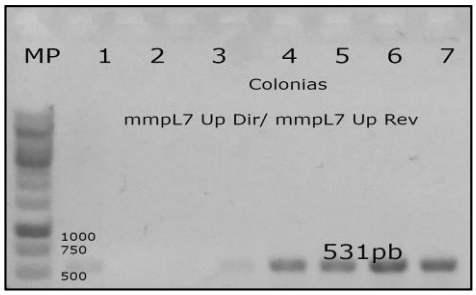
Figura 5-4. Clonación del gen mmpL7 en pGEM-T easy (A). PCR de la sección corriente arriba (Sección A) del gen *mmpL7*. (B). Comprobación por PCR de la ligación entre mmpL7 Sección A y vector pGEMT-easy. El gel de electroforesis muestra la amplificación en 626 pb con los iniciadores SP6-mmpL Up rev y en 608 pb con los iniciadores T7- mmpL7 Up rev. (C) Colonias recombinantes utilizadas para la extracción de plásmido.

La corroboración de plásmidos recombinantes en las colonias seleccionadas se realizó mediante PCR (**Figura 5-4**-D), observando 4 colonias positivas (4, 5, 6 y 7). A manera de corroboración, se realizó un mapeo de restricción de los plásmidos recombinantes extraidos (**Figura 5-4**-E), mediante digestión con las enzimas NotI Y PvuII, que reconocen sitios dentro de la secuencia clonada (**Figura 5-4**-F). Como producto de la digestión con NotI se esperaban fragmentos de 565 pb y 2984 pb, y con PvuII fragmentos de 982 pb y 2567 pb (**Figura 5-4**-G). En la (**Figura 5-4**-H) se muestra el mapa del recombinante pVVG1 indicando las posiciones en donde las enzimas NotI, PvuII, KpnI y BspHI cortan el plásmido.

D.

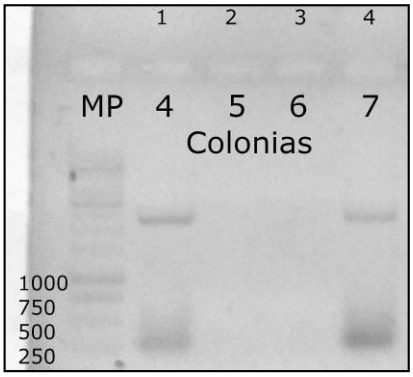


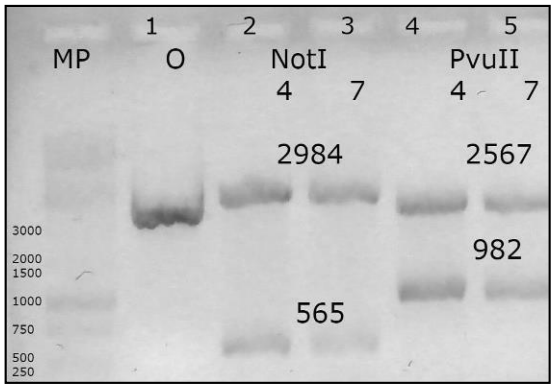
E.



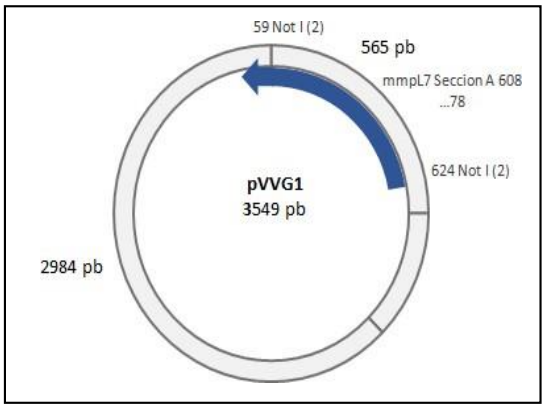
F.

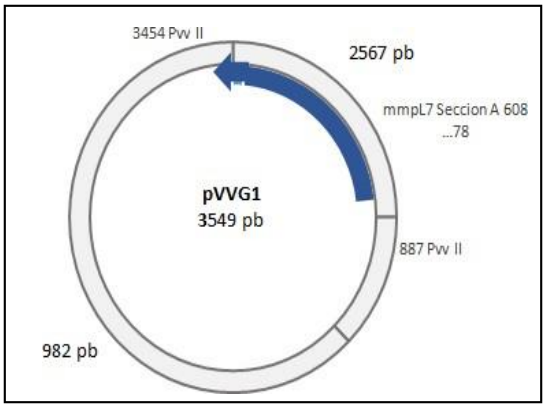
G.

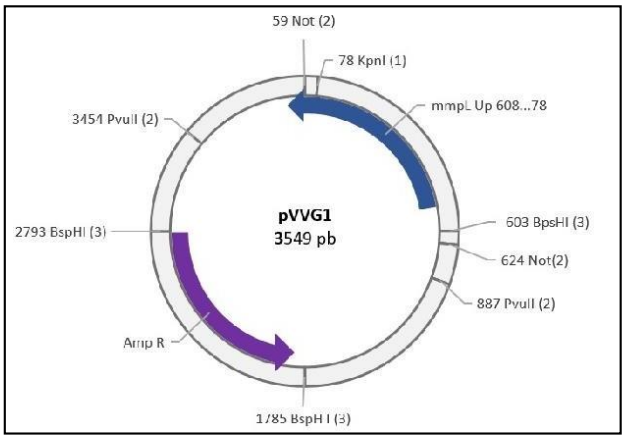

1 2 3 4
MP 4 5 6 7
Colonias
1000
750
500
250


1 2 3 4 5
MP O NotI PvuII
4 7 4 7
2984 2567
982
565
3000
2000
1500
1000
750
500
250

H.


59 Not I (2)
565 pb
mmpL7 Seccion A 608
...78
624 Not I (2)
pVVG1
3549 pb
2984 pb


3454 Pvv II
2567 pb
mmpL7 Seccion A 608
...78
pVVG1
3549 pb
887 Pvv II
982 pb



I.

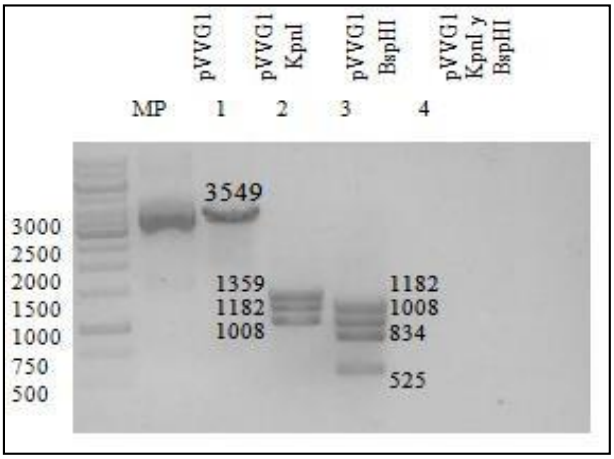


Figura 5-4 (Continuación).Clonación del gen mmpL7 en pGEM-T easyyconfirmación del plásmido pVVG1. D). PCR de hervido de las siete colonias con los iniciadores SP6 /mmpL7 Up reverso y mmpL7 Up directo/ mmpL7 Up reverso. **E)** En los carriles 1, 2,3 y 4 se muestra el plásmido extraído de las colonias 4, 5, 6 y 7. **F)** Mapa del recombinante pVVG1 que indica las posiciones donde hace corte las enzimas de restricción NotI y PvuII y la longitud de los productos de digestión. **G)** Electroforesis para el análisis mediante digestión con NotI y PvuII del plásmido extraído pVVG1 de las colonias 4 y 7. **H).** Mapadel recombinante pVVG1 que indica las posiciones donde hacen cortes las enzimas NotI, PvuII, KpnI y BspHI. **I)** Mapeo de restricción del plásmido pVVG1 (Colonia 4) con las enzimas KpnI (3549 pb) (Carril 2), BspHI (1359pb, 1182pb y 1008pb) (Carril 3) y digestión doble (KpnI y BspHI) (1182pb, 1008pb, 834pb y 525 pb) (Carril 4)

La colonia 4 se seleccionó para continuar con los estudios, toda vez que, en las diferentes comprobaciones, fue la que mostró mejores amplificaciones y en las digestiones con las enzimas de restricción mostro una mejor definición de las bandas esperadas. A manera de corroboración se realizó otro mapeo en el plásmido recombinante extraído de la colonia 4, utilizando las enzimas KpnI y BspHI, para lo que se esperaban fragmentos de 3549pb con la enzima KpnI y fragmentos en 1359pb, 1182pb y 1008pb respectivamente tal como se observa en la (**Figura 5-4**-I). Al aplicar esta estrategia, el plásmido pVVG1 es un paso intermedio para adquirir sitios de restricción adecuados para una clonación direccional de la sección A en el vector pYUB854. Finalmente, la integridad del plásmido recombinante 4 se comprobó mediante secuenciación de ADN (**Figura 7-2**-B).

EL plásmido pVVG2 se obtuvo mediante la clonación de la sección B (amplimero de 592 pb) (**Figura 5-5**-A) en el vector pGEMT-EASY. El procedimiento para obtener y detectar colonias recombinantes es el mismo que se utilizó para la clonación del segmento A, o sea, primero sublclonar una ligación comprobada por PCR en pGEMT EASY, y después tamizar mediante PCR del plásmido recombinante. Las comprobaciones para determinar si el producto de PCR se ligó en el vector, se realizaron por PCR utilizando los iniciadores SP6 y T7 con mmpL7 Down Dir (**Figura 5-5**-B).

Al transformar la ligación en células JM109, se obtuvo una única colonia (**Figura 5-5**-C), la que mediante comprobación por PCR con los iniciadores T7-Down Dir, SP6 Down Rev y Down Dir y Down Rev (**Figura 5-5**-D), mostró el patrón predicho con el programa "*in silico Ape Plasmid Editor*". Una vez extraído el plásmido de la colonia positiva, su identidad se corroboró mediante mapeo de restricción individual y doble con las enzimas HindIII y XhoI, que reconocen sitios específicos de la secuencia del plásmido clonado (**Figura 5-5**-E). Como lo esperado, se observaron fragmentos de 3610 pb con XhoI y con HindIII, y para la digestión doble dos fragmentos de 3024pb y 586 pb (**Figura 5-5**-F) confirmando la identidad del

plásmido recombinante, cuya integridad se corroboró mediante secuencia de ADN (**Figura 7-2**-B)

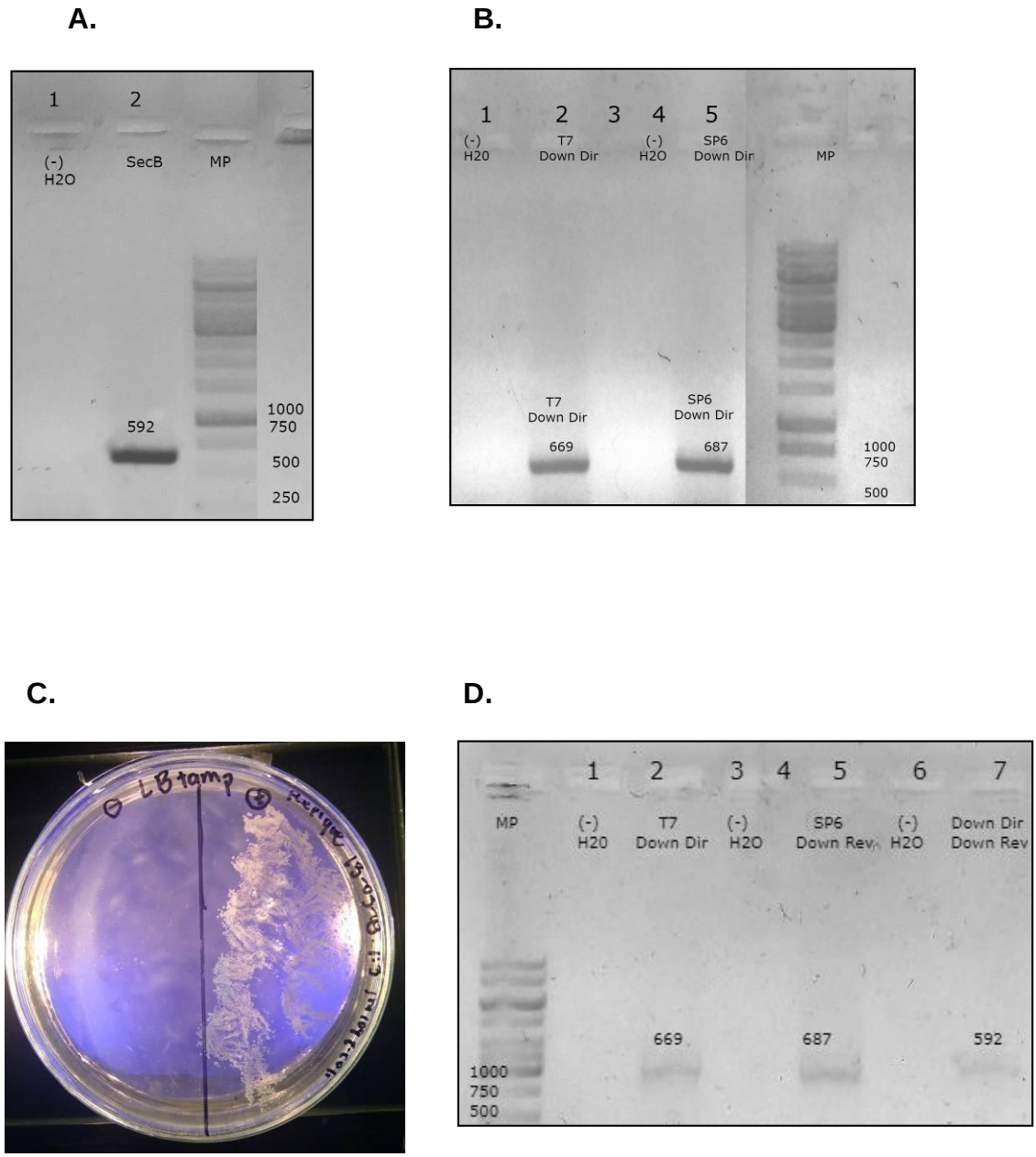
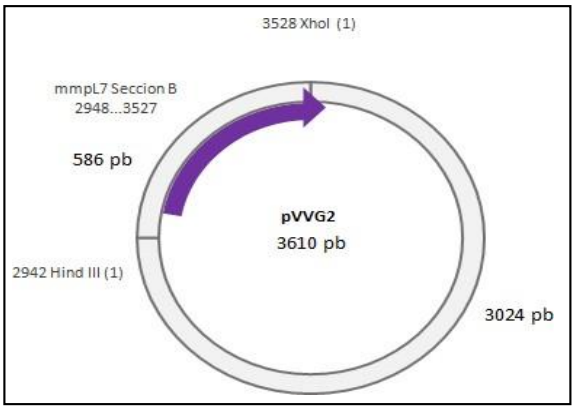


Figura 5-5. Clonación del gen mmpL7 en pGEM-T easy(A). PCR de la sección corriente arriba (Sección B) del gen *mmpL7*. **(B)**Comprobación por PCR de la ligación entre mmpL7 Sección B y vector pGEMT-easy. El gel de electroforesis muestra la amplificación en 687 pb con los iniciadores SP6-mmpL Down Dir y en 669 pb con los iniciadores T7- mmpL7 Down Dir. **(C)** Colonias recombinantes utilizadas para la extracción de plásmido. **D)** PCR

de hervido de la colonia recombinante con los iniciadores T7 / mmpL7 Down Dir, SP6 / mmpL7 Down Rev y Down Dir/ Down Rev.

La selección de plásmidos recominantes clonados en pGEMT-EASY se basa en el principio de la complementación α del gen de la β-galactosidasa, en la que el vector de clonación pGEMT-easy la de la secuencia *lacZα* es interrumpida por un sitio de clonación múltiple interno (MCS). En plásmidos recombinantes, el inserto interrupmpe la expresión del péptido α de la β-galactosidasa produciendo colonias blancas. Sin embargo, en la obtención de pVVG1 y pVVG2, la detección blanco-azul fue confusa, debido a que las colonias recombinantes obtenidas no eran totalmente blancas sino mostraron una coloración azul clara. Sin embargo, al realizar las respectivas corroboraciones, se encontró que si se trataba de recombinantes. Este comportamiento se podría explicar si los fragmentos clonados quedan en marco de lectura con el gen *lac* Z alfa [114], lo que se beneficiaría aún más tratándose de fragmentos clonados de tamaño pequeño.

E.



F.

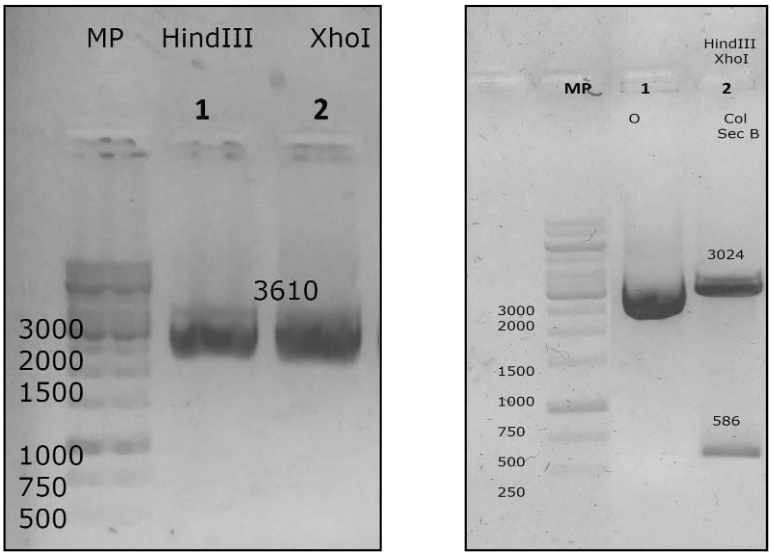


Figura 6-5 (Continuación). Clonación del gen *mmpL7* en pGEM-T easy y confirmación del plásmido pVVG2. E) Mapa del recombinante pVVG2 que indica las posiciones donde hace corte las enzimas de restricción HindIII y XhoI. **F)** Gel de electroforesis para el análisis mediante digestión con HindIII y XhoI del plásmido extraído pVVG2 de la colonia recombinante. En el carril 1 se muestra el plásmido sin digerir y en el carril 2 se muestran las bandas resultado de la digestión doble, la banda en 586 corresponde al fragmento liberado de la Sección B.

Dentro de la estrategia propuesta, resultó una ventaja subclonar primero las secciones A y B en pGEMT-easy, porque de esta manera se podría asegurar que el inserto clonado adquiriera del vector los sitios de restricción KpnI y BspHI en el caso de la sección A y con HindIII y XhoI para la sección B y de esta manera favorecer la clonación dirigida en pYUB854.

Por otra parte, el sistema de clonación utilizado está compuesto por células competentes de *E. Coli* JM109 y el vector pGEMT- easy, se eligió debido a que JM109 presenta actividad deficiente en la actividad β-galactosidasa producida por deleciones tanto en copias genómicas como episomales del gen *lacZ*. La deleción en la copia episomal (factor F) del gen *lacZ (lacZΔM15)* se complementa mediante la adición de un péptido α funcional codificado por el vector pGEMT [115].

5.1.3 Obtención del AES en el vector pYUB54

Para la obtención final del AES, se usó la estrategia de doble clonación de las secciones A Y B en el vector pYUB854, el que cuenta con sitios resolvasa

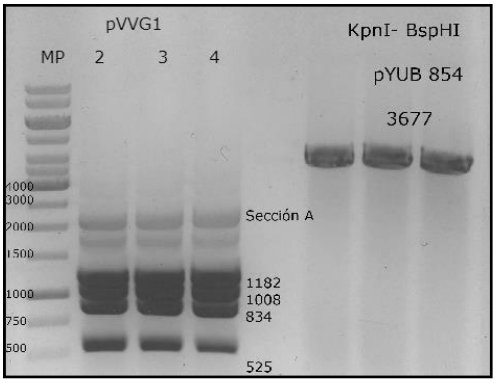
flanqueando el gen de resistencia antibiótica para la selección de recombinantes (cassette de HygR), para de esta forma facilitar hacia futuro la obtención de mutantes desmarcados.

