



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**Evaluación preliminar de la especificidad
iónica de la proteína CtpH expresada en
Escherichia coli: ATPasa tipo P de
*Mycobacterium tuberculosis***

Miyer Fabián Patiño Ruiz

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2012

**Evaluación preliminar de la especificidad iónica de la proteína
CtpH expresada en *Escherichia coli*: ATPasa tipo P de
*Mycobacterium tuberculosis***

Miyer Fabián Patiño Ruiz
Químico, Universidad Nacional de Colombia

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

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

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

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

2012

*Dedicada a la memoria del profesor
Luis Ramon Osses Basaure*

Agradecimientos

A Dios, porque Él ha sido siempre mi fortaleza.

A mi familia, mis padres y mis hermanas, por su constante apoyo, paciencia y amor y porque han sido un ejemplo en todo para mi.

A Jenifer Cuesta por su comprensión y por estar en los momentos que más lo necesité.

A mis amigos y compañeros de la Universidad con los cuales compartí tantos momentos buenos y también difíciles.

A la Universidad Nacional de Colombia por brindarme la oportunidad de tener una excelente e integra formación como científico.

A la Vicerrectoría Académica de la Universidad Nacional de Colombia y al programa de beca para Estudiantes Sobresalientes de Posgrado, por el financiamiento recibido durante mis estudios de Maestría.

A la Dirección de Investigación de la sede Bogotá (DIB) y a la Dirección de Bienestar de la Facultad de Ciencias por el apoyo económico brindado (Codigo de Proyecto 15159) para llevar a cabo la pasantía de Investigación en el Instituto Max Planck de Biofísica (Frankfurt – Alemania).

Al profesor Carlos Yesid Soto por abrirme la puerta del grupo de investigación Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias y por su muy acertada dirección durante el desarrollo de esta tesis.

A todos mis amigos y compañeros integrantes del grupo de Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias.

A todos los profesores del área de Bioquímica porque tuve la fortuna de aprender de su experiencia y por sus aportes realizados durante mi formación.

A la profesora Elizabeth Lopez, quien con su excelente pedagogía y sabiduría me llevó a decidir por la bioquímica como mi camino.

Al profesor Rafael Santiago Castaño por sus importantes aportes en este proyecto y por su instrucción durante el entrenamiento en la Universidad del Valle.

Al profesor Klaus Fendler por la gran oportunidad de hacer parte de su grupo de investigación y por sus acertados consejos.

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

A Lina Hatahet, Javier Carrera Casanova, Hao Xie y Camilo Perez, por la generosidad en su tiempo dedicado a la solución de los problemas presentados durante nuestra estancia en Frankfurt.

Contenido

	Pág.
Lista de figuras.....	VIII
Lista de tablas	XIII
Lista de abreviaturas.....	15
Resumen	18
1. Justificación	20
2. Marco Teórico.....	22
3. Hipótesis Experimental.....	48
4. Objetivos.....	49
5. Materiales y Métodos	50
6. Resultados y Discusión	69
7. Conclusiones.....	118
8. Perspectivas	119
Anexo A.....	121
Anexo B.....	124
Anexo C.....	125
Referencias.....	133

Lista de figuras

Figura 2-1. *Envoltura celular de M. tuberculosis*

Figura 2-2. *Receptores de los macrófagos involucrados en la interacción con la micobacteria.*

Figura 2-3. *Balance entre M. tuberculosis y el sistema inmune hospedero*

Figura 2-4. *Reactivación de la TB debida a la inmunosupresión o a la reinfección exógena*

Figura 2-5: *Transportadores involucrados en la ingesta de carbohidratos a través de la membrana citoplasmática de A) M. tuberculosis y B) M. smegmatis.*

Figura 2-6. *Organización estructural de las ATPasas tipo P. Modelo de estructura cristalina de la Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoplásmico (número de acceso PDB 1T5S).*

Figura 2-7. *Modelo del mecanismo catalítico de transporte de iones llevado a cabo por la ATPasa tipo P basado en el ciclo de Post-Alberts para una Na^+/K^+ ATPasa.*

Figura 2-8. *Esquema sencillo de los cambios conformacionales ocurridos durante el ciclo catalítico de las ATPasas tipo P.*

Figura 2-9. *Esquema del alineamiento de las 12 secuencias protéicas de ATPasas tipo P de M. tuberculosis transportadoras de iones metálicos. Se muestran las secuencias de los motivos conservados de las ATPasas tipo P.*