Normalmente el sistema pYUB854 se almacena en *E. coli* que es carente del genotipo RecA+, es decir, que no presenten actividad γδ-resolvasa, por lo que se utilizó la cepa HB101 (RecA-). Aunque HB101 codifica un gran número de endonucleasas que podrían dificultar la extracción del plásmido, la extracción del mismo se realizó en presencia de proteinasa K para inhibir estas endonucleasas endógenas.

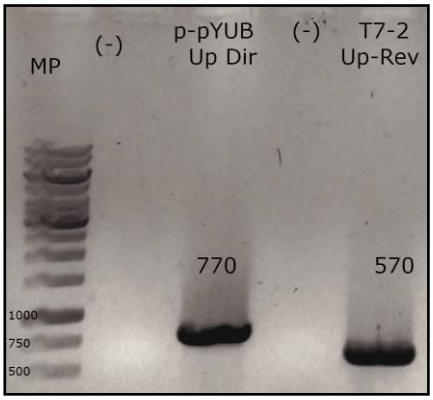
La sección A (corriente arriba del gen *mmpL7*) se obtuvo mediante digestión con BspHI y KpnI a partir de pVVG1 (**Figura 5-4**-H y **Figura 5-6**-A), la que posteriormente se ligó en pYUB854 digerido con las mismas enzimas, permitiendo una clonación dirigida de la sección en la orientación que se encuentra en el genoma. Los productos de ligación obtenidos probando relaciones molares vector: inserto (1:3 y 1:5) fueron confirmados por PCR usando los iniciadores pYUB854/ mmpL7 Up Dir y T7-2/ mmpL7 Up Rev (**Figura 5-6**-B), indicando que el plásmido recombinante fue obtenido satisfactoriamente. La transformación del producto de ligación en células de *E. coli* HB101 produjo 9 colonias, de las que 3 resultaron recombinantes (**Figura 5-6**-C).

El plásmido recombinante construido se nombró como pVVG3, (**Figura 5-6**-D), los que fueron corroborados mediante pcr y mapeo de restricción con las enzimas BspHI y KpnI (**Figura 5-6**-E y F). En la doble digestión para liberar el inserto, en la Figura 28-f carril 3, se observa una banda de mayor tamaño (4229pb) que corresponde al fragmento del plásmido que libero el inserto correspondiente a la Sección A cuyo tamaño se ubica en 531pb demostrando que el plásmido pVVG3 contiene el inserto clonado. Se seleccionó la colonia 1 para almacenar en medio de conservación y corroborar por secuenciación.

A.

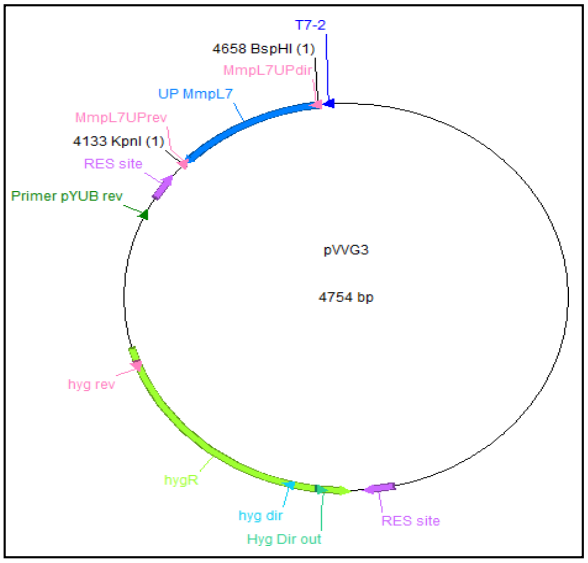

pVVG1
MP
2
3
4
KpnI- BspHI
pYUB 854
3677
Sección A
1182
1008
834
525
1000
750
500

B.


MP
(-)
p-pYUB
Up Dir
(-)
T7-2
Up-Rev
770
570
1000
750
500

C.

D.


T7-2
4658 BspHI (1)
MmpL7UPdir
UP MmpL7
MmpL7UPrev
4133 KpnI (1)
RES site
Primer pYUB rev
pVVG3
4754 bp
hyg rev
hygR
hyg dir
Hyg Dir out
RES site

E.

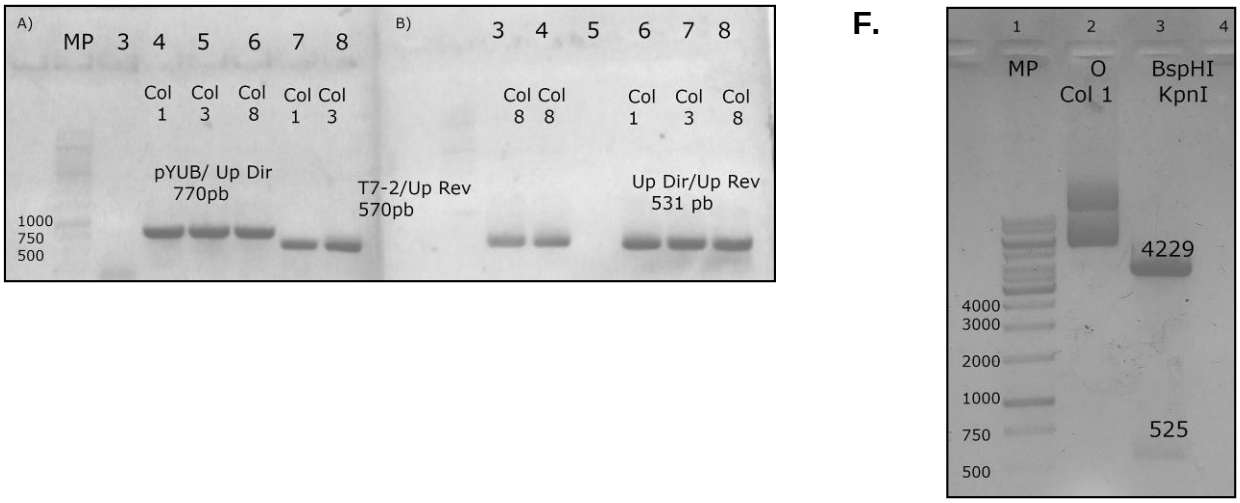
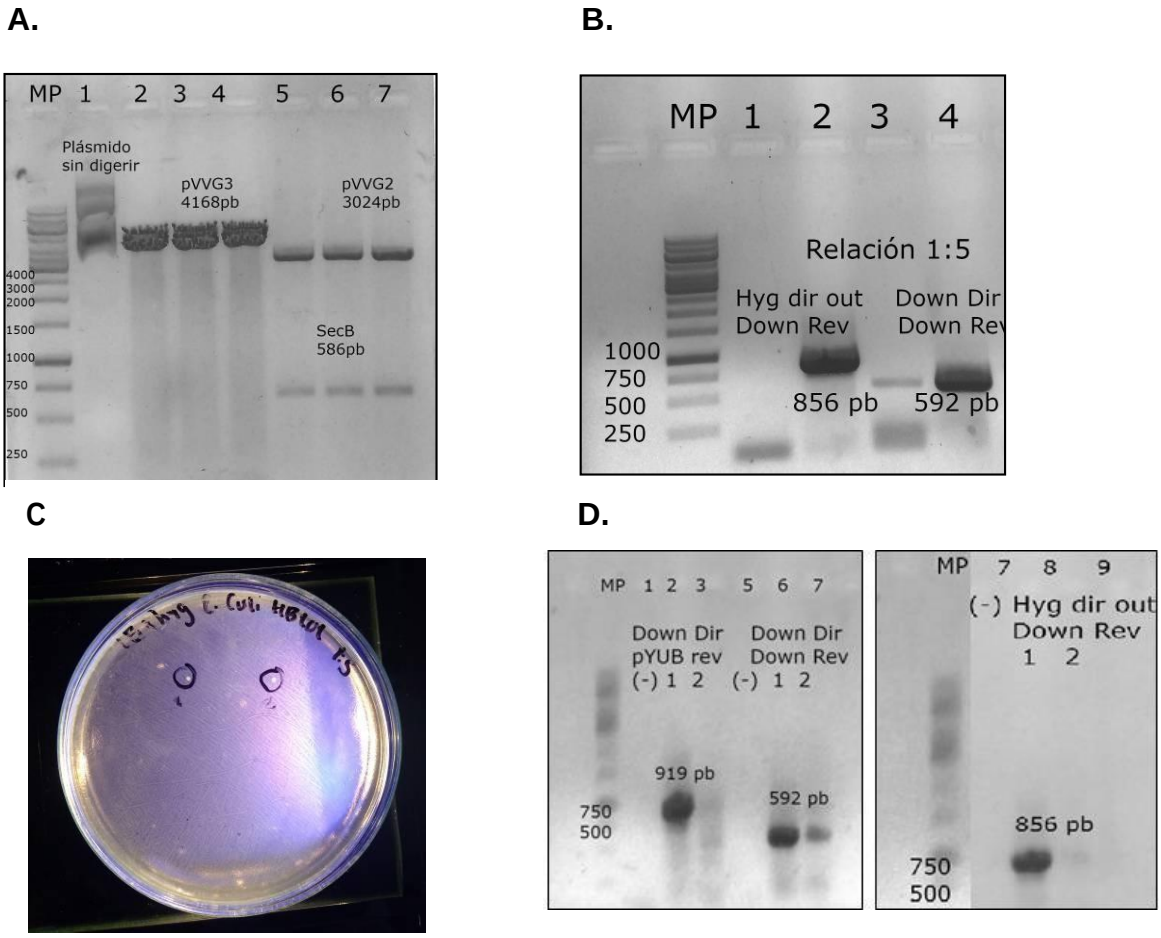


Figura 5-6. Construcción de pVVG3 EN EL VECTOR pYUB854 a) Digestión del plásmido intermedio pVVG1 y el plásmido de clonación pYUB854 con las enzimas BspHI y KpnI. En los carriles 2,3 y 4 se muestra un fragmento en 525 pb que corresponde a la liberación de la sección A, el fragmento en 3677 pb corresponde al vector pYUB linealizado. **b)** PCR de confirmación de los productos de ligación de la relación 1:5. **c)** Colonias recombinantes obtenidas de la transformación del producto de ligación relación 1:5 y células de *E. coli* HB101. **d).** Mapa de pVVG3 con iniciadores y sitios de restricción empleados para su análisis. **e)** PCR de confirmación de colonias recombinante (Carriles 4, 5, 6, 7,8 Gel A y carriles 3, 4, 6, 7,8 Gel B). **f)** Mapeo de restricción de pVVG3 con las enzimas BspHI y KpnI (Carril 3), en el carril 1 se muestra el plásmido sin digerir con las enzimas. El mapeo de restricción *in silico* de pVVG3 se muestra en la Figura A-3 (**Figura 7-2**)

Una vez confirmada la inserción de la sección A (pVVG3), este mismo plásmido recombinante se utilizó para realizar una segunda clonación del segmento B (corriente debajo del gen *mmpL7*) entre los sitios HindIII y XhoI del vector. El segmento B fue obtenido inicialmente a partir de pVVG2 mediante restricción con las mismas enzimas (**Figura 5-7**-A). La ligación del segmento B en pYUB584 se realizó utilizando las relaciones molares vector e inserto (1:3 y 1:5). Las ligaciones se verificaron por PCR (**Figura 5-7**-B) confirmando la presencia de plásmido recombinante, el que se transformó en *E. coli* HB101 obteniendo dos colonias (**Figura 5-7**-C). Las colonias obtenidas se tamizaron por PCR resultando solo una

positiva (**Figura 5-7**-D), la que se nombró pVVG4. A continuación se extrajo el plásmido recombinante para su corroboración por secuenciación (Anexo 7.4).

Finalmente, este plásmido PVVG4 se analizó por PCR para comprobar la presencia de la sección A y la sección B (**Figura 5-7**-E). Por mapeo de restricción con las enzimas BspHI y KpnI se corroboró la inserción de la sección A en el recombinante, y con las enzimas HindIII y XhoI la inserción de la sección B. Por otra parte, con una digestión doble con BspHI y XhoI se obtuvo la totalidad del AES linealizado. El tamaño del AES (3048 pb) se comprobó por secuencia nucleotídica (**Figura 5-7**-F). En La (**Figura 5-8**) se puede observar un esquema general de la obtención del AES.



E. **F.**

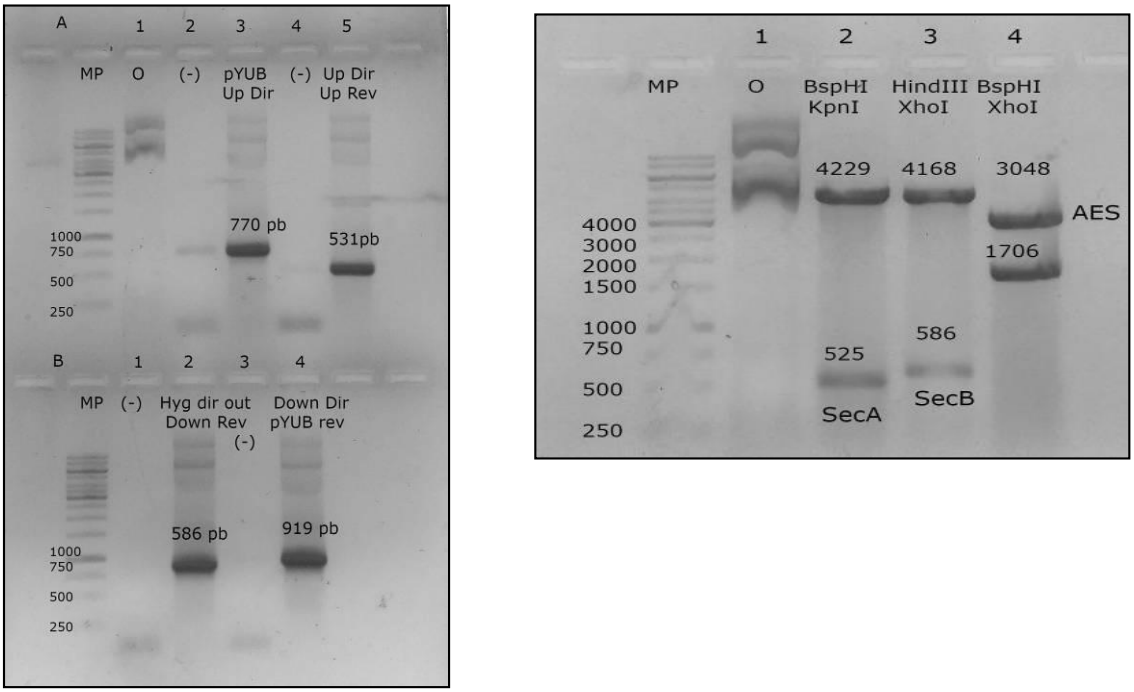


Figura 5-7. Obtención de pVVG4 conteniendo la sección B y confirmación de AES mmpL7 a) Digestión del plásmido intermedio pVVG2 y el recombinante pVVG3 con las enzimas HindIII y XhoI. En los carriles 5,6 y 7 se muestra un fragmento en 586 pb que corresponde a la liberación de la sección B, el fragmento en 4168 pb corresponde al plásmido pVVG3 linealizado. **b)** PCR de confirmación de los productos de ligación de la relación 1:5. **c)** Colonias recombinantes obtenidas de la transformación del producto de ligación relación 1:5 y células de *E. coli* HB101. **d)** PCR de confirmación de colonias recombinantes, se observa que la colonia 1 amplifica positivamente para todas las comprobaciones. **e)**. PCR de confirmación de inserción de las secciones A y B en el plásmido pVVG4. (Carril 1 del gel A muestra el plásmido sin digerir. **f)** Mapeo de restricción sobre el plásmido pVVG4 para confirmar presencia de la sección A y B y para corroborar construcción del AES linealizado del gen *mmpL7***.** El mapeo de restricción *in silico* de pVVG4 se muestra en la Anexo (**Figura 7-2**)

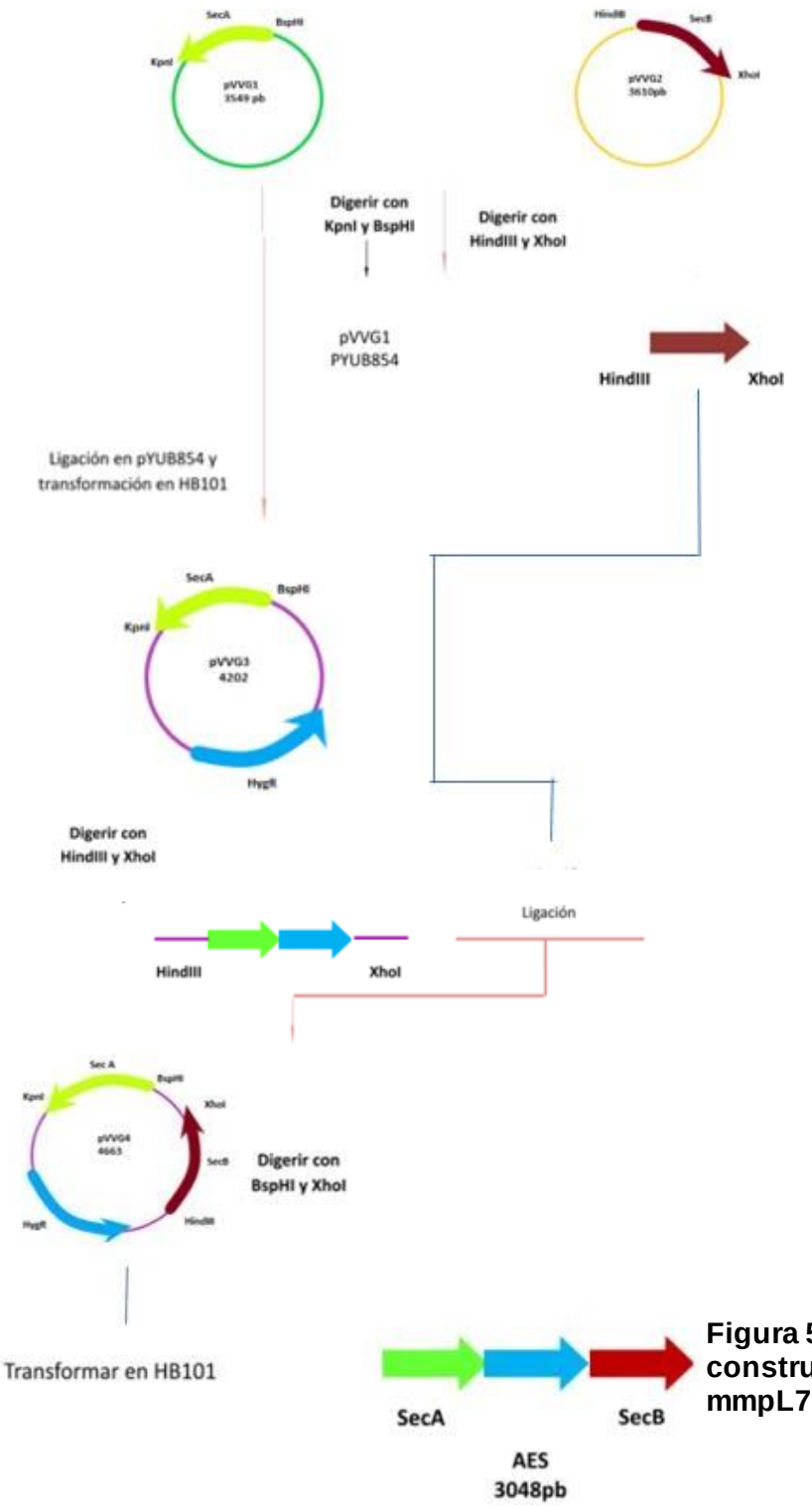


Figura 5-8. Esquema general de la construcción del AES del gen mmpL7

5.2 Cepa de recombinanción *de Mtb*H37Rv

Para obtener la cepa de recombinanción, *MtbH37Rv* se transformó con el plásmido pJV53 (Protocolo 3), que contiene los genes para expresar las proteínas de recombinación bajo el control de un promotor de acetamida. Las bacterias transformadas con este plásmido aumentan la frecuencia de recombinación homóloga lo que parcialmente dificulta la de manipulación genética que tiene el género *Mycobacterium* debido a su alta frecuencia de recombinación ilegitima.

Los recombinantes de *Mtb*H37Rv:pJV53 fueron seleccionados en medio de crecimiento Middlebrook 7H10 OADC suplementado con kanamicina. Mediante PCR de colonia se confirmó la identidad de algunas bacterias recombinantes, utilizando los iniciadores TM903 A/Tm 903 B que amplifican el cassette de kanamicina, y los iniciadores pJV53_comp_dir/ pJV53_comp_rev que amplifican para el plásmido pJV53 (**Figura 5-9**). Se observaron las bandas esperadas de 846 pb y en 670 pb, respectivamente, confirmando la obtención de la cepa recombinante.

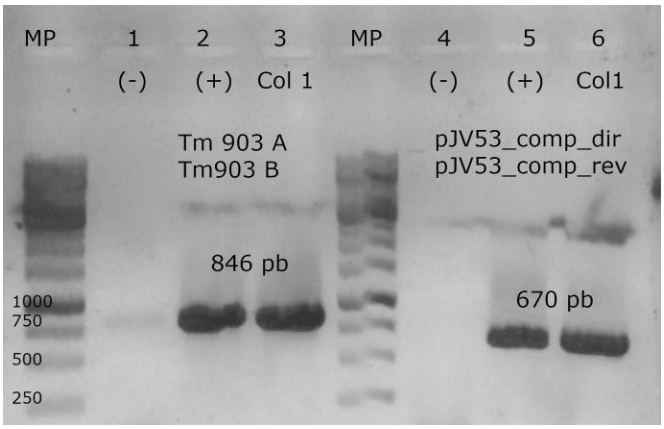


Figura 5-9. Confirmación de la recombinación en las cepas por PCR de colonia. Se amplificó un fragmento de 846bp del cassette de resistencia a Km con los iniciadores Tm903, y se confirmó la presencia del plásmido pJV53 con los iniciadores pJV53_comp en 670pb. Carriles: MP, marcador de peso molecular; Carril: 1 y 4 control negativo (cepa silvestre de M. tuberculosis H37Rv cepa silvestre), Carril 2 y 5 control positivo (plásmido pJV53), Carril 3 y 6 colonias de *M. tuberculosis* H37Rv:pJV53.

Finalmente, para la obtención del mutante defectivo en el gen *mmpL7,* la cepa recombinante obtenida se transformó con 200 ng del AES de *mmpL7* previamente construido.

5.3 Obtención del mutante de *Mtb*H37Rv defectivo en el gen *mmpL7*

La estrategia que se utilizó fue el intercambio alélico mediado por las proteínas gp60 y gp61 del micobacteriófago Chec9c, las que promueven el reemplazo de un gen en el genoma (en nuestro caso *mmpL7*) por un casete de resistencia *Hyg* (*Hyg*^{R}) [108].

Inicialmente se obtuvo la cepa de recombinación de MtbH37Rv, la que se transformó con el sustrato de intercambio alélico (AES, por sus siglas en inglés) que se caracteriza por contener un casete de Hyg^R flanqueado por aproximadamente 500 pb de las secuencias corriente arriba y abajo del gen a mutar. Durante el evento de recombinación, la proteína gp60 actua como exonucleasa en dirección 5´--3´ del AES lineal, permitiendo la exposición de una sola de sus cadenas. Sobre la cadena sencilla resultante, la proteína gp61 ejerce su acción recombinasa entre el ADN cromosomal y el AES.

La (**Figura 5-10**-A) muestra el esquema de la región del genoma de *MtbH37Rv* donde ocurrió el intercambio entre el gen *mmpL7* y el casete de *Hyg*. Se indican los iniciadores empleados para hacer la comprobación del genotipo mutante.

A.

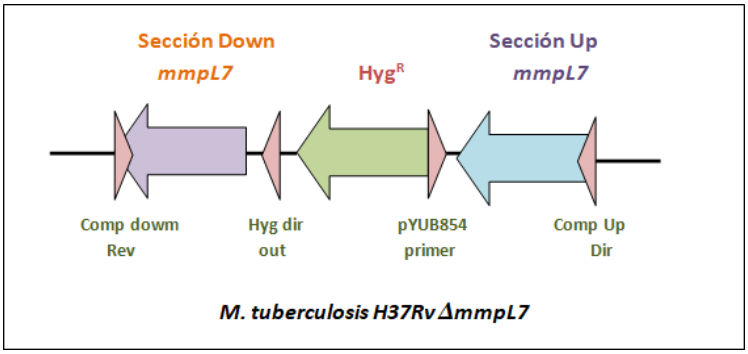
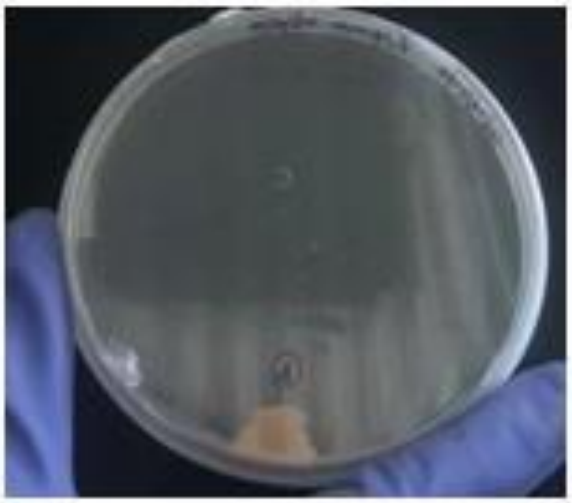


Figura 5-10. Comprobación del genotipo mutantede M. tuberculosis H37Rv ΔmmpL7
A. Representación de la región del genoma de *Mtb*H37Rv donde ocurrió la sustitución de *mmpL7* por el casete de Hyg. Los iniciadores usados para la comprobación del genotipo mutante son mostrados (PCR positivas en colonias mutantes).

Luego de la transformación de la cepa recombinante con el AES, se obtuvieron dos colonias posiblemente recombinantes (**Figura 5-10**-B). A continuación, se procedió a la comprobación de la deleción del gen *mmpL7* en la región genómica de *H37Rv.* Para tal fin, mediante PCR se comprobó la recombinación del AES utilizando los iniciadores MmpL7 Down directo/ MmpL7 Down reverso que amplifican para un fragmento de 592pb, y los iniciadores mmpL7 Up directo/mmpL7 Up reverso para un fragmento de 525 pb, (**Figura 5-10**-C). Por otro lado, se usaron iniciadores para



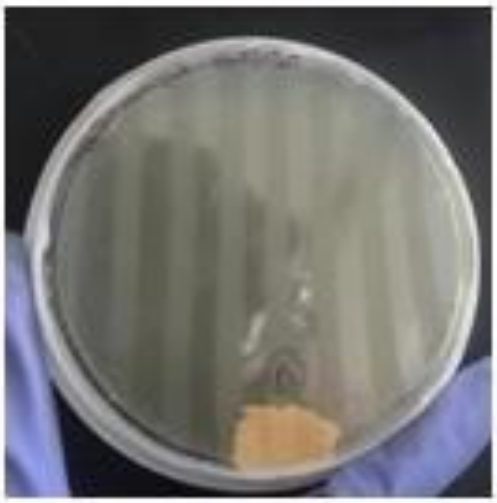


Figura 6-10 (Continuación). B. Obtención de posibles colonias recombinantes de *MtbH37Rv* transformadas con el AES del gen *mmpL7.* Se observa en ambas colonias (A y B) la caracterización fenotípica clásica de una micobacteria, textura rugosa y agregación granular.

comprobar la sustitución del gen *mmpL7* por la higromicina en el genoma de *Mtb* (**Figura 5-10**-D)

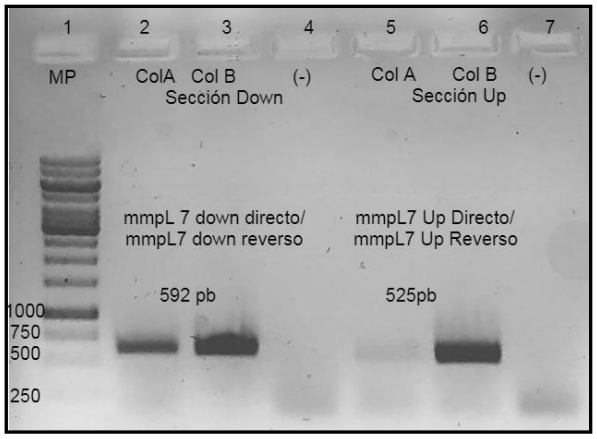


Figura 6-10 (Continuación). C. PCR de confirmación de AES en colonias recombinantes. Mediante la técnica de PCR se logro comprobar que el AES del gen *mmpL7* se integró en el genoma, dando como resultado posibles colonias recombinantes. Se observa que la colonia B presenta amplificaciones más claras para las secciones Down y Up del AES, específicamente en los amplimeros de 592pb y 525 pb respectivamente.

Figura 6-10 (Continuación) D. PCR sobre DNA genómico de *H37RvΔmmpL7*. Por medio de PCR se compruéba la presencia de genotipo mutante. Las pruebas de comprobación se realizan sobre las colonias A y B respectivamente usando los iniciadores corriente arriba y corriente debajo de las secciones A y B que anillan con segmentos del AES del gen *mmpL7*.Para comprobar presencia de AES en la sección corriente arriba se emplean los iniciadores Comp up dir/ primer pYUB que amplifican para un fragmento de 1255pb y Comp Up dir/mmpL7 Up reverso que amplifica para un fragmento de 1005 pb. De igual modo, para comprobar la inserción del AES corriente abajo, se emplearon los

iniciadores Comp down rev/ Hyg dir out que amplifica para un fragmento de 1259 pb y Comp down rev/mmpL7 down directo que amplifica para un segmento de 955 pb.

De acuerdo con el resultado anterior, como resultado la pruebas de PCR para comprobar la recombinación del AES, las dos colonias obtenidas (A y B) resultaron poseer el genotipo mutante. Este resultado confirma que el evento de recombinación entre el AES del gen *mmpL7* y el cromosoma de la bacteria tuvo éxito en la integración de la sección a delecionar.

5.4 Desmarcaje de cepas mutantes de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*

La producción de mutaciones definidas en *M. smegmatis y M. tuberculosis* a través de útiles génicos como los AES se basan en la transferencia de un cassette de resistencia antibiótica en el genoma de estas bacterias; la presencia de un marcador de selección en el cromosoma representa una ventaja ya que permite por un lado la fácil selección de la mutación y por otro lado el seguimiento de una cepa recombinante específica en experimentos que pueden mezclar varias cepas; sin embargo, el uso de marcadores de selección de resistencia antibiótica presenta varios inconvenientes, uno de ellos, es que tienen un efecto en la expresión de genes que pueden dificultar la caracterización del rol de cada gen presente en un operon, otro de los inconvenientes es que la integración de un cassette de resistencia a antibiótico en el cromosoma excluye este marcador para una mayor manipulación genética, teniendo en cuenta que solo hay unos pocos genes de resistencia para las micobacterias y ya que las mutaciones realizadas en estas bacterias suelen generar estrategias de compensación mediante la síntesis de un homólogo, serían necesarias múltiples mutaciones y experimentos de complementación para descifrar el papel biológico de una proteína o una familia de proteínas, en estos casos, el número tan reducido de marcadores de resistencia a antibióticos disponibles para las micobacterias es una limitación [8], siendo solo la

kanamicina y la higromicina los dos antibióticos que se usan en la actualidad para experimentos genéticos con cepas del complejo *Mycobacterium tuberculosis.*

Con el propósito de producir mutaciones sin marcar, entre los sistemas resolvasa que se han caracterizado se encuentran el sistema TnpR y el sitio *res* del transposón γδ [116].

La resolvasa del sistema TnpR funciona como un mediador que se expresa cuando el promotor corriente arriba del gen *tnpR* cataliza la escisión del cassette de resistencia a antibióticos para generar una cepa bacteriana sensible al antibiótico correspondiente [8]. De este modo, las cepas mutadas con el AES correspondiente contienen en su cassette de resistencia a higromicina sitios *res* que lo flanquean y que pueden ser escindidos tras la expresión de un gen resolvasa que se expresa a partir de un plásmido multicopia [8]

De acuerdo con lo anterior y con el objetivo de obtener mutantes desmarcados, se implemento la técnica de desmarcaje a cepas mutadas de *M. smegmatis y M. tuberculosis* usando plásmidos que contienen actividad γδ resolvasa que identifican los sitios *res* que flanquean la higromicina.

5.4.1 Experimento piloto de desmarcaje de un gen de resistencia a higromicina en micobacterias

La estrategia para eliminar el gen de resistencia a Hyg introducido previamente en la obtención de mutantes de *Mtb* defectivos en ATPasas tipo P, fue la de transformar las cepas mutadas con el plásmido pGH542. Este plásmido presenta una actividad $\delta\gamma$ resolvasa que identifica los sitios *res* incorporados al genoma de la bacteria durante la recombinación con el sustrato de intercambio alélico. Los sitios *res* son secuencias reconocidas por el transposón $\delta\gamma$ resolvasa, TnpR. Esta estrategia permite delecionar el marcador antibiótico dejando solo la mutación no marcada en el cromosoma. Con el objetivo de generar cepas mutadas en un sitio específico que no lleven ningún marcador de resistencia a los antibióticos, los plásmidos que contienen el transposon $\delta\gamma$ resolvasa deben ser fácilmente curables [8].

Antes de trabajar directamente con cepas de *Mtb*, decidimos inicialmente probar el sistema seleccionado con un mutante de *M. smegmatis* defectivo en el gen *msmeg_5014,* construido previamente por León Torres en nuestro grupo de investigación [117], que codifica para una cobre ATPasa (**Figura 5-11**)

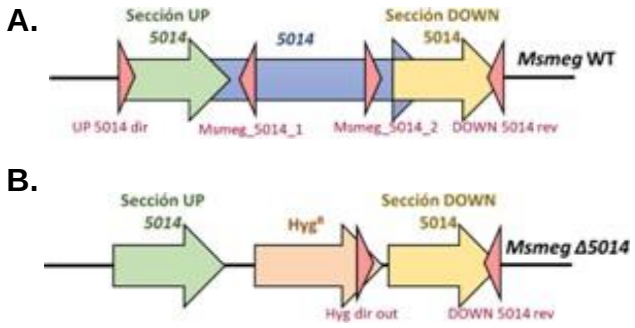


Figura 5-11. Esquema de la región del genoma de M. smegmatis mc2155. A) Esquema del genotipo silvestre de *M. smegmatis* mc^{2}155 antes de ser reemplazado por el cassette de resistencia a higromicina. **B)** Esquema del genotipo mutado de la cepa *M. smegmatis* mc^{2}155 *msmeg_5014 luego* de la sustitución por el cassete de higromicina. Imagen tomada y modificada de León Torres 2018 [143].

Inicialmente se corroboró mediante PCR la presencia e integridad del plásmido pGH542 a utilizar en el desmarcaje, que se sabe contiene un promotor de choque térmico hsp60. En la (**Figura 5-12**-A) se muestra la PCR de comprobación sobre el plásmido pGH542 realizada con los iniciadores hsp60_promotor_dir y hsp60_promotor_rev que amplifican en 334 pb.

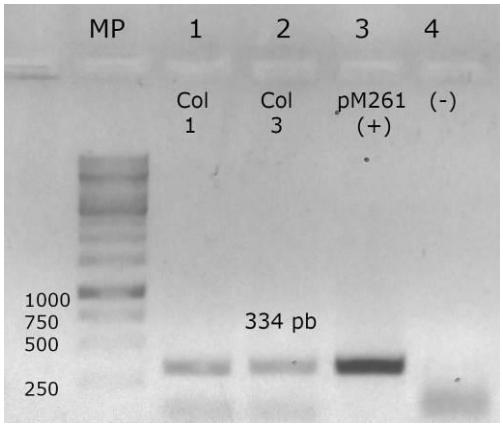


Figura 5-12. PCR de comprobación del plásmido pGH542 con los iniciadores hsp60_promotor_dir y hsp60_promotor_rev. Carriles 1 y 2 plásmido extraído de colonias transformadas, carril 3 control positivo pM261.

A continuación, la cepa mutante mc^{2}155 Δ*msmeg_5014*, se electroporó con el plásmido pGH542, el que presenta resistencia al antibiótico tetraciclina. Producto de la transformación, se obtuvieron 6 colonias, a las que se les corroboró la deleción del cassette de Hyg mediante PCR utilizando los iniciadores Up 5014 dir y primer pYUB y Down 5014 Rev y Hyg dir out. Estos iniciadores anillan en el gen de resistencia antibiótica, por lo tanto, una PCR negativa indica un desmarcaje exitoso (**Figura 5-12**-B).

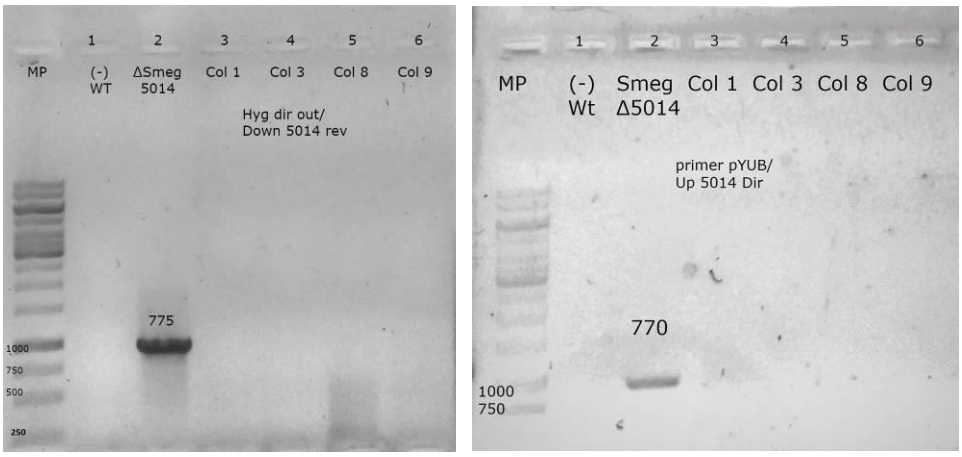


Figura 5-12 (Continuación). PCR de comprobación de colonias desmarcadas de mc^{2}155 Δ*msmeg_5014* con el plásmido pGH542 que presenta actividad resolvasa. El carril 1 muestra como control negativo la cepa silvestre ya que esta no presenta higromicina en su genoma. El carril 2 muestra las amplificaciones para cada uno de los iniciadores que

contiene el AES y que anillan para la higromicina. Los carriles del 3 al 6 muestran las colonias obtenidas con la transformación con el plásmido y que se desmarcaron.

La comprobación fenotípica del desmarcaje, se realizó cultivando las colonias obtenidas en medio Middlebrook 7H10 OADC suplementado con tetraciclina (para comprobar que efectivamente tuvieran el plásmido incorporado), ciclohexamida (tolerancia natural de las micobacterias), e higromicina (resistencia de la cepa sin desmarcar), como se muestra en la (**Figura 5-12**-C).