Figura 2-10. *Estructura de la membrana soportada en sólido (SSM).*

Figura 2-11. *Diagrama de una vesícula de retículo sarcoplásmico adsorbida en una membrana soportada en sólido (SSM) y sometida a activación con ATP.*

Figura 2-12. *Geometría de la adsorción de vesículas de membrana/proteoliposomas y fragmentos de membrana en la SSM y circuito equivalente.*

Figura 5-1. *Esquema de la ubicación de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* desde DNA genómico y fragmentos esperados generados con estos iniciadores mediante PCR.*

Figura 5-2. *Esquema de ubicación de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* con sitios de restricción para las enzimas *BglII* y *EcoRI**

Figura 5-3. *Ubicación de los iniciadores de secuenciación en los recombinantes obtenidos*

Figura 5-4. *Sistemas de transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a membranas de PVDF, utilizados durante la optimización del inmunoblot de la proteína *CtpH*.*

Figura 5-5. *Mecanismo de revelado del inmunoblot usando anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina y los sustratos BCIP/NBT (Sigma Aldrich).*

Figura 5-6. *Configuración general del sistema SSM.*

Figura 5-7. *Esquema de una vesícula de membrana, conteniendo una ATPasa tipo P transportadora de iones, adsorbida sobre la bicapa lipídica soportada en sólido (SSM) y sistema de medida.*

Figura 5-8. Chip sensor donde se ensambla la SSM conteniendo una película delgada de oro (electrodo).

Figura 5-9. Cubetas utilizadas como soporte para el chip sensor con la SSM.

Figura 5-10. Interior de la cámara faradéica conteniendo el sistema completo de medida, compuesto por válvulas (V1 y V2), reservorios de las soluciones (A/NA) y el ensamblamiento de la cubeta (c).

Figura 5-11. Esquema del sistema de medida, configuración de las válvulas y protocolo de intercambio simple de soluciones en SSM.

Figura 6-1. Topología tipo II presentada por las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos clasificadas como EAM (CtpH, CtpI, CtpF y CtpE).

Figura 6-2. Análisis de perfiles probabilísticos construidos con base en modelos ocultos de Markov (HMM) y comparación del perfil de hidrofobicidad de CtpH con el de consensos para secuencias de Ca²⁺-, Na⁺/K⁺-, Na⁺-, Mg²⁺- y K⁺-ATPasas tipo P.

Figura 6-3. Estimulación de la actividad ATPasa en vesículas de membrana plasmática de *M. tuberculosis* H37Ra y *M. smegmatis* mc²155 con 500 μM de Ca²⁺ libre.

Figura 6-4. Geles de agarosa al 1% mostrando la amplificación del gen *ctpH* desde DNA genómico.

Figura 6-5. Simulación de la clonación del fragmento generado por PCR a partir del DNA genómico en el vector de clonación pJET1.2.

Figura 6-6. Gel de electroforesis en agarosa al 1% del tamizaje de restricción con HindIII de los plásmidos extraídos de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el producto de ligación H-pJET.

Figura 6-7. Gel de agarosa al 1% de la electroforesis del mapeo de restricción del plásmido obtenido de la colonia H_{1e}, resultante de la transformación de *E. coli* DH5α con el producto de ligación entre el fragmento H1 y el vector de clonación pJET1.2, utilizando las enzimas HindIII, BglII, PstI, y XhoI.

Figura 6-8. Esquema general de construcción del recombinante de expresión H-pBAD.

Figura 6-9. Gel de electroforesis en agarosa al 1% de la amplificación del fragmento *ctpH* con inserción de sitios para corte con enzimas de restricción, usando el plásmido H-pJET como plantilla.

Figura 6-10. Gel de electroforesis en agarosa al 1% de la digestión tanto del fragmento amplificado desde el recombinante H-pJET como del vector de expresión pBAD-A2 con las enzimas de restricción EcoRI y BglII (NEB).

Figura 6-11. Gel de electroforesis en agarosa al 1% del tamizaje con enzimas de restricción de los plásmidos extraídos de las colonias *E. coli* XL1-Blue (X1) y TOP10 (T1 – T7) resultantes de la transformación con el producto de ligación entre el vector pBAD-A2 y el fragmento *ctpH* doblemente digeridos.