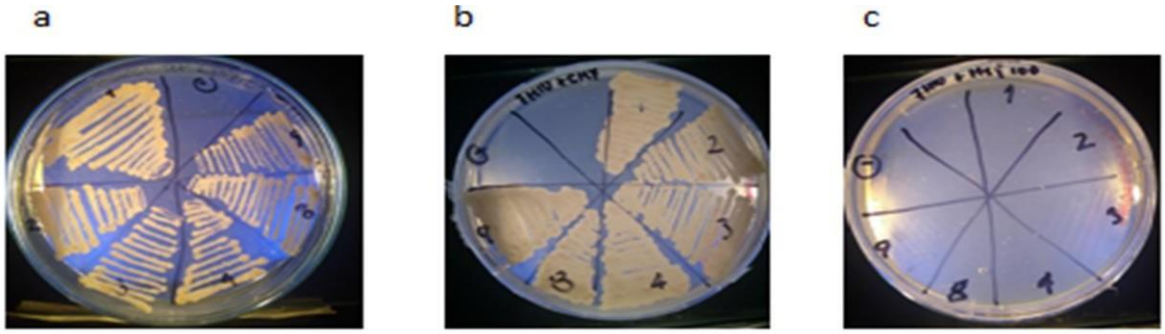


Figura 5-12 (Continuación). Cultivo en medio Middlebrook 7H10 OADC de las colonias desmarcadas. a) Medio de selección Middlebrook 7H10 OADC suplementado con Tetraciclina (Tet 2.5 ng/µL) b. Medio de selección Middlebrook 7H10 OADC suplementado con Ciclohexamida (CHX 100ng/µL) c. Medio de selección Middlebrook 7H 10 OADC suplementado con Higromicina (Hyg 100ng/µL)

De acuerdo con los resultados obtenidos, se comprobó la eliminación de la resistencia a Hyg de la cepa mc^{2}155 Δ*msmeg_5014,* comprobando que el plásmido pGH542 puede escindir eficientemente el marcador de selección.

Para futuras investigaciones con esta cepa (mc^{2}155 Δ*msmeg_501* Hyg -) y de ser necesario, la remoción del plásmido pGH542 se haría a través de pases sucesivos suplementando el medio Middlebrook 7H9 OADC únicamente con ciclohexamida para que en ausencia de la tetraciclina el plásmido sea abortado por la micobacteria al no encontrarse en un medio de selección que le permita seguir replicándose.

5.4.2 Desmarcaje de *M. tuberculosis* H37Ra *ΔctpF* y *ΔctpH*

La experiencia aprendida en el desmarcaje de resistencia antibiótica en *M. smegmatis*, se aplicó para comprobar su funcionamiento, pero ahora en cepas de *Mtb*.

Para este fin, ~~se escogieron plásmidos que presentaran actividad resolvasa y funcionan en cepas de *Mtb*, específicamente los plásmidos pCG124 y pWM19~~ desarrollados por el Instituto de Farmacología y Fiología Estructural de Francia [8].

El plásmido pCG124 fue seleccionado porque contiene el transposón $\delta\gamma$ resolvasa *(tnpR)* que será finalmente lo que determine su actividad como plásmido de desmarcaje. En este caso el gen de la resolvasa se encuentra bajo el control de un promotor micobacteriano pBlaf* lo que permite que se pueda transformar en cepas de micobacterias. También contiene un origen de replicación en *E. coli,* y un cassette de resistencia a kanamicina lo que facilita utilizar este plásmido en cepas mutantes carentes de pJV53, ya que al momento de hacer la selección antibiotica, creceran las cepas que solo contengan el plásmido con la actividad resolvasa, evitando la presencia de falsos positivos al momento de hacer el tamizaje de las cepas desmarcadas. Es por esto, que la ausencia del plásmido pJV53 con resistencia antibiotica a la kanamicina se hace imprescindible para hacer una correcta selección de mutantes no marcados.

El otro plásmido pWM19 además de presentar las características anteriormente descritas, como los orígenes de replicación tanto en *E. coli* como en micobacteria y contener el gen del transposón $\delta\gamma$ resolvasa *(tnpR)* contiene además genes de resistencia a higromicina y a gentamicina lo que permite usarlo en cepas mutantes que contienen el plásmido pJV53. También contiene el marcador de contraselección sacB y un replicón micobacteriano termosensible lo que permite que una vez sea transformado dentro de las cepas mutantes, pueda ser después fácilmente expulsado (**Figura 5-13** A-B).

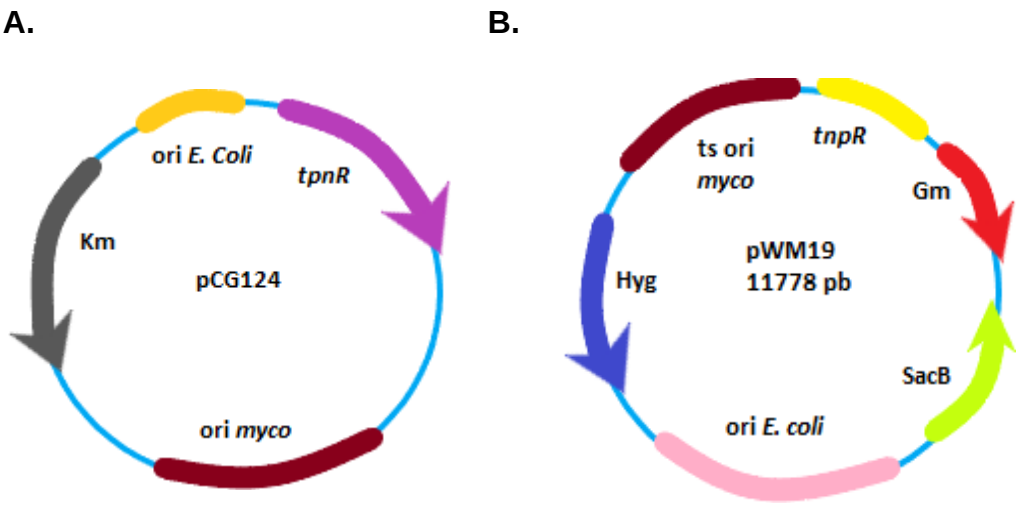


Figura 5-13. Mapa de los plásmidos usados para desmarcar cepas mutantes de *Mtb*
a) Mapa del plásmido pCG124. **b)** Mapa del plásmido pWM19.

Los plásmidos fueron inicialmente transformados en cepas de *E. coli* DH5α (Protocolo 4) y plaqueadas en medio LB-agar suplementado con el antibiótico respectivo. Las colonias obtenidas (**Figura 5-14** A-B) se analizaron mediante PCR.

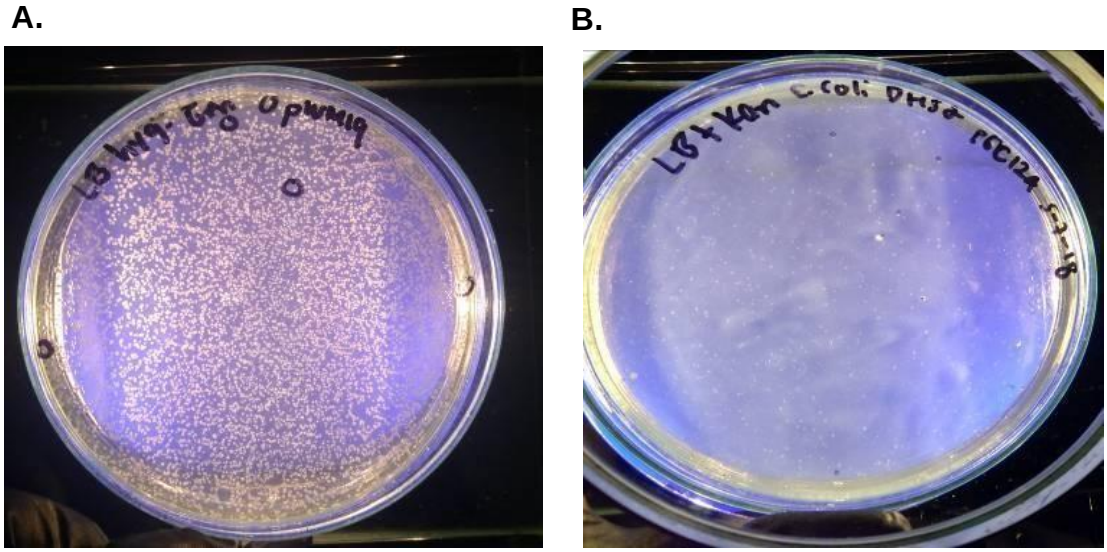


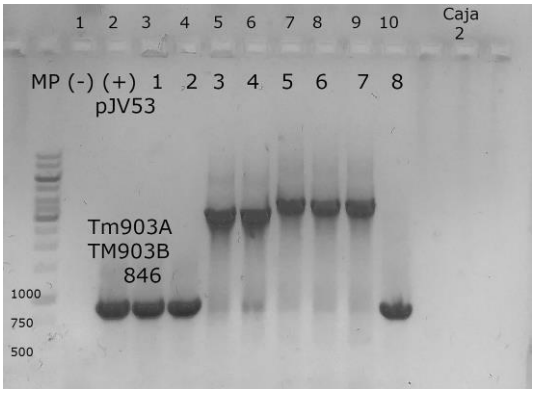
Figura 5-14. Colonias recuperadas de la transformación del plásmido pWM19 y pCG124. A) Colonias recuperadas de la transformación con el plásmido pWM19 en medio LB agar suplementado con Hyg 100µg/mL y Gm 15 µg/mL. **B)** Colonias recuperadas de la transformación con el plásmido pCG124 en medio LB agar suplementado con Km 25µg/mL.

Para comprobar la presencia del plásmido pCG124 mediante PCR, se utilizaron los iniciadores Tm903A y Tm903B que anillan en el cassette de resistencia a kanamicina, y amplifican un amplimero de 846pb. De acuerdo con la (**Figura 5-14**-C), las colonias 1,2 y 8 mostraron la presencia de pCG124, por lo que se seleccionó la colonia 2 para conservación.

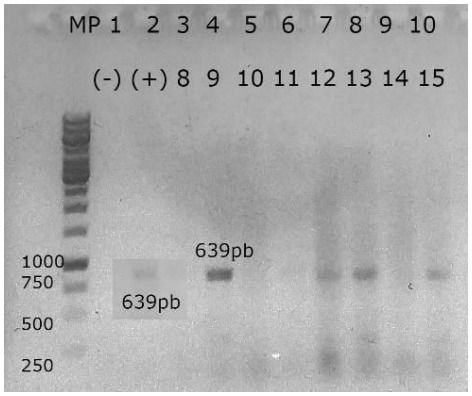
Para comprobar la presencia del plásmido pWM19 por PCR, se utilizaron los iniciadores Hyg dir y Hyg rev que anillan en el cassette de higromicina produciendo un fragmento de 639pb. En este caso solo una colonia (colonia 9) mostró un resultado positivo (**Figura 5-14**-D).

Finalmente, la amplificación con los iniciadores δresolvasa dir y δresolvasa rev, que amplifican un fragmento en 835pb del gen resolvasa en pCG124 y pWM19 (**Figura 5-14**-E) mostraron amplificación posivita con ambas colonias seleccionadas.

C.



D.



E.

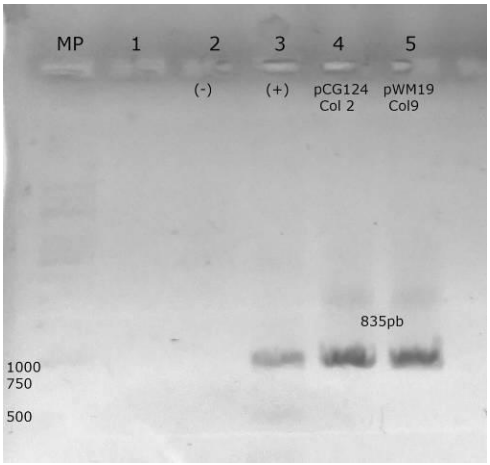


Figura 6-14 (Continuación). Análisis por PCR de los plásmidos pCG124 y pWM19. C) PCR de hervido de las colonias 1 a la 8 transformadas con el plásmido pCG124. Carril 2 control positivo plásmido pJV53, carriles 3,4 y 10 muestran la amplificación en 846pb que corresponde al fragmento esperado. **D)** PCR de hervido de las colonias 8 a la 15 transformadas con el plásmido pWM19. Carril 2 control positivo pYUB853, carril 4 tiene sembrado el extracto del hervido de la colonia 9 y muestra la banda esperada para esta amplificación. **E)** PCR sobre extractos de hervido de la colonia 2 de pCG124 y la colonia 9 de pWM19 que amplifican para el gen resolvasa de ambos plásmidos. Carril 2 control positivo pYUB854.

El paso siguiente consistió en transformar las cepas mutantes con estos plásmidos para eliminar la resistencia antibiótica introducida al mutar mediante recombinación.

Se probó inicialmente con la cepa mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* construida previamente en nuestro grupo [113] para una investigación que se encuentra en curso. Este ensayo tuvo doble propóstio: 1) comprobar si el plásmido a usar desmarca satisfactoriamente las cepas mutantes en este caso un mutante en una ATPasa tipo P; 2) generalizar un protocolo que pueda ser aplicado a mutantes de la cepa virulenta.

Por lo tanto, la cepa mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* se transformó con 300ng del plásmido pCG124 (Protocolo 3), y los transformantes fueron después recuperados en medio

Middlebrook 7H10 OADC suplementado con kanamicina y ciclohexamida. La cepa mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* debe estar desprovista del plásmido pJV53 (confiere resistencia a kanamicina) para no generar un resultado falso positivo.

Luego de la transformación se recuperaron 3 colonias que se repicaron a medio Middlebrook 7H9 OADC suplementado con kanamicina µg/mL. Para comprobar que se eliminó la resistencia higromicina, las colonias también se repicaron a medio middlebrook 7H9 OADC con higromicina 100µg/ml (**Figura 5-15**-A). Los resultados obtenidos sugieren entonces que las cepas mutantes de *Mtb*Ra *ΔctpF* perdieron su cassette de resistencia a higromicina.

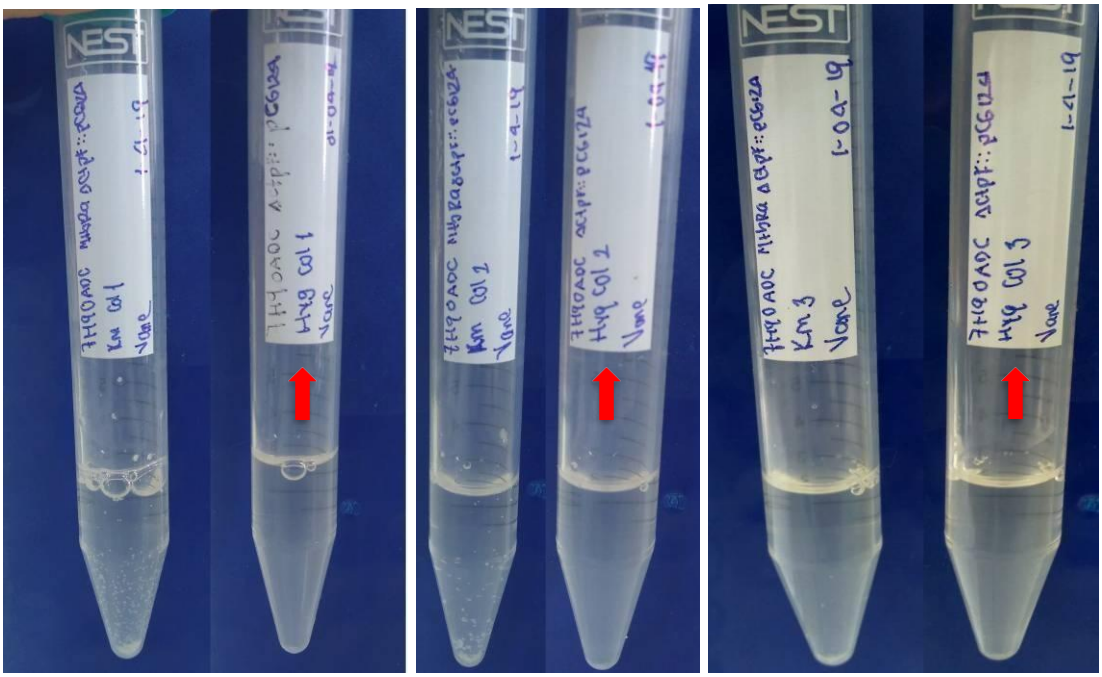


Figura 5-15. Representación del crecimiento de colonias con diferente tratamiento
a) Colonias 1,2 y 3 repicadas a medio líquido Middlebrook 7H9 OADC suplementado con el antibiótico respectivo kanamicina o higromicina para verificar el desmarcaje en la cepa mutante *Mtb*Ra *ΔctpF*. Los tubos marcados con Hyg (flecha roja) demuestran que las colonias obtenidas después de la transformación con el plásmido pCG124 no crecieron en este antibiótico.

La ausencia del gen de resistencia a Hygromicina (Hyg) también se comprobó mediante PCR utilizando iniciadores que anillan en este gen (**Figura 5-15**- B).

B)

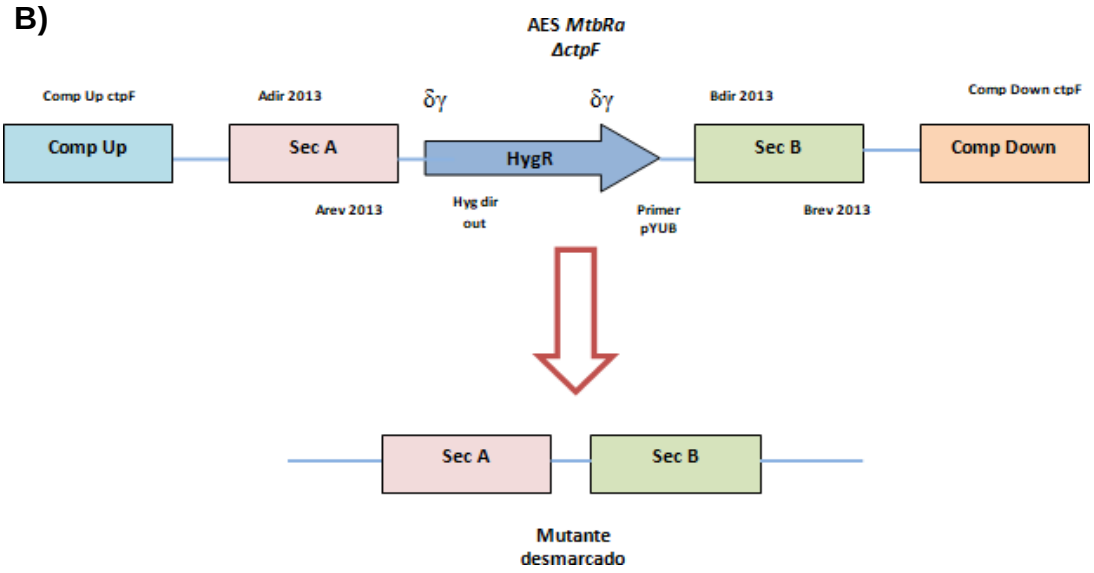


Figura 5-15 (Continuación). B. Esquema representativo del mutante de MtbRa ΔctpF y su posterior desmarcaje. La imagen muestra el esquema de la inserción del cassete de higromicina entre las secciones A y B del gen ctpF flanqueado por las secciones δγ resolvasa del vector pYUB854, se muestran también los iniciadores para hacer las comprobaciones por PCR del genotipo desmarcado.