Figura 6-12. Gel de electroforesis en agarosa al 1% del corte con *Hind*III y *Eco*RI del plásmido X1 extraído de la colonia obtenida por la transformación de la cepa de *E. coli* XL1-Blue con el producto de ligación entre *ctpH* y pBAD-A2 doblemente digeridos.

Figura 6-13. Secuenciación del plásmido obtenido a partir de la colonia X1 como posible recombinante H-pBAD.

Figura 6-14. Alineamiento entre la secuencia generada con el iniciador de secuenciación pBAD fw y la secuencia esperada para el recombinante H-pBAD.

Figura 6-15. Predicciones realizadas en el programa Clone Manager de posibles hibridaciones inespecíficas del iniciador H-BglIII en la secuencia del recombinante H-pJET utilizada como plantilla en la PCR.

Figura 6-16. Esquema de hibridación inespecífico del iniciador H-BglIII en el plasmido H-pJET.

Figura 6-17. Digestión del fragmento amplificado con los primers H-BglIII y H-EcoRI a partir del recombinante H-pJET con la enzima *Xho*I.

Figura 6-18. Tamizaje de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el producto de ligación entre el fragmento *ctpH* amplificado desde H-pJET y el vector de expresión pBAD-A2. El recombinante esperado de la ligación se denominó H-pBAD.

Figura 6-19. Mapeo de restricción del plásmido obtenido de la colonia 4.7 de *E. coli* DH5 α transformada con el producto de ligación entre el fragmento *ctpH* y el vector de expresión pBAD-A2.

Figura 6-20. Correlación entre los niveles de expresión observados en células completas y los obtenidos en fracción membranal, para la expresión de 24 ATPasas tipo P utilizando vectores pET y pBAD.

Figura 6-21. Mecanismo de regulación del promotor *araBAD* por parte de la proteína AraC.

Figura 6-22. Resultado de la predicción de péptido señal en la secuencia proteína CtpH de *M. tuberculosis*, utilizando la herramienta SignalP 4.1 con el algoritmo para bacterias Gram-positivas.

Figura 6-23. Optimización del tiempo de inducción con L-arabinosa 0,02% y 0,2% de la expresión de la proteína CtpH en la cepa *E. coli* TOP10.

Figura 6-24. Optimización de la concentración de L-arabinosa necesaria para la inducción de la expresión de la proteína CtpH en la cepa *E. coli* TOP10 después de 2 h de inducción a 37°C.

Figura 6-25. Optimización del tiempo de inducción y la concentración de L-arabinosa para la expresión de CtpH a 37°C en *E. coli* BL21 Rosetta2.

Figura 6-26. Seguimiento del crecimiento post-inducción de las cepas TOP10 y Rosetta2 de *E. coli* durante la expresión de la proteína CtpH con 0,2% de L-arabinosa.

Figura 6-27. Inmunoblot en membrana de PVDF de la ubicación de la proteína CtpH en las fracciones subcelulares obtenidas de la expresión en Rosetta2 con una concentración de L-arabinosa de 0,2% durante un tiempo de 5h.

Figura 6-28. Orientación de las vesículas de membrana obtenidas después de la lisis celular y la centrifugación diferencial de las células de *E. coli* sometidas a inducción de la expresión de la proteína CtpH.

Figura 6-29. Fundamento de la determinación de la actividad ATPasa mediante la cuantificación del fosfato liberado durante el ciclo catalítico de la ATPasa tipo P en el transporte de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$.

Figura 6-30. Estimulación de la actividad ATPasa con concentraciones fisiológicas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 que expresaron la proteína CtpH.

Figura 6-31. Comparación de las estructuras adoptadas por los iones fosfato y vanadato.

Figura 6-32. Estimulación de la actividad ATPasa con concentraciones fisiológicas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 que expresaron la proteína CtpH en ausencia y en presencia de $(\text{NH}_4)_3\text{VO}_4$ 50 μM .

Figura 6-33. Tipos de señales registradas en SSM dependiendo de la dirección del transporte de carga neto en vesículas de membrana adsorbidas sobre la bicapa lipídica artificial (SSM).

Figura 6-34. Medición de artefactos sobre la SSM con un protocolo de intercambio simple de soluciones. A: Mg^{2+} (2mM), NA: Mg^{2+} (2mM) + ATP (300 μM).