Los análisis por PCR se realizaron usando la pareja de iniciadores Adir2013/Hyg dir out y compdownctpF/primer pYUB. La primera pareja amplifica para una sección del cassete de higromicina y la segunda amplifica para parte de la sección resolvasa, (**Figura 5-15**- C). Se observó amplificación para el control (mutante sin desmarcar), mientras que las tres colonias desmarcadas no muestran amplificación para ninguna de las parejas de iniciadores.

C.

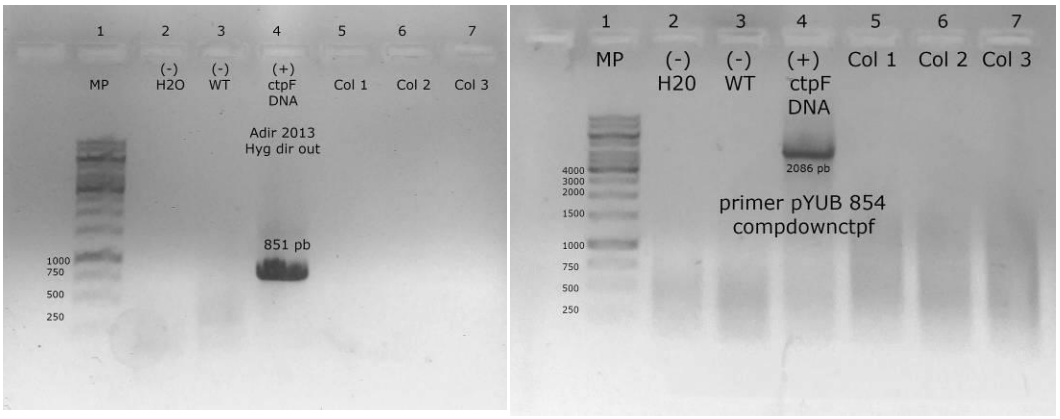


Figura 6-15 (Continuación). C. PCR de confirmación de colonias desmarcadas del mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* con el plásmido pCG124. La figura muestra el análisis por PCR de colonia a las tres colonias obtenidas, en los carriles 2 de ambos geles se muestra un control negativo de los reactivos de la PCR y los carriles 3 muestran el control negativo de la PCR, se usa la cepa silvestre (carente de gen de resistencia a higromicina). El carril 4 de ambos geles corresponde al mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* que contiene el cassette de higromicina; en los carriles 5,6 y 7 se muestran los extractos de los hervidos de las colonias 1,2 y 3. Para la amplificación del control positivo del gen de la derecha se uso DMSO al 10%.

Una de las tres colonias (la colonia 1) fue seleccionada para corroborar el genotipo mutante mediante secuencia de ADN (Anexo B-5). Esta misma colonia fue sometida a cultivo de diluciones seriadas con el objetivo de retirar el plásmido pCG124 del mutante *Mtb*Ra *ΔctpF*. Para retirar el plásmido de desmarcaje es necesario hacer tres pases sucesivos de la colonia mutante ya desmarcada en medio Middlebrook 7H9 OADC suplementado con ciclohexamida (CHX), cada uno de estos pases necesita de 20 a 30 días de crecimiento. La (**Figura 5-15**-D) muestra los tres pases realizados a la colonia 1 del mutante *Mtb*Ra *ΔctpF* desmarcado.

D.

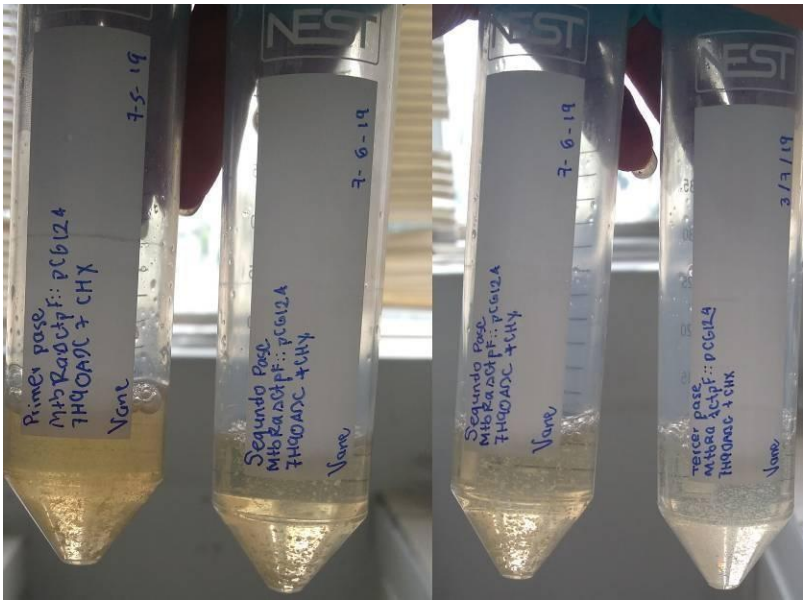


Figura 5-15 (Continuación). D. Pases sucesivos para retirar el plásmido pCG124 del mutante *Mtb*Ra *ΔctpF*. Los pases se hicieron tomando 1µL de cultivo de la colonia mutada y desmarcada, que se diluyó en 10 mL de medio líquido 7H9 OADC suplementado con CHX 10µg/mL.

Se propone a partir de este paso hacer diluciones seriadas desde 10^{-0} hasta 10^{-5} en medio Middlebrook 7H10 OADC suplementado con CHX 10 µg/mL, esperando tres o cuatro semanas su crecimiento. Una vez obtenidas las colonias se repicarón en medio Middlebrook 7H9 OADC suplementado con CHX y con Km para comprobar si alguna de las colonias mutantes y desmarcadas abortó el plásmido pCG124. Finalmente se corrobora por PCR utilizando las parejas de iniciadores Tm903A/Tm903B que amplifican dentro del cassette de resistencia a kanamicina si las colonias obtenidas expulsaron el plásmido pCG124.

Toda la anterior estrategia también se utilizó para desmarcar una cepa de *Mtb* H37Ra delecionada en el gen CtpH, que codifica para una ATPasa tipo P encargada del eflujo de Na^+/K^+ en *Mtb*.

La **Figura 5-16** muestra el esquema del genotipo mutante de *Mtb*Ra *ΔctpH* junto con los iniciadores utilizados para comprobar la presencia del AES, y la eliminación del cassette de resistencia a Hygromicina (Hyg).

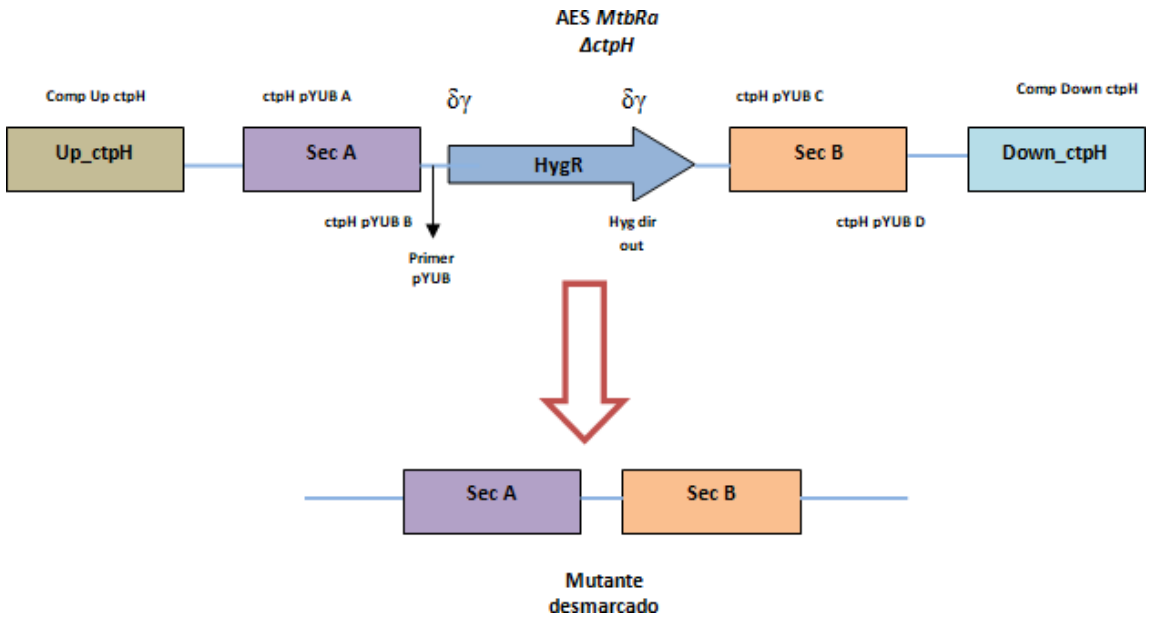


Figura 5-16. Esquema de la cepa mutante MtbRa ΔctpH mostrando los iniciadores empleados para hacer las comprobaciones sobre las cepas transformadas con el plásmido

pWM19 El esquema muestra la inserción del cassete de higromicina entre las secciones A y B del gen ctpH flanqueado por las secciones δγ resolvasa del vector pYUB854.

Luego de transformar el mutante *Mtb*Ra *ΔctpH* con el plásmido pWM19 las células se plaquearon en medio Middlebrook 7H10 OADC suplementado con kanamicina (Km) 20µg/mL y genamicina (Gm) 10µg/mL respectivamente.

Los análisis por PCR se realizaron en 9 colonias usando la pareja de iniciadores ctpH pYUB D/ Hyg dir out y ctpH pYUB A/ primer pYUB (Figura 38-b). La primera pareja amplifica para una sección del cassete de higromicina y la segunda pareja amplifica parte de la sección resolvasa.

La imagen 34b muestra que existe amplificación para el mutante control (que contiene la higromicina), mientras que las nueve colonias obtenidas no muestran amplificación para ninguna de las parejas de iniciadores.

B.

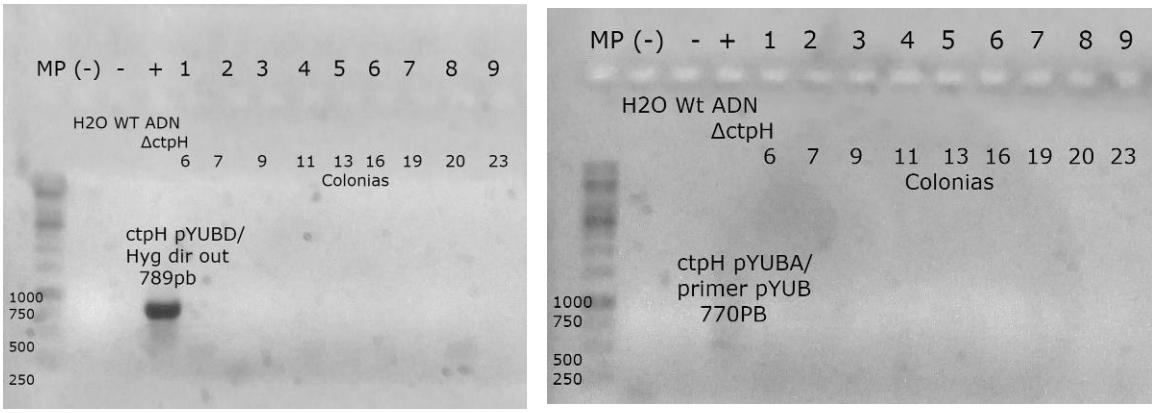


Figura 5-16 (Continuación). B. PCR de confirmación de colonias desmarcadas del mutante *Mtb*Ra *ΔctpH* con el plásmido pWM19. La figura muestra el análisis por PCR de colonia de las 9 colonias obtenidas, en los ambos geles se muestra un control negativo (H_2O) y otro control negativo que consiste en la cepa silvestre. Los carriles del 1 al 9 muestran los extractos de los hervidos de las colonias obtenidas después de la transformación.

De acuerdo con este resultado, se escogió la colonia 6 para hacer una nueva verificación de control de desmarcaje por lo que fue necesario hacer una extracción

de plásmido (Protocolo 6) haciendo PCR con los mismos iniciadores. En la (**Figura 5-16**-C) se muestran los resultados de este nuevo análisis.

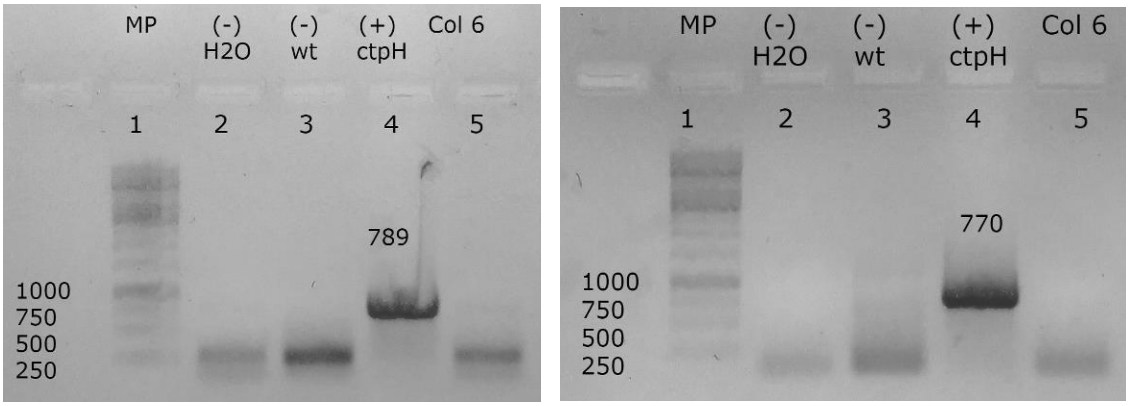


Figura 5-16 (Continuación). C. PCR sobre el plásmido extraído de la colonia 6 producto de la transformación del mutante *Mtb*Ra *ΔctpH* con el plásmido pWM19. En los carriles 5 de ambos geles se muestra como no hay amplificación para los iniciadores que anillan en el cassette de higromicina y en las secciones resolvasa como si se muestra para el control positivo correspondiente para el ADN genómico del mutante *Mtb*Ra *ΔctpH..*

Como los resultados fueron positivos para la colonia 6 se almaceno en medio de conservación y se hizo secuenciación de su extracto de ADN.

Los resultados anteriores demuestran que ambos plásmidos pCG124 y pWM19 tienen actividad $\delta\gamma$ resolvasa, escindiendo el marcador antibiótico higromicina incorporado al genoma de las bacterias mutantes, lo que los hace útilies para desmarcar resistencia antibiótica en mutantes de *Mtb*, para nuestro caso, en genes que codifican para ATPasas tipo P.

La eliminación de la marcación antibiótica supone un avance para comprobación de los genotipos mutantes que se quieren incorporar en la creación de vacunas vivas atenuadas; sin embargo, se hizo complicada la expulsión de los plasmidos de desmarcaje en los mutantes construidos, ya que se requieren pases sucesivos de las colonias obtenidas en medios que no contengan los antibióticos de selección

de estos plásmidos. Para la expulsión del plasmido pCG124, se hace necesario suplementar el medio de crecimiento Midelbrok 7H9 OADC solo con CHX y hacer 4 o 5 pases sucesivos, lo que conlleva mas de 2 meses de experimentación, ya que la cepa *Mtb* es de lento crecimiento. Por otro lado, la expulsión del plásmido pWM19, requiere condiciones experimentales diferentes a las planetadas por el plásmido pCG124, ya que para su expulsión se hace necesario suplementar el medio de crecimiento Midelbrok 7H9 OADC con CHX y sacarosa debido a que este plasmido tiene un marcador de contraselección sacB y un replicón termosensible que necesita incubarse a 39°C, bajo estas condiciones, se aseguraría su expulsión, sin embargo, debido al tiempo de crecimiento de *Mtb*, los tiempos de experimentación prolongan más la investigación.

Para la construcción de cepas doblemente mutadas, cada mutación debe tratarse por separado en cuanto a la eliminación de los marcadores de selección antibiótica, ya que la presencia de diferentes marcadores (tanto del AES, como de la cepa de recombineria, como de los plasmidos de desmarcaje) supondría errores en la metodología de eliminación de marcadores de selección debido a la cantidad y la variedad de antibióticos necesarios para en un primer momento retener los plasmidos en las cepas mutantes y mantener la estructura del AES en el esqueleto del vector lanzadera que contiene el gen de resistencia a Hygromicina.

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

La construcción de útiles génicos para obtener cepas mutantes de *Mtb* es una herramienta sencilla y eficaz para delecionar genes relacionados con la patogenicidad y la virulencia de estas bacterias. Por lo tanto, la construcción de sustratos de intercambio alélico (AES) permite no sólo ensamblar los genes dentro de un vector lanzadera que se integra al genoma sustituyendo el gen de interés por un marcador de selección, sino que estos útiles amplían el espectro de modificación génica actuando no sólo en cepas atenuadas como H37Ra sino que también pueden usarse en cepas virulentas como H37Rv, lo que facilita su construcción y manipulación en condiciones de bioseguridad tipo III.

La obtención de un mutante *MtbRv ⊿mmpL7* se hizo posibles gracias la técnica de recombinación, demostrando que es una técnica sencilla y aplicable para modelos de lento crecimiento como *Mtb* y que permite la manipulación del genoma de las bacterias para la generación de cepas mutantes.

Por otro lado, la ventaja de construir el AES sobre un vector como pYUB854 que ofrece sitios con actividad resolvasa es que el marcador de selección antibiótica higromicina puede ser delecionado con plásmidos que tengan actividad $\delta\gamma$ resolvasa como se comprobó con los mutantes tanto de *Mtb* H37Ra (*MtbRa ΔctpF* y MtbRa *ΔctpH*) como con el mutante mc^{2}155 Δ*msmeg_5014* de *Mycobacterium smegmatis*. Los mutantes demostraron a través de pruebas genotípicas que los plásmidos pGH542, pCG124 y pWM19 tienen la capacidad de escindir los mutantes marcados con higromicina, permitiendo en primera instancia dejar mutantes listos para recibir una segunda mutación, esto en caso de hacer el tratamiento para la

expulsión de los plásmidos de desmarcaje antes de introducir una segunda mutación.

6.2 Perspectivas

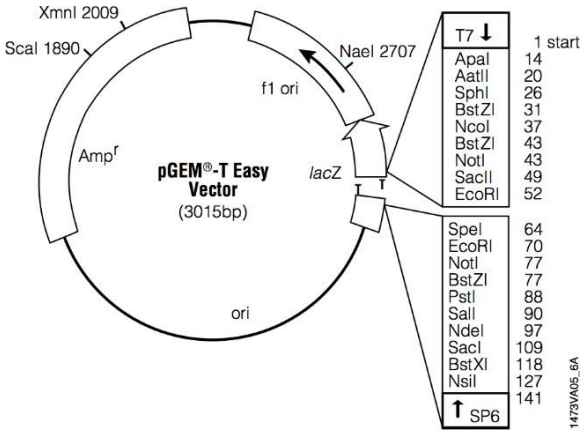
A corto plazo demostrar que el mutante obtenido *Mtb*Rv⊿*mmpL7* presenta deficiencia en la translocación y biosíntesis de PDIM, un lípido extraíble asociado con la patogenicidad de *Mtb*, estos ensayos permitirán establecer si el mutante puede ser usado para la construcción de cepas doblemente mutadas.

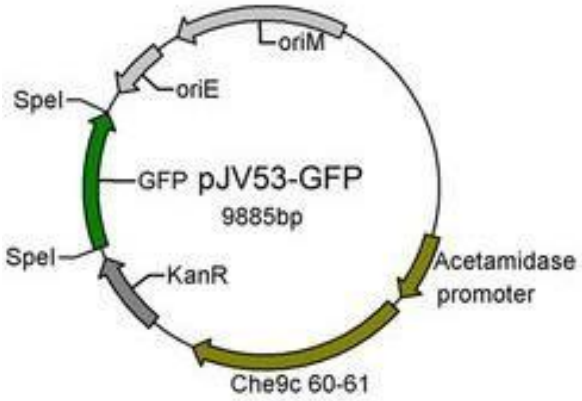
A mediano plazo se pretende implementar la metodología de eliminación del casete de resistencia antibiótica en las cepas mutantes construidas en nuestro grupo de investigación, incluyendo el mutante *MtbRv⊿mmpL7* para plantear una estrategia que permita la construcción de cepas sin resistencia antibiótica que puedan ser usadas en ensayos de modelos *in vivo.*

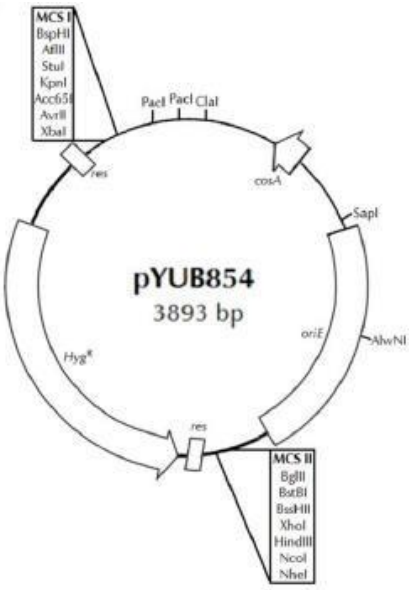
A largo plazo se espera construir un mutante doble de *Mtb* en el gen *mmpL7* implicado en el transporte y biosíntesis de PDIM y una ATPasa tipo P implicada en la homeostasis iónica que podría ser candidato de estudio en fases preclínicas y clínicas durante el desarrollo de una vacuna atenuada contra la TB.

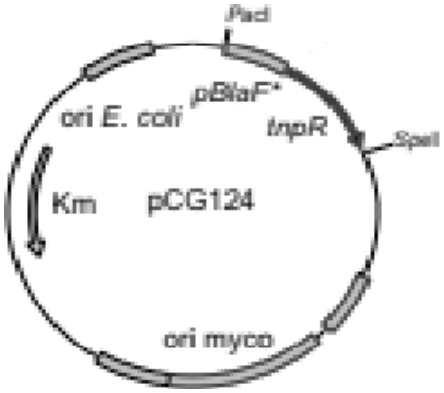
7. Anexos: Material suplementario

Figura 7-1. Mapas de plásmidos usados en el desarrollo de la tesis.


XmnI 2009
ScaI 1890
NaeI 2707
f1 ori
Amp^r
pGEM®-T Easy Vector
(3015bp)
lacZ
ori
T7
1 start
ApaI 14
AatII 20
SphI 26
BstZI 31
NcoI 37
BstZI 43
NotI 43
SacII 49
EcoRI 52
SpeI 64
EcoRI 70
NotI 77
BstZI 77
PstI 88
SalI 90
NdeI 97
SacI 109
BstXI 118
NsiI 127
141
SP6
1473VA05_6A


oriM
oriE
SpeI
GFP
pJV53-GFP
9885bp
SpeI
KanR
Acetamidase promoter
Che9c 60-61


MCS I
BspHI
AflII
StuI
KpnI
Acc65I
AvrII
XbaI
PacI PacI ClaI
res
cosA
SapI
pYUB854
3893 bp
oriE
AlwNI
Hyg^R
res
MCS II
BglII
BstBI
BssHII
XhoI
HindIII
NcoI
NheI


PacI
pBlaF*
ori E. coli
tnpR
SpeII
Km
pCG124
ori myco

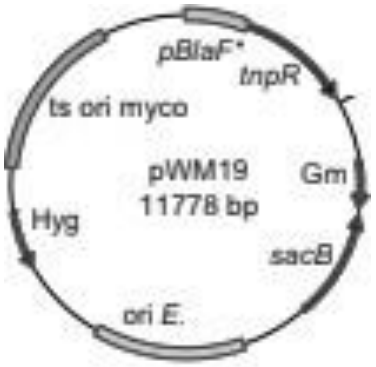

pBlaF*
tnpR
ts ori myco
pWM19
11778 bp
Gm
Hyg
sacB
ori E.

Figura 7-2. Mapeos in silico de los plásmidos trabajados en la investigación A. Digestión in silico del plásmido pVVG3 **B.** Digestión in silico del plasmido pVVG4

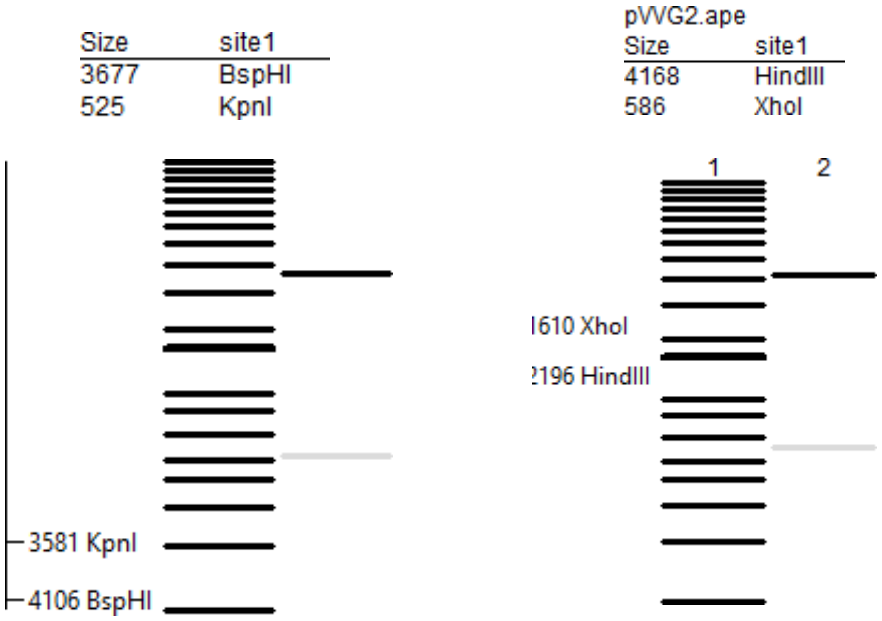


Figura 7-3. Información de marcadores de peso molecular.

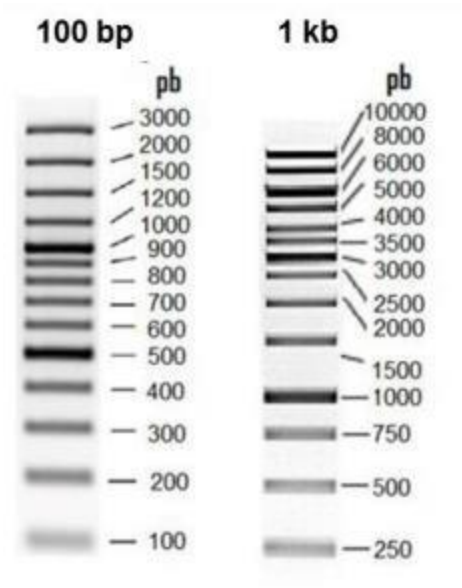


Figura 7-4 Alineamiento del resultado de secuenciación de p VVG2 y la secuencia esperada. El primer resultado es la secuencia obtenida al usar el iniciador Up Dir

```
AG------------------------------GGTCTTGGGCTAAGAACGGGGCGACTCAGGTTTCGTCACCGATGGGCAAAATGTTCATCATCGGTCGG>81    Secuencia
AGATTGTCACCCCTTCGCCGGGCACACCCGAAGGTCCTTGGCTAAGAAC-GGGCGACTCAGGTTTCGTCACCGAT-GGCAAAATGTTCATCATCGGTCGG<4557  Esperado

       *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
AATCAAAGATCTCCTAATTGTGTACGGACGCAACCACTCCCCCGACGACATCGAGGCAACGATCCAGGAGATCACCCGCGGGCGCTGCGCGGCGATCTCG>181
A-TCAAAGATCTCCTAATTGTGTACGGACGCAACCACTCCCCCGACGACATCGAGGCAACGATCCAGGAGATCACCCGCGGGCGCTGCGCGGCGATCTCG<4458

       *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GTTCCCGGTGACCGCAGCACCGAAAAGCTGGTCGCCATTATCGAACTCAAGAAGCGTGGCGACTCAGATCAGGACGCGATGGCTAGACTGGGCGCTATTA>281
GTTCCCGGTGACCGCAGCACCGAAAAGCTGGTCGCCATTATCGAACTCAAGAAGCGTGGCGACTCAGATCAGGACGCGATGGCTAGACTGGGCGCTATTA<4358

       *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
AACGCGAAGTCACGTCGGCTTTATCGAGTTCGCACGGTCTCAGCGTCGCGGATCTGGTTCTGGTTGCGCCTGGCTCGATCCCCATTACCACCAGCGGGAA>381
AACGCGAAGTCACGTCGGCTTTATCGAGTTCGCACGGTCTCAGCGTCGCGGATCTGGTTCTGGTTGCGCCTGGCTCGATCCCCATTACCACCAGCGGGAA<4258

       *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGTCAGGAGAGGGGCGTGTGTCGAGCAATATCGACAGGATCAATTCGCCCGCTTGGATGCCTAGTCCGGCTGGCCGTCTACACAGAATTCGGTATATCCG>481
GGTCAGGAGAGGGGCGTGTGTCGAGCAATATCGACAGGATCAATTCGCCCGCTTGGATGCCTAGTCCGGCTGGCCGTCTACACAGAATTCGGTATATCCG<4158

       *         *         *         *         *                   *         *         *         *
TTTGAAAAAGTCCTCCCCGGGTACCAGAGCTCACCTAGGTATCTAGAACCGGTG------TATCCTAAATCAAATATCGGACAAGCAGTGTCTGTTATAA>575
TTTGAAAAAGTCCTCCCCGggtaccagagctcacctaggtatctagaaccggtgcgcgtgtatcctaaatcaaatatcggacaagcagtgtctgttataa<4058

   *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CAAAAAATCGACTTAATAAACACATTAACAGCACTGTTTTTATGTGTGCGATAATTTATAATATTTCGGACGGTTGCTAGTGAGGTCTGCCTCGTGAAGA>675
caaaaaatcgacttaatagacacattaacagcactgtttttatgtgtgcgataatttataatatttcggacggttgctagtgaggtctgcntcgtgaaga<3958
```

Figura 7-5 Alineamiento del resultado de secuenciación de p VVG2 y la secuencia esperada. El primer resultado es la secuencia obtenida al usar el iniciador Down rev

```
                                                  *         *         *         *         *
--------------------------------------------------GACAATTTTCGACAGCGCGGAGGTGTAGAGGGCAGCGGCGTGTTGTTG 67     Secuencia
                                                  ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
accgtacgtctcgagCGTCATATCAGTCGCACCAGCCCCCGCAAGGCTCCGTGACAATTTTCGACAGCGCGGAGGTGTAGAGGGCAGCGGCGTGTTGTTG 1700   Esperado
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

  *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CCAGGGCGGGGGTCGAGGTCGTTCGATCGGTGACGGTGGCCGGCGACGGAGATGGGCTGGTGCTTGGCCTGAGCGCCATGTGCGATGTGGCGTCGTTCAT 167
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CCAGGGCGGGGGTCGAGGTCGTTCGATCGGTGACGGTGGCCGGCGACGGAGATGGGCTGGTGCTTGGCCTGAGCGCCATGTGCGATGTGGCGTCGTTCAT 1800
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

  *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGGCGCCGTCGCCCAACGTGAACTCAGGGCGGAAAATTGGCGCCGGATTTCGCCCTCAGTGCACGCTCGGCACCGGTTTAACTTCACGCGGTCAACGTGA 267
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGGCGCCGTCGCCCAACGTGAACTCAGGGCGGAAAATCGGCGCCGGATTTCGCCCTCAGTGCACGCTCGGCACCGGTTTAACTTCACGCGGTCAACGTGA 1900
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

  *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
ACTCGGACACGTCGAGGTCATCCTTTGGGCAGCGTGGAAACGCCCATCATCCAAAGACCTCGAACCCTACCCCGGGCAACGGCGCGCCGACCACTCACCC 367
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ACTCGGACACGTCGAGGTCATCCTTTGGGCAGCGTGGAAACGCCCATCATCCAAAGACCTCGAACCCTACCCCGGGCAACGGCGCGCCGACCACTCACCC 2000
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

  *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGCCAACAACTGGCAACCCCTACCAAGTGTGGTGTCTGCGATGGGGGATCGTCGTCGGCCAGCCGAGCGTGGCATGGGGTCTCGAACAGGCGGTCAACGC 467
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
GGCCAACAACTGGCAACCCCTACCAAGTGTGGTGTCTGCGATGGGTGATCGTCGTCGGCCAGCCGAGCGTGGCATGGGGTCTCGAACAGGCGGTCAACGC 2100
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

  *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CGCCCTGGCGTGGTCGGAAGCCACGCTCGCTGCACCGTGATCAGCACGCCCAGACCGAGCACAACAACCGTGCCAATCTGACTGAGCACGCTGAAAAGCT 567
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
CGCCCTGGCGTGGTCGGAAGCCACGCTCGCTGCACCGTGATCAGCACGCCCAGACCGAGCACAACAACCGTGCCAATCTGACTGAGCACGCTGAAaagct 2200
```

Figura 7-6 Alineamiento del resultado de secuenciación de *Mtb*Ra *ΔctpF* y la secuencia esperada. El primer resultado es la secuencia obtenida al usar el iniciador Fmc2Dir

```
-------------------------------------------------------------------------------------------CTAGG------- 9
                                                                                          |||||
gccgagatcgccttcgacgaggcatcgcgccgcggcgtggacttggtggcgctgcacgcgtggagcgacatgggccccctcgactttcctaggctcaatt 500
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

------------------------------------------------------------------------------------------------------ 10

gggcgccgatcgaatggagaaacctcgaagacgagcaggagaaaatgctcgcccggcgtctgagcggatggcaagaccggtatcccgatgtcgtcgtgca 600
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

------------------------------------------------------------------------------------------------------ 10

caaagtcgtggtgtgcgatcgaccggcaccccgcctgctcgaattggcacaaaccgctcagcttgtggtggttggcagccacggccgcgggggttcccc 700
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

------------------------------------------------------------------------------------------------------ 10

ggcatgcatctcggctcagtcagcagagcggtggtcaattccggtcaggctccggttatcgtcgcccgaatcccccaagatccggcagtgccggcctgag 800
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

------------------------------------------------------------------------------------------------------ 10

ggcctgtgcgatctgctcgggtggtgcccacccgcgcggaaagccccgtccgaaccgtgattgggcaacgtcgggccgggccagcagcgctggaccgtag 900
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

------------------------------------------------------------------------------------------------------ 10

gtccctgcagtggatgacttacggccctgatccacaccggcgaccgttaggcagggttgagccaaccgtcggttgagcgtctggctgcgaggtgaggtga 1000
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

                         *         *         *         *         *
--------------------------CGGCTCATCATGGCTTGCCAGCACATGAAGTGGTGCTGCTGCTGGA~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~~ 55
                         |||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ttgtcggcgtcagtgtctgccacgacggctcatcatggcttgccagcacatgaagtggtgctgctgctggagagcgatccatatcacgggctgtccgacg 1100
          *         *         *         *         *         *         *         *         *         *
```

Secuencia Esperado

Figura 7-7. Alineamiento del resultado de secuenciación de *Mtb*Ra *ΔctpH* y la secuencia esperada. El primer resultado es la secuencia obtenida al usar el iniciador Hrev1

```
----------------------------AGATCT------------------------------------------------------------------ 9
                            |||||||
gtcatggtaatacgactcactagtgggcagatcttcgaatgcatcgcgcgcaccgtacgtctcgaggacccggttgtggtggttatttgccaagatatgt 3099
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

-------------------------------------------------------------------------------------------------- 10

ccggtggcgataaccagggcgaccggccagtcgatgagttcgagggcagcgagtgccgccagacctccgtagtaggccaggtgctctggccgcggaatct 2999
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

                                          *         *         *         *         *         *
----------------------------------------CGCTTCGCGGATCTTAGCCACGGCCTCACGCTGAGATGTCGCTCGACGCGTATTCTTTTC 69
                                        ||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
tcacttggccgcagatcgggaggttcatcacaatagtctccgcttcgcggatcttagccacggcctcacgctgagatgtcgctcgacgcgtattcttttc 2899
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

*         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGCCATCATTTGCCTTTCAGTAACGAAGGGTTTGCCGTTGTGCAGGGTGGTGCGGTCACCGTCGGGGGTATGTCGACGAGGACCGATGCGCTGGCGGACC 169
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ggccatcatttgcctttcagtaacgaagggtttgccgttgtgcagggtggtgcggtcaccgtcgggggtatgtcgacgaggaccgatgcgctggcggacc 2799
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

*         *         *         *         *         *         *         *         *         *
CTTTGGCTTCGTCGTTTGCCTTGTTGCTGACGGTGCCTTTACTGGAGCTTTACGCCGTGCTGTGGCGCGTCGGCGTCGTCGAGGTCCGGGGGGCGCACCG 269
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ctttggcttcgtcgtttgccttgttgctgacggtgcctttactggagctttacgccgtgctgtggcgcgtcggcgtcgtcgaggtccgggggggcgcaccg 2699
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

*         *         *         *         *         *         *         *         *         *
GGGGACGCGTCGCGGGAAAGCGCATCGGTCTCGGGTGGTTGCGGGTTCGGCTGGCCCGATTTGTCCCGACCCGTCAGCACACGGTAAGCTTCCCATGGTG 369
||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||||
ggggacgcgtcgcgggaaagcgcatcggtctcgggtggttgcgggttcggctggcccgatttgtcccgacccgtcagcacacggtaagcttcccatggtg 2599
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

*         *         *         *
CGCGTGCTAGCAACCGTCCGAAATATTATAAATTAT------------------------------------------------------------------ 405
|||||||||||||||||||||||||||||||||||
cgcgtgctagcaaccgtccgaaatattataaattatcacacacataaaaacagtgctgttaatgtgtctattaagtcgatttttgttataacagacact 2499
        *         *         *         *         *         *         *         *         *         *

-------------------------------------------------------------------------------------------------- 406
```

Secuencia Esperado

7.2 Divulgación y presentaciones en eventos científicos

Los resultados de la presente investigación han sido dados a conocer en instancias nacionales e internacionales con una aceptación muy positiva. Los resultados de la investigación han sido presentados en eventos y reuniones científicas:

- Presentación tipo expocisión en el X Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis, realizada entre el 28- 30 de abril de 2021 (Sesión virtual)
  Título: Unmarked Mycobacterium tuberculosis strains defective in P-type ATPases as potential live attenuated vaccines"
  Autores: Vanessa Vásquez Godoy, Carlos Yesid Soto Ospina.

- Presentación tipo Poster en el XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, realizado en Santiago de Chile entre el 13 y el 16 de noviembre de 2018.
  Título: Construcción de un mutante de *Mycobacterium tuberculosis* defectivo en el transporte de dimocoseroto de ftiocerol y producción de un mutante no marcado de *Mycobacterium smegmatis*.
  Autores: Vanessa Vásquez Godoy, Carlos Yesid Soto Ospina.

- Presentación tipo poster en el III Congreso Colombiano de Bioquímica y Biología Molecular, realizado en Bogotá entre el 1 y el 3 de noviembre de 2018.

  Título: Desarrollo de útiles génicos para la obtención de un doble mutante de *Mycobacterium tuberculosis*.

  Autores: Vanessa Vásquez Godoy, Andrés Felipe León Torres.