Figura 6-35. Comparación de las corrientes transitorias generadas mediante dos protocolos de intercambio de soluciones diferentes en las medidas electrofisiológicas sobre vesículas control adheridas a la SSM.

Figura 6-36. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 2 mM de MgCl_2 y 128 mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza iónica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control y con vesículas que expresaron la proteína CtpH adheridas a la SSM.

Figura 6-37. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 50mM de KCl y 80mM de NaCl. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control y con aquellas que expresaron la proteína CtpH adheridas a la SSM.

Figura 6-38. Acoplamiento entre dos tipos comunes de transporte presentes en células eucariotas: transporte activo primario y transporte activo secundario.

Figura 6-39. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 80mM de NaCl y 50mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza ionica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control y con aquellas que expresaron la proteína CtpH adheridas a la SSM.

Figura 6-40. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 0,5 mM de CaCl_2 (30 μM Ca^{2+} libre) y 129,5 mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza ionica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control y con aquellas que expresaron la proteína CtpH adheridas a la SSM.

Figura 6-41. Estructuras globales y arquitecturas de los sitios de unión al ion de cuatro ATPasas tipo P distintas transportadoras de metales alcalinos/alcalinotérreos y protones.

Figura 6-42. *M. tuberculosis* inhibe el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} y previene el reclutamiento de hidrolasas lisosomales.

Figura A-1: Vector de clonación pJET1.2/blunt® (ThermoScientific /Fermentas).

Figura A-2: Vector de expresión pBAD-A2 modificado desde el vector comercial pBAD/HisA.

Figura A-3: Mapa del vector pRARE presente en la cepa de *E. coli* Rosetta 2

Figura B-1. Mapa de los recombinantes obtenidos en el presente trabajo.

Figura C-1. Secuenciación del recombinante H-pJET.

Figura C-2. Secuenciación del recombinante H-pJET.

Lista de tablas

Tabla 2-1. Principales funciones y distribución entre los organismos de las subfamilias de ATPasas tipo P

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

Tabla 5-2. Secuencias y características de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* usando DNA genómico de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra como plantilla.

Tabla 5-3. Secuencias y características de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* con sitios para corte con enzimas de restricción *BglII* y *EcoRI*.

Tabla 5-4. Iniciadores diseñados para la secuenciación de recombinantes.

Tabla 5-5. Composición de las soluciones preparadas para las medidas electrofisiológicas en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 – CtpH adsorbidas a la SSM.

Tabla 6-1. Predicción de péptido señal para las secuencias de ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos/alcalinotérreos presentes en *M. tuberculosis*, utilizando las herramientas Signal P para bacterias Gram-positivas (Gram+), SPEPLip para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gram-) y Phobius.

Lista de abreviaturas

ADP	Adenosina difosfato
Amp	Ampicilina
Asp	Aspartato
ATP	Adenosina trifosfato
BCPI	Bromo-4-cloro-3-indolilfosfato
Car	Carbenicilina
Cam	Cloranfenicol
CL	Cardiolipina
Cm	Capacitancia de la membrana soportada en sólido
Cp	Capacitancia de las vesículas de membrana
CR	Receptor del complemento
CholCl	Cloruro de colina
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP	Desoxinucleótido trifosfato
DTT	Ditiotreitol
ED	Electrodensa
EDTA	Ácido etilendiamintetracético
EGTA	Acido etilenglicol tetraacético
EMB	Etambutol
ET	Electrotransparente
FcR	Receptor Fc
FUPA	Functionally uncharacterized P-type ATPase family
Glu	Glutamato
Gm	Conductancia de la membrana soportada en sólido
Gp	Conductancia de la vesícula de membrana
His	Histidina

HPLC	Cromatografía líquida de alta eficiencia
HEPES	Acido 4-(2-hidroxietyl)-1-piperazinetanosulfónico
IFN- γ	Interferon gamma
INH	Isoniazida
IgG	Inmunoglobulina G
IPTG	Isopropil β -D-1 tiogalactopiranosido
LCT	Lisados celulares totales
LAM	Lipoarabinomanano
LB	Luria Bertani
LM	Lipomanano
MAC	Complejo <i>Mycobacterium avium</i>
MCS	Sitio múltiple de clonación
MMR	Receptores de manosa
MDR-TB	Cepas multidrogoresistentes de <i>M. tuberculosis</i>
MOPS	Acido 3-(N-morfolino)propanosulfónico
MW	Marcador de peso molecular
NBT	Nitroazul tetrazolio
OD ₆₀₀	Densidad óptica a 600nm
OMS	Organización Mundial de la Salud
PC	Fosfatidilcolina
PCR	Reaccion en cadena de la polimerasa
PDB	Protein Data Bank
PDIM	Ftiocerol dimicocerosato
PE	Fosfatidiletanolamina
PEG	Polietilenglicol
PG	Fosfatidilglicerol
PGL	Glicolípidos fenólicos
Pi	Fosfato inorgánico