7.3 PROTOCOLOS

Protocolo 1. Electroforesis de agarosa

a. Disolver por calentamiento la cantidad adecuada de agarosa en el buffer TBE 1X (entre 0,7 y 2,5 %).

b. Enfriar la agarosa hasta 55-60 °C.

c. Añadir 1,5 µL de HydraGreenTM.

d. Verter la agarosa fundida sobre el molde y colocar inmediatamente el peine.

e. Retirar cuidadosamente el peine y los tapones o cinta adhesiva.

f. Colocar el gel en la cámara de electroforesis llena del buffer TBE 1X.

g. Mezclar las muestras de ADN con 0,2 volúmenes de buffer de carga 6X y sembrar en los pozos del gel.

h. Conectar los electrodos y aplicar un voltaje constante de 100 V durante 35 a 60 min, dependiendo del tamaño del fragmento esperado.

i. Visualizar el gel bajo luz UV (254 - 366 nm). Cuando se requiera extraer el ADN de un gel de agarosa se usa un kit de extracción de banda, siguiendo las instrucciones del proveedor.

Nota: Se usan los marcadores de peso molecular GeneRuler 1 kb ADN ladder y 100 bp ladder de Thermo scientific.

Protocolo 2. Ligación de ADN

a. Mezclar por pipeteo los fragmentos de ADN usando diferentes relaciones molares de vector e inserto (usando 15-30 fmoles de vector), calentar la mezcla a 45°C durante 5 min y luego enfriar inmediatamente.

b. Adicionar el buffer de la ligasa a una concentración final de 1X, 1 U de T4 ADN ligasa y agua necesaria para completar el volumen de reacción de 10 µL.

c. Incubar durante 2 h a 22 °C.

d. Adicionar 2 volúmenes de etanol absoluto e incubar durante 15 min o más a -20ºC.

e. Centrifugar a 13000 rpm durante 10 min.

f. Dejar secar y resuspender en 20 µL de agua desionizada.

g. Proceder inmediatamente a la transformación.

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

Protocolo 3. Transformación de células

- **Electroporación:**

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

a. Mezclar suavemente la alícuota de células con 2-10 µL del ADN a introducir (10-100 ng de ADN). El ADN debe ser previamente desalado para evitar corto circuito.

b. Transferir la mezcla al fondo de la cubeta de 1 mm de diámetro e insertar en el electroporador.

c. Pasar un pulso controlado de corriente:

E. coli: 25 µF, 2,5 kV y 200Ω, entre 4 y 5 ms

Micobacterias: 25 µF, 2,5 kV y 1000Ω entre 15-25 ms

d. Tan pronto como sea posible, agregar a la cubeta 1 mL de medio de cultivo líquido a temperatura ambiente (SOC o LB para *E. coli* y 7H9-OADC para *Mtb*).

e. Transferir a un Falcon de 15 mL e incubar a 37 °C por 1,5 h para *E. coli*, 2 h para *M. smegmatis* y toda la noche para *Mtb.*

f. El producto de transformación es plaqueado en el respectivo medio sólido suplementado con el antibiótico de selección (plaquear 100-200 µL). Incubar a 37 °C hasta obtener colonias.

Protocolo 4. Preparación de células electrocompetentes

Es importante tener en cuenta que las células de *E. coli* deben ser mantenidas todo el tiempo en hielo y se debe usar glicerol al 10% frío. Para *Mtb* se debe usar glicerol al 10% con Tween 0,05% y trabajar a temperatura ambiente. Esto mejora la eficiencia de transformación.

a. Preparar un cultivo hasta fase logarítmica en el medio adecuado teniendo en cuenta que 50 mL de cultivo inicial generan aproximadamente 20 alícuotas de células competentes.

b. El cultivo es transferido a tubos de centrífuga.

c. Las células son colectadas por centrifugación a 8500 rpm por 15 min; el sobrenadante es descartado cuidadosamente.

d. Lavar las células con 1/2 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%, pipeteando suavemente o con golpes moderados.

e. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/4 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.

f. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/8 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.

g. Centrifugar como en **c**; lavar las células con 1/10 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.

h. Centrifugar con en **c**; lavar las células con 1/25 del volumen inicial de cultivo con glicerol al 10%.

i. Alicuotar las células (40 µL de *E. coli*, 100 µL de micobacterias). Usar inmediatamente o guardar a -80 °C (Las células electrocompetentes de *Mtb* se deben usar en el menor tiempo posible)

Protocolo 5. Extracción de ADN plasmídico

a. Cultivar durante una noche, a 37 °C con agitación, las células en 50 mL de medio LB suplementado con el antibiótico adecuado.

b. Centrifugar el cultivo a 8500 rpm durante 5 min.

c. Desechar el sobrenadante con la ayuda de pipeta.

d. Resuspender el pellet en 400 µL de solución I fría.

e. Añadir 800 µL de solución II, mezclar suavemente por inversión y mantener durante 5 min en hielo o hasta que se obtenga una solución viscosa debida a la lisis celular.

f. Añadir 600 µL de solución III, mezclar por inversión e incubar durante 5 min en hielo hasta que se observe un precipitado blanco.

g. Centrifugar a 8500 rpm por 10 min. Transferir la fase acuosa a un falcon limpio.

h. Añadir 1,8 mL de IPA e incubar en hielo durante 10 min y centrifugar a 8500 rpm por 10 min.

i. Eliminar el sobrenadante y resuspender el precipitado en 400 µL de TE 1X. Adicionar 400 µL de LiCl 5M e incubar a -20C durante 15 min, si se puede más tiempo mejor. Centrifugar a 8500 rpm por 10 min. Transferir y dividir el sobrenadante en dos tubos *eppendorfs* limpios.

j. Adicionar 1 mL de etanol absoluto a cada tubo, mezclar e incubar durante 10 min a - 20 °C. Centrifugar a 13000 rpm por 10 min y desechar el sobrenadante.

k. Hacer un lavado del pellet con 1 mL de etanol al 70% (Centrifugar a 13000 rpm por 2 min y desechar el sobrenadante).

l. Secar el pellet y resuspender en 50-100 µL de agua desionizada estéril precalentada a 45°C. Guardar a -20°C.

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

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

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

Solución II: NaOH 0,2 N y SDS 1 %.

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

Protocolo 6. Digestión y mapeo de ADN con enzimas de restricción [74]**.**

- **Digestión:**

a. Mezclar por pipeteo el ADN a cortar en una concentración de 0,2-1 µg (por reacción), el buffer de la enzima a una concentración final de 1X, la enzima de restricción entre 1-10 U y la cantidad de agua necesaria para alcanzar el volumen final de 10 µL.

b. Incubar entre 2 h a 37 °C, en la mayoría de los casos, aunque existen enzimas con temperaturas óptimas de trabajo diferentes.

c. Analizar el producto de digestión por electroforesis de ADN.

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

Mapeo:

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

Otros protocolos implementados en el desarrollo de la investigación

Protocolo 7. Extracción de ADN genómico de micobacterias. Usando el método del CTAB-NaCl/proteinasa K [75]**.**

a. Partir de 5 mL de cultivo de micobacteria en medio 7H9-OADC crecido hasta fase logarítmica, centrifugarlo a 8500 rpm por 10 min. Se desecha el sobrenadante y se resuspende el pellet celular en 400 µL de solución TE 1X (25 mM Tris-HCl pH 8.0, 10 mM EDTA).

b. Transferir a un tubo *eppendorf* e inactivar a 85ºC por 30 min.

c. Adicionar 50 µL de lisozima 10 mg/mL y mezclar suavemente.

d. Incubar a 37°C toda la noche.

e. Agregar 72,5 µL de SDS al 10% y mezclar suavemente.

f. Adicionar 2,5 µL de proteínasa K 20 mg/mL y mezclar suavemente.

g. Incubar a 65°C por 10 min.

h. Agregar 100 µL de NaCl 5M y mezclar.

i. Luego adicionar 100 µL de CTAB (precalentado a 65°C), mezclar suavemente e incubar a 65°C por 10 min.

j. Adicionar 750 µL de cloroformo-alcohol isoamílico (24:1), mezclar con vortex durante 10 segundos y centrifugar durante 5 min a 13000 rpm.

k. Transferir la fase acuosa a un tubo nuevo.

l. Repetir la extracción con cloroformo-alcohol isoamílico (24:1) y transferir la fase acuosa al tubo nuevo.

m. Adicionar 1 volumen de isopropanol, mezclar suavemente por inversión e incubar a - 20ºC durante 30 min.

n. Centrifugar durante 15 min a 12000 rpm.

o. Aspirar y descartar el sobrenadante.

p. Adicionar 1 mL de etanol al 70% para lavar el pellet de ADN.

q. Mezclar suavemente por inversión y centrifugar durante 5 min.

r. Aspirar el sobrenadante y dejar secar el pellet al aire durante 15 min.

s. Resuspender en 70 µL de H20 desionizada e incubar a 37°C para disolver el pellet. Guardar a -20°C.

t. Cuantificar el ADN y comprobar su integridad por electroforesis de ADN.

Protocolo 8. PCR (reacción en cadena de la polimerasa)

a. Agregar al tubo *eppendorf* (cuyo tamaño depende del termociclador a usarse) cada uno de los componentes en las cantidades que permitan alcanzar las concentraciones adecuadas en un volumen final de 25-30 µL el cual se ajusta con agua desionizada. La concentraciones finales de cada reactivo son: El buffer de la polimerasa 1X, la enzima polimerasa 1U, cloruro de magnesio 1,5 mM, dNTP's 100 µM, los oligonucleótidos 1 µM y el molde de ADN de 1 pg a 1 ng.

b. Mezclar exhaustivamente por pipeteo.

c. Introducir en el termociclador y someter a un programa adecuado, que incluye generalmente: una denaturación inicial del molde (10 min a 94 °C), 35 ciclos de reacción que constan de un paso de denaturación (30 s a 94 °C), un paso de anillamiento (3 s al Tm de los oligonucleótido), un paso de extensión (1 min por cada 1000 bp a 72 °C) y una extensión final (10 min a 72 °C).

d. Analizar el producto por electroforesis.

Nota 1: Para productos de tamaño mayor a 2000 bp se usa las enzimas Dream Taq Polimerasa o True start polimerasa de Thermo scientific. Para productos de menor tamaño ADN Taq polimerasa de Thermo scientific.

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

Nota 3: Para realizar la PCR de colonia, se prepara la reacción de PCR normal solo que en lugar de adicionar ADN en solución como molde, se puede: *1)* Tomar con un palillo estéril la colonia que se desea evaluar e introducirla en el *eppendorf* de la reacción; o *2)* Partir de un cultivo líquido derivado de una colonia única, centrifugar 1 mL de cultivo, resuspender en 100 µL H20 y calentar a 85 °C por 20 minutos (para micobacterias calentar durante 50 min), centrifugar nuevamente y tomar 2 µL de sobrenadante como molde.

Protocolo 9. Determinación de secuencia de ADN.

Para determinar la secuencia de ADN se contrata un servicio de secuenciación prestado por el Instituto de Genética de la Universidad Nacional de Colombia. Los resultados de la secuencia son comparados con las secuencias consignadas en la base de datos NCBI, teniendo en cuenta las variaciones esperadas.

Las muestras se preparan según las especificaciones particulares del servicio de secuenciación. Generalmente: los plásmidos o productos de PCR se purifican usando el kit AxyPrep™ Plasmid Miniprep Kit (Axygen) y AxyPrep™ PCR Clean-Up respectivamente, permitiendo un secado eficiente antes de eluir (para eliminar cualquier traza de etanol). Los plásmidos o productos de PCR a secuenciar son eluidos con agua desionizada y la concentración se ajusta entre 30 y 100 ng/µL.

Protocolo 10. Comprobación del genotipo mutante

La verificación del genotipo mutante se hará en las colonias obtenidas en el medio 7H11- OADC-kan-hyg, luego del proceso de recombinación homóloga. Primero se hará un subcultivo de las colonias mutantes en medio 7H9-OADC-kan-hyg a 37°C durante 4-5 semanas. Luego, se extraerá el ADN genómico de las posibles cepas mutantes y se analizará dicho ADN mediante PCR y luego el amplímero por secuenciación, usando oligonucleótidos que se unan a las regiones corriente arriba y abajo del gen objetivo y a la parte central del casete de resistencia a higromicina, para analizar los diferentes tamaños de banda esperados entre la cepa mutante y la cepa silvestre

Protocolo 11. Construcción del sustrato de intercambio alélico (AES) de *mmpL7*

En la construcción del sustrato de intercambio alélico (AES), que se utilizará para producir una mutación defectiva en el gen *mmpL7* de *Mtb* H37Ra mediante la técnica de recombinación, se amplificaran segmentos génicos de aproximadamente 500 bp conformados por secuencias que flanquean el gen *mmpL7* de *Mtb* corriente arriba y abajo. Para la construcción del AES de *mmpL7*se

usara como marcador de selección un cassette de resistencia a Hyg (HygR). La construcción se buscara siguiendo la siguientes estrategia:
Doble clonación de las regiones flanqueantes del gen *mmpL7*en el vector pYUB854 que posee un cassette HygR flanqueado por sitios γ resolvasa y MCSs. En la obtención del AES por este método es necesario producir dos plásmidos, donde el primero tenga la clonación de la sección corriente abajo del gen *mmpL7* entre los sitios XhoI y HindIII del vector pYUB854 y el segundo tenga la clonación de la sección corriente arriba del gen *mmpL7*entre los sitios BSPHI y KpnI del plásmido construido.

Protocolo 12. Obtención de la cepa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv
Siguiendo el esquema general de la técnica de recombinación una vez obtenido el AES del gen *mmpL7* es necesario construir la cepa en la cual se llevará a cabo la recombinación, para ello se transforma por electroporación a *Mtb* H37Ra con el plásmido pJV53 que permite la expresión de las proteínas Gp60 y Gp61 del micobacteriófago Che9c bajo el estricto control del promotor acetamidasa.
Luego de la transformación se deberán seleccionar las colonias transformantes por PCR en colonia, usando los cebadores Tm903 A y Tm903 B que amplifican un fragmento de 846 pb correspondiente a una parte del cassette de resistencia a Km. Como control de transformación se usara el vector esqueleto pLAM12 sobre el cual se construyó pJV53.
La expresión de las proteínas recombinantes es inducida con acetamida, que funciona como fuente de carbono del medio de cultivo. El medio de cultivo de la cepa recombinante usado para preparar las células competentes para la transformación del AES, se llama medio de inducción. Este, contiene succinato en lugar de ADC, el cual puede interferir en la expresión de las funciones de recombinación.

8. Bibliografía

[1] World Health Organization, “Informe mundial sobre la tuberculosis 2017,” 2017. doi: ISBN 978 92 4 156539 4.

[2] R. E. and M. H. Chaisson, “How research can help control tuberculosis,” *Int J Tuberc Lung Dis*, vol. 13, no. 5, pp. 558–68, 2009.

[3] S.-G. Steven, Quezada; Sunny, “Vacuna contra la tuberculosis BCG : Eficacia y efectos adversos BCG vaccine against tuberculosis : Efficacy and adverse effects,” *Rev. Cienc. UNEMI*, vol. 8, no. 1390–4272, pp. 120–125, 2015.

[4] World-Health-Organization, “Global tuberculosis report 2015,” 2015. .

[5] L. Novoa-Aponte and C. Y. Soto Ospina, “Mycobacterium tuberculosis P-type ATPases: possible targets for drug or vaccine development.,” *Biomed Res. Int.*, vol. 2014, p. 296986, 2014, doi: 10.1155/2014/296986.

[6] M. G. Palmgren and P. Nissen, “P-type ATPases,” *Annu Rev Biophys*, vol. 40, pp. 243–266, 2011, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.

[7] J. S. Cox, B. Chen, M. McNeil, and W. R. Jacobs, “Complex lipid determines tissue-specific replication of Mycobacterium tuberculosis in mice.,” *Nature*, vol. 402, no. 6757, pp. 79–83, 1999, doi: 10.1038/47042.

[8] W. Malaga, E. Perez, and C. Guilhot, “Production of unmarked mutations in mycobacteria using site-specific recombination,” *FEMS Microbiol. Lett.*, 2003, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00003-X.

[9] P. Andersen and S. H. E. Kaufmann, “Novel vaccination strategies against tuberculosis,” *Cold Spring Harb. Perspect. Med.*, 2014, doi: 10.1101/cshperspect.a018523.

[10] J. . Grange, “The biology of the genus Mycobacterium,” *Soc Appl Bacteriol Symp Ser*, vol. 25, pp. 1S-9S, 1996.

[11] A. C. Parte, “LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature,” *Nucleic Acids*

Res., vol. 42, no. D1, 2014, doi: 10.1093/nar/gkt1111.

[12] E. C. Hett and E. J. Rubin, “Bacterial growth and cell division: a mycobacterial perspective,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, vol. 72, no. 1, pp. 126–56, table of contents, 2008, doi: 10.1128/mmbr.00028-07.

[13] V. V. and F. P. Levy-Frebault, “Proposed minimal standards for the genus Mycobacterium and for description of new slowly growing Mycobacterium species.,” *Int J Syst Bacteriol*, vol. 42, no. 2, pp. 315–23, 1999.

[14] G. Wayne, LG, Kubica, “Family Mycobacteriaceae Chester,” in *In Bergey’s manual of systematic bacteriology., M.N.S. eds Sneath P. H. A., Sharpe M. E., Holt J. G. (Williams and Wilkins, Baltimore, Md)*, 1986, pp. 1435–1457.

[15] E. L. Rastogi, N., “The mycobacteria: an introduction to nomenclature and pathogenesis.,” *Rev Sci Tech*, vol. 20, no. 1, pp. 21–54, 2001.

[16] M. Daffé and P. Draper, *The Envelope Layers of Mycobacteria with Reference to their Pathogenicity*, vol. 39. 1997.

[17] R. Issa, “Detection and discrimination of Mycobacterium tuberculosis complex,” *Diagn Microbiol Infect Dis*, vol. 72, no. 1, pp. 62–67, 2012.

[18] P. J. Brennan and H. Nikaido, “The envelope of mycobacteria.,” *Annu. Rev. Biochem.*, 1995, doi: 10.1146/annurev.biochem.64.1.29.

[19] E. Tortoli, “Phylogeny of the genus Mycobacterium: Many doubts, few certainties,” *Infect. Genet. Evol.*, 2012, doi: 10.1016/j.meegid.2011.05.025.

[20] J. Hacker and U. Dobrindt, *Pathogenomics*. Weinheim, 2006.

[21] K. Sakamoto, “The Pathology of Mycobacterium tuberculosis Infection,” *Veterinary Pathology*. 2012, doi: 10.1177/0300985811429313.

[22] Y. and A. T. Zhang, “Genetic of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis,” in *In Molecular Genetics of Mycobacteria., ed. G.F.J. Hatfull, W.R.*, 2000, p. ASM Press Washington, D.C.

[23] J. . Blanchard, “Molecular mechanisms of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis,” *Annu Rev Biochem*, vol. 65, pp. 215–239, 1996.

[24] G. M. Cook *et al.*, “Physiology of Mycobacteria,” *Advances in Microbial Physiology*. 2009, doi: 10.1016/S0065-2911(09)05502-7.

[25] V. and H. N. Jarlier, “Permeability barrier to hydrophilic solutes in Mycobacterium chelonei.,” *J Bacteriol*, vol. 79, no. 3, pp. 153–169, 1990.

[26] D. Chatterjee, “The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action.,” *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 1997, doi: 10.1016/S1367-5931(97)80055-5.

[27] M. Daffé and G. Etienne, “The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity.,” *Tuber. Lung Dis.*, vol. 79, no. 3, pp. 153–169, 1999, doi: 10.1054/tuld.1998.0200.

[28] P. J. Brennan, “Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis,” 2003, doi: 10.1016/S1472-9792(02)00089-6.

[29] K. G. Mawuenyega *et al.*, “Mycobacterium tuberculosis functional network analysis by global subcellular protein profiling.,” *Mol. Biol. Cell*, vol. 16, no. 1, pp. 396–404, 2005, doi: 10.1091/mbc.E04-04-0329.