PI	Fosfatidilinositol
PIM	Manosido de fosfatidilinositol
PM	Membrana plasmática
PMSF	Fluoruro de fenilmetilsulfonilo
PVDF	Polifluoruro de vinilideno
PZ	Pirazinamida
RE	Electrodo de referencia
RIF	Rifampicina
RNI	Intermediarios reactivos de nitrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
ROI	Intermediarios reactivos de oxígeno
SDS- PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio
SERCA	Ca ²⁺ ATPasa de Retículo Sarcoplásmico
SL	Sulfolípido
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
SM	Estreptomina
SSM	Membranas soportadas en sólido
TAE	Buffer Tris-acetato-EDTA
TEM	Microscopía electrónica de transmisión
TB	Tuberculosis
TBS	Buffer salino Tris
TLR	Receptores tipo <i>toll like</i>
Tm	Temperatura de hibridación
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultravioleta
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR-TB	Cepas extremadamente resistentes de <i>M. tuberculosis</i>

Resumen

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es una prioridad para el control de la tuberculosis. El desarrollo de agentes antituberculosos requiere del conocimiento de nuevas dianas celulares esenciales y el entendimiento de sus mecanismos de acción. Las ATPasas tipo P han sido propuestas como dianas para el diseño de compuestos antimicrobianos contra algunos patógenos humanos. El mantenimiento de los gradientes de iones esenciales a través de la membrana celular de la micobacteria hace que estas proteínas sean cruciales para la supervivencia celular. Específicamente, los gradientes del ion Ca^{2+} junto con otros iones como Na^+ , K^+ y H^+ controlan numerosos procesos de transporte secundarios e imponen una regulación astringente en diversas vías de señalización [Yatime, *et al.* 2009].

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

Este gran número de ATPasas, puede dar la versatilidad requerida al bacilo para adaptarse a los nichos intra- y extracelulares durante las diferentes etapas de la infección, las cuales difieren marcadamente en osmolaridad, concentraciones de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes. Se ha comprobado que la micobacteria necesita la acción de ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados para su supervivencia frente al aumento en las concentraciones de Cu^+ y Zn^{2+} , mecanismo utilizado por el macrófago para intentar eliminar al bacilo [Botella, H. *et al.*, 2011; Sarah, W., *et al.*, 2010].

Nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la caracterización de las ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos debido a que podrían jugar un papel vital en el control de las concentraciones intrafagosomales de Ca^{2+} , K^+ y/o Cl^- cuyas variaciones han demostrado estar ligadas a la inhibición de la fusión fagosoma lisosoma [Soldati y Neyrolles, 2012].

De los 12 marcos de lectura codificantes de ATPasas tipo P presentes en el genoma de *M. tuberculosis* se escogió como enzima de estudio la secuencia CtpH debido no solo a su posible especificidad hacia el transporte de metales alcalinos y alcalinotérreos, sino también por la inusual presencia de un segmento largo N-terminal no encontrado en otras estructuras comunes de ATPasas tipo P. Aparentemente este segmento no está implicado en el mecanismo de transporte y su posible función podría ser regulatoria.

El presente trabajo constituye la primera aproximación experimental hacia la definición de la especificidad iónica de la proteína CtpH de *M. tuberculosis* mediante su expresión heteróloga en la membrana de *E. coli*. Ensayos bioquímicos de actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas en vesículas de membrana mediante la técnica SSM permitieron identificar el transporte de Na^+/K^+ y/o Ca^{2+} a través de esta proteína.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas tipo P, CtpH

Abstract

The search for new therapies is a priority for TB control. The development of antituberculosis agents requires knowledge of new essential cellular targets and understanding their mechanisms of action. P-type ATPases have been proposed as targets for the design of antimicrobial compounds against several human pathogens.

Maintaining essential ion gradients across cell membrane of mycobacteria makes these proteins critical for cell survival. Specifically, the gradients of the Ca^{2+} ion along with other ions such as Na^+ , K^+ and H^+ control various transport processes and impose an astringent regulation in various signaling pathways [Yatime, et al. 2009].

Genome bioinformatics studies of *M. tuberculosis* showed that there are 28 sequences encoding putative metal ion transporters, including 12 P-type ATPases (CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpE, CtpF, CtpG, CtpH, CtpI, CtpJ, CtpV and KdpB), which have been poorly characterized experimentally [Novoa et. al., 2012; Agranoff, D and Krishna, S., 2004, 1998]. Some of these reading frames are also encoded by *M. leprae* suggesting that play a role at the intracellular level, as this organism survives only within host cells. This large number of ATPases might give the bacillus the required versatility to adapt to intra-and extracellular niche during different stages of infection, which differ markedly in osmolarity, metal ion concentrations, pH and nutrient availability. It has been found that the mycobacteria need heavy metal P-type ATPases for survival when facing increasing concentrations of Cu^+ and Zn^{2+} , a mechanism used by the macrophage to try to eliminate the bacillus [Botella, H. et al., 2011, Sarah, W., et al., 2010].

Our research group has focused on the characterization of the P type ATPase transporters of alkaline and alkaline earth metals because they could play a vital role in the control of intraphagosomal concentrations of Ca^{2+} , K^+ and/or Cl^- whose variations have been shown to be linked to inhibiting the phagosome-lysosome fusion [Soldati and Neyrolles, 2012].

Of the 12 reading frames coding P type ATPases present in the genome of *M. tuberculosis*, the enzyme CtpH was chosen for study not only because of their potential specificity for transporting alkaline and alkaline earth metals, but also by the presence of an unusually large N-terminal segment not found in other common structures of P-type ATPases. Apparently this segment is not involved in the transport mechanism and its possible function might be regulatory.

This work is the first experimental approach to the definition of the ionic specificity of the protein CtpH of *M. tuberculosis* through heterologous expression in the membrane of *E. coli*. Biochemical assays of ATPase activity and electrophysiological measurements in membrane vesicles employing SSM technique allowed the identification of Na^+/K^+ and/or Ca^{2+} transport through this protein

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, P type ATPases, CtpH

1. Justificación

Durante la década de 1980 muchos expertos creían que los días de la TB como una amenaza para la población mundial habían terminado debido a la disminución de la incidencia de nuevos casos. Sin embargo, durante las últimas dos décadas la situación ha cambiado dramáticamente, debido principalmente a la co-infección con el VIH y la aparición de cepas de *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) resistentes a los compuestos antituberculosos, en especial las cepas extremadamente resistentes a los antibióticos (XDR) y la existencia de la TB latente. Esta última situación clínica existe en aproximadamente un tercio de la población mundial convirtiéndose en un reservorio de la enfermedad que causa 1.7 millones de muertes por año [Philips, J., Ernst, J., 2012].

En Colombia el Ministerio de Salud y Protección Social y el Instituto Nacional de Salud (INS) reportaron que durante el año 2011 se presentaron 10731 nuevos casos de TB, siendo los departamentos de Choco, Quindio y Guajira los mas afectados [MINSALUD, 2012; INS, 2009]. Esto indica que esta enfermedad continua siendo un problema de salud pública para nuestro país; en el año 2008 se reportó el primer caso de TB causado por la cepa XDR Beijing, lo que pone a Colombia en una situación de alerta sanitaria frente a la TB multiresistente.

La búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas es una prioridad para el control de la TB. El desarrollo de agentes antituberculosos requiere del conocimiento de nuevas dianas celulares esenciales y el entendimiento de sus mecanismos de acción. Las ATPasas tipo P han sido propuestas como dianas para el diseño de compuestos antimicrobianos contra algunos patógenos humanos. El mantenimiento de los gradientes de iones esenciales a través de la membrana celular de la micobacteria hace que estas proteínas sean cruciales para la supervivencia celular, especialmente en las condiciones de estrés a las que se somete el bacilo en la TB latente. Específicamente, los gradientes del ion Ca^{2+} junto con otros iones como Na^+ , K^+ y H^+ controlan numerosos procesos de transporte secundarios e imponen una regulación astringente en diversas vías de señalización [Yatime, *et al.* 