[30] C. Chalut, “MmpL transporter-mediated export of cell-wall associated lipids and siderophores in mycobacteria,” *Tuberculosis*, vol. 100. pp. 32–45, 2016, doi: 10.1016/j.tube.2016.06.004.

[31] M. and J.-M. R. Daffé, “The Mycobacterial Cell Envelope,” *DC ASM Press*, vol. XVIII, p. 395, 2008.

[32] C. Whitfield, “Biosynthesis and Assembly of Capsular Polysaccharides in Escherichia coli,” *Annu. Rev. Biochem.*, vol. 75, pp. 39–68, 2006, doi: 10.1146/.

[33] A. O’Garra, P. S. Redford, F. W. McNab, C. I. Bloom, R. J. Wilkinson, and M. P. R. Berry, “The immune response in tuberculosis.,” *Annu. Rev. Immunol.*, 2013, doi: 10.1146/annurev-immunol-032712-095939.

[34] “‘The immune response in tuberculosis.’ Annu. Rev. Immunol. vol. 31, no. 1, pp. 475–527, 2013.,” *Trends in Microbiology*, vol. 26, no. 6. 2018, doi: 10.1016/j.tim.2018.02.012.

[35] N. A. Knechel, “Tuberculosis: Pathophysiology, clinical features, and diagnosis,” *Crit. Care Nurse*, 2009, doi: 10.4037/ccn2009968.

[36] M. Gengenbacher and S. H. E. Kaufmann, “Mycobacterium tuberculosis: Success through dormancy,” *FEMS Microbiology Reviews*. 2012, doi: 10.1111/j.1574-6976.2012.00331.x.

[37] J. D. Ernst, “The immunological life cycle of tuberculosis,” *Nature Reviews Immunology*. 2012, doi: 10.1038/nri3259.

[38] S. Sturgill-Koszycki *et al.*, “Lack of acidification in Mycobacterium phagosomes produced by

exclusion of the vesicular proton-ATPase," *Science (80-.).*, vol. 263, no. 5147, pp. 678–681, 1994, doi: 10.1126/science.8303277.

[39] S. K. Ward, E. A. Hoye, and A. M. Talaat, "The global responses of Mycobacterium tuberculosis to physiological levels of copper," *J. Bacteriol.*, vol. 190, no. 8, pp. 2939–2946, 2008, doi: 10.1128/JB.01847-07.

[40] S. M. Hingley-Wilson, V. K. Sambandamurthy, and W. R. Jacobs, "Survival perspectives from the world's most successful pathogen, Mycobacterium tuberculosis," *Nature Immunology*. 2003, doi: 10.1038/ni981.

[41] J. A. Philips and J. D. Ernst, "Tuberculosis Pathogenesis and Immunity," *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.*, 2012, doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132458.

[42] G. Walzl, K. Ronacher, W. Hanekom, T. J. Scriba, and A. Zumla, "Immunological biomarkers of tuberculosis," *Nature Reviews Immunology*. 2011, doi: 10.1038/nri2960.

[43] F. Squeglia, A. Ruggiero, and R. Berisio, "Collagen degradation in tuberculosis pathogenesis: the biochemical consequences of hosting an undesired guest," *Biochem. J.*, 2018, doi: 10.1042/bcj20180482.

[44] M. A. Forrellad *et al.*, "Virulence factors of the Mycobacterium tuberculosis complex.," *Virulence*, vol. 4, no. 1, pp. 3–66, 2013, doi: 10.4161/viru.22329.

[45] J. E. Galagan *et al.*, "The Mycobacterium tuberculosis regulatory network and hypoxia," *Nature*, 2013, doi: 10.1038/nature12337.

[46] J. Gonzalo-Asensio *et al.*, "PhoP: A missing piece in the intricate puzzle of Mycobacterium tuberculosis virulence," *PLoS One*, 2008, doi: 10.1371/journal.pone.0003496.

[47] P. Coll, "Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis," *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clinica*. 2009, doi: 10.1016/j.eimc.2009.06.010.

[48] A. Koul, E. Arnoult, N. Lounis, J. Guillemont, and K. Andries, "The challenge of new drug discovery for tuberculosis," *Nature*. 2011, doi: 10.1038/nature09657.

[49] A. Zumla *et al.*, "Tuberculosis treatment and management-an update on treatment regimens, trials, new drugs, and adjunct therapies," *The Lancet Respiratory Medicine*. 2015, doi: 10.1016/S2213-2600(15)00063-6.

[50] World Health Organization, "Multidrug and extensively drug-resistant TB (M/XDR-TB): global

report on surveillance and response. , 2010.," 2010. .

[51] T. Smith, K. A. Wolff, and L. Nguyen, "Molecular biology of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis," *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, 2013, doi: 10.1007/82-2012-279.

[52] and Z. C. J. Tang, W.-C. Yam, "Mycobacterium tuberculosis infection and vaccine development," *Tuberculosis*, vol. 98, pp. 30–41, 2016.

[53] M. K. O'Shea and H. McShane, "A review of clinical models for the evaluation of human TB vaccines," *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2016, doi: 10.1080/21645515.2015.1134407.

[54] Y. A. W. Skeiky and J. C. Sadoff, "Advances in tuberculosis vaccine strategies," *Nat. Rev. Microbiol.*, 2006, doi: 10.1038/nrmicro1419.

[55] H. A. Fletcher and L. Schrager, "TB vaccine development and the End TB Strategy: Importance and current status," *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 2016, doi: 10.1093/trstmh/trw016.

[56] D. F. Hoft, "Tuberculosis vaccine development: goals, immunological design, and evaluation," *The Lancet*. 2008, doi: 10.1016/S0140-6736(08)61036-3.

[57] S. Ginebra, "Organización Mundial de la Salud," *Wwwwhoint*, 2011.

[58] M. G. Palmgren and P. Nissen, "P-Type ATPases," *Annu. Rev. Biophys.*, 2011, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.

[59] C. Martín Montañés and B. Gicquel, "New tuberculosis vaccines," *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.*, 2011, doi: 10.1016/S0213-005X(11)70019-2.

[60] Y. Pang *et al.*, "Current status of new tuberculosis vaccine in children," *Human Vaccines and Immunotherapeutics*. 2016, doi: 10.1080/21645515.2015.1120393.

[61] R. Hernàndez Pando *et al.*, "The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis," *Tuberculosis*, 2006, doi: 10.1016/j.tube.2006.01.022.

[62] M. Bublitz, H. Poulsen, J. P. Morth, and P. Nissen, "In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited," *Current Opinion in Structural Biology*. 2010, doi: 10.1016/j.sbi.2010.06.007.

[63] S. K. Ward, B. Abomoelak, E. A. Hoye, H. Steinberg, and A. M. Talaat, "CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis," *Mol. Microbiol.*, 2010, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x.

[64] L. Yatime *et al.*, “P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science,” *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, vol. 1787, no. 4. pp. 207–220, 2009, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.12.019.

[65] W. Kühlbrandt, “Biology, structure and mechanism of P-type ATPases,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 5, no. 4, pp. 282–295, 2004, doi: 10.1038/nrm1354.

[66] P. Chène, “ATPases as drug targets: learning from their structure.,” *Nat. Rev. Drug Discov.*, vol. 1, no. 9, pp. 665–673, 2002, doi: 10.1038/nrd894.

[67] P. L. Pedersen, “Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease,” *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*. 2007, doi: 10.1007/s10863-007-9123-9.

[68] D. D. Agranoff and S. Krishna, “Metal ion homeostasis and intracellular parasitism,” *Molecular Microbiology*, vol. 28, no. 3. pp. 403–412, 1998, doi: 10.1046/j.1365-2958.1998.00790.x.

[69] M. G. Palmgren and P. Nissen, “P-type ATPases.,” *Annu. Rev. Biophys.*, 2011, doi: 10.1146/annurev.biophys.093008.131331.

[70] K. B. Axelsen and M. G. Palmgren, “Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily,” *J. Mol. Evol.*, vol. 46, no. 1, pp. 84–101, 1998, doi: 10.1007/PL00006286.

[71] T. Ogura and A. J. Wilkinson, “AAA+ superfamily ATPases: Common structure-diverse function,” *Genes to Cells*, vol. 6, no. 7. pp. 575–597, 2001, doi: 10.1046/j.1365-2443.2001.00447.x.

[72] D. Agranoff and S. Krishna, “Metal ion transport and regulation in Mycobacterium tuberculosis.,” *Front. Biosci.*, 2004.

[73] S. K. Ward, B. Abomoelak, E. a Hoye, H. Steinberg, and M. Adel, “NIH Public Access,” vol. 77, no. 5, pp. 1096–1110, 2011, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07273.x.CtpV.

[74] L. Novoa-Aponte *et al.*, “In silico Identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the Mycobacterium tuberculosis complex,” *BMC Structural Biology*. 2012, doi: 10.1186/1472-6807-12-25.

[75] L. V. Quitian Cruz, “Determinación de características funcionales de CtpG, una ATPasa tipo P transportadora de metales pesados a través de la membrana plasmática de Mycobacterium tuberculosis,” Universidad Nacional de Colombia Sede Bogotá, 2017.

[76] H. Botella *et al.*, “Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in

human macrophages," *Cell Host Microbe*, vol. 10, no. 3, pp. 248–259, 2011, doi: 10.1016/j.chom.2011.08.006.

[77] T. Soldati and O. Neyrolles, "Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)!," *Traffic*. 2012, doi: 10.1111/j.1600-0854.2012.01358.x.

[78] T. Padilla-Benavides, J. E. Long, D. Raimunda, C. M. Sassetti, and J. M. Argüello, "A novel P1B-type Mn2+-transporting ATPase is required for secreted protein metallation in mycobacteria," *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 16, pp. 11334–11347, Apr. 2013, doi: 10.1074/jbc.M112.448175.

[79] J. M. Argüello, M. González-Guerrero, and D. Raimunda, "Bacterial transition metal P 1B-ATPases: Transport mechanism and roles in virulence," *Biochemistry*. 2011, doi: 10.1021/bi201418k.

[80] D. Raimunda, J. E. Long, T. Padilla-Benavides, C. M. Sassetti, and J. M. Argüello, "Differential roles for the Co2+/Ni2+ transporting ATPases, CtpD and CtpJ, in Mycobacterium tuberculosis virulence," *Mol. Microbiol.*, vol. 91, no. 1, pp. 185–197, Jan. 2014, doi: 10.1111/mmi.12454.

[81] S. M. Behar, M. Divangahi, and H. G. Remold, "Evasion of innate immunity by mycobacterium tuberculosis: Is death an exit strategy?," *Nature Reviews Microbiology*. 2010, doi: 10.1038/nrmicro2387.

[82] M. Maya-Hoyos, C. Rosales, L. Novoa-Aponte, E. Castillo, and C. Y. Soto, "The P-type ATPase CtpF is a plasma membrane transporter mediating calcium efflux in Mycobacterium tuberculosis cells," *Heliyon*, vol. 5, no. 11, p. e02852, 2019, doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e02852.

[83] M. H. Touchette and J. C. Seeliger, "Transport of outer membrane lipids in mycobacteria," *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids*, vol. 1862, no. 11. Elsevier B.V., pp. 1340–1354, Nov. 01, 2017, doi: 10.1016/j.bbalip.2017.01.005.

[84] M. Daffé, D. C. Crick, and M. Jackson, "Genetics of Capsular Polysaccharides and Cell Envelope (Glyco)lipids," *Microbiol. Spectr.*, 2014, doi: 10.1128/microbiolspec.mgm2-0021-2013.

[85] M. Jackson, G. Stadthagen, and B. Gicquel, "Long-chain multiple methyl-branched fatty acid-containing lipids of Mycobacterium tuberculosis: Biosynthesis, transport, regulation and biological activities," *Tuberculosis*, vol. 87, no. 2. pp. 78–86, 2007, doi: 10.1016/j.tube.2006.05.003.

[86] T. D. Sirakova, A. K. Thirumala, V. S. Dubey, H. Sprecher, and P. E. Kolattukudy, "The Mycobacterium tuberculosis pks2 Gene Encodes the Synthase for the Hepta- and Octamethyl-branched Fatty Acids Required for Sulfolipid Synthesis," *J. Biol. Chem.*, 2001, doi: 10.1074/jbc.M011468200.

[87] et al Camacho LR, Constant P, Raynaud C, Laneélle MA, Triccas JA, Guicquel B, “Analysis of the phthiocerol dimycocerosate locus of Mycobacterium tuberculosis: evidence that this lipid is involved in cell wall permeability barrier,” *J Biol Chem*, vol. 276, pp. 19845–54, 2001.

[88] J. Quigley, V. K. Hughitt, C. A. Velikovsky, R. A. Mariuzza, N. M. El-Sayed, and V. Briken, “The cell wall lipid PDIM contributes to phagosomal escape and host cell exit of Mycobacterium tuberculosis,” *MBio*, 2017, doi: 10.1128/mBio.00148-17.

[89] J. Augenstreich *et al.*, “ESX-1 and phthiocerol dimycocerosates of Mycobacterium tuberculosis act in concert to cause phagosomal rupture and host cell apoptosis,” *Cell. Microbiol.*, vol. 19, no. 7, Jul. 2017, doi: 10.1111/cmi.12726.

[90] J. P. Sarathy, V. Dartois, and E. J. D. Lee, “The role of transport mechanisms in Mycobacterium Tuberculosis drug resistance and tolerance,” *Pharmaceuticals*. 2012, doi: 10.3390/ph5111210.

[91] P. Domenech, M. B. Reed, and C. E. Barry, “Contribution of the Mycobacterium tuberculosis MmpL protein family to virulence and drug resistance.,” *Infect. Immun.*, vol. 73, no. 6, pp. 3492–501, Jun. 2005, doi: 10.1128/IAI.73.6.3492-3501.2005.

[92] H. I. Zgurskaya and H. Nikaido, “Multidrug resistance mechanisms: Drug efflux across two membranes,” *Molecular Microbiology*, vol. 37, no. 2. pp. 219–225, 2000, doi: 10.1046/j.1365-2958.2000.01926.x.

[93] P. V. Reddy *et al.*, “Disruption of mycobactin biosynthesis leads to attenuation of mycobacterium tuberculosis for growth and virulence,” *J. Infect. Dis.*, vol. 208, no. 8, pp. 1255–1265, 2013, doi: 10.1093/infdis/jit250.

[94] R. Bailo, A. Bhatt, and J. A. Aínsa, “Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 159–167, Aug. 2015, doi: 10.1016/J.BCP.2015.05.001.

[95] L. R. Camacho, D. Ensergueix, E. Perez, B. Gicquel, and C. Guilhot, “Identification of a virulence gene cluster of Mycobacterium tuberculosis by signature-tagged transposon mutagenesis,” *Mol. Microbiol.*, vol. 34, no. 2, pp. 257–267, 1999, doi: 10.1046/j.1365-2958.1999.01593.x.

[96] J. Manuel Belardinelli, G. Larrouy-Maumus, V. Jones, L. P. S. De Carvalho, M. R. McNeil, and M. Jackson, “Biosynthesis and translocation of unsulfated acyltrehaloses in mycobacterium tuberculosis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 289, no. 40, pp. 27952–27965, 2014, doi: 10.1074/jbc.M114.581199.

[97] M. H. Touchette *et al.*, “The rv1184c locus encodes Chp2, an acyltransferase in Mycobacterium tuberculosis polyacyltrehalose lipid biosynthesis,” *J. Bacteriol.*, vol. 197, no. 1, pp. 201–210, 2015, doi: 10.1128/JB.02015-14.

[98] K. Tahlan *et al.*, “SQ109 targets MmpL3, a membrane transporter of trehalose monomycolate involved in mycolic acid donation to the cell wall core of mycobacterium tuberculosis,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 56, no. 4, pp. 1797–1809, 2012, doi: 10.1128/AAC.05708-11.

[99] S. A. Pacheco, F. F. Hsu, K. M. Powers, and G. E. Purdy, “MmpL11 protein transports mycolic acid-containing lipids to the mycobacterial cell wall and contributes to biofilm formation in Mycobacterium smegmatis,” *J. Biol. Chem.*, vol. 288, no. 33, pp. 24213–24222, 2013, doi: 10.1074/jbc.M113.473371.

[100] C. M. Jones *et al.*, “Self-poisoning of Mycobacterium tuberculosis by interrupting siderophore recycling.,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 111, no. 5, pp. 1945–50, 2014, doi: 10.1073/pnas.1311402111.

[101] R. M. Wells *et al.*, “Discovery of a Siderophore Export System Essential for Virulence of Mycobacterium tuberculosis,” *PLoS Pathog.*, vol. 9, no. 1, 2013, doi: 10.1371/journal.ppat.1003120.

[102] M. R. Pasca, P. Guglierame, E. De Rossi, F. Zara, and G. Riccardi, “mmpL7 gene of Mycobacterium tuberculosis is responsible for isoniazid efflux in Mycobacterium smegmatis.,” *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 49, no. 11, pp. 4775–7, Nov. 2005, doi: 10.1128/AAC.49.11.4775-4777.2005.

[103] M. Jain and J. S. Cox, “Interaction between polyketide synthase and transporter suggests coupled synthesis and export of virulence lipid in M. tuberculosis,” *PLoS Pathog.*, 2005, doi: 10.1371/journal.ppat.0010002.

[104] R. Bailo, A. Bhatt, and J. A. Aínsa, “Lipid transport in Mycobacterium tuberculosis and its implications in virulence and drug development,” *Biochem. Pharmacol.*, vol. 96, no. 3, pp. 159–167, 2015, doi: 10.1016/j.bcp.2015.05.001.

[105] M. B. Reed *et al.*, “A glycolipid of hypervirulent tuberculosis strains that inhibits the innate immune response.,” *Nature*, vol. 431, no. 7004, pp. 84–87, 2004, doi: 10.1038/nature02837.

[106] J. C. van Kessel, “RECOMBINEERING IN MYCOBACTERIA USING MYCOBACTERIOPHAGE PROTEINS,” Pittsburgh, 2003.

[107] and G. F. H. Van Kessel, J.C., L.J. Marinelli, “Recombineering mycobacteria and their

phages.," *Nat. Rev. Microbiol.*, vol. 6, pp. 851–857, 2008.

[108] J. C. van Kessel and G. F. Hatfull, "Recombineering in Mycobacterium tuberculosis," *Nat. Methods*, 2007, doi: 10.1038/nmeth996.

[109] I. Hastings Software, "Gene Runner." New York.

[110] M. W. Davis, "ApE- A plasmid Editor," *University of Utah*. 2013, [Online]. Available: http://biologylabs.utah.edu/jorgensen/wayned/ape/.

[111] Promega Corporation, "BioMath Calculators: Ligations: Molar Ratio of Insert to Vector Calculator." 2008, [Online]. Available: https://www.promega.com/resources/tools/biomath-calculators/.

[112] A. F. L. Torres, "Respuesta de las ATPasas tipo P1B a las condiciones de estrés en Mycobacterium tuberculosis," Universidad Ncional de Colombia, 2018.

[113] M. M. Hoyos, "ATPasas tipo P2 como blancos para la atenuación de Mycobacterium tuberculosis," Universidad Naional de Colombia, 2021.

[114] S. Padmanabhan, S. Banerjee, and N. Mandi, "Molecular Cloning - Selected Applications in Medicine and BiologyScreening of Bacterial Recombinants: Strategies and Preventing False Positives," Gregory G.Brown, Ed. 2011, pp. 1–15.

[115] Promega Corporation, "pGEM®-T and pGEM®-T Easy Vector Systems," 2800, 2015.

[116] R. R. Reed, "Transposon-mediated site-specific recombination: A defined in vitro system," *Cell*, vol. 25, no. 3, pp. 713–719, Sep. 1981, doi: 10.1016/0092-8674(81)90178-1.

[117] A. F. L. Torres, "Respuesta de las ATPasas tipo P1B a las condiciones de estrés en Mycobacterium tuberculosis," Universidad Nacional de Colombia, 2018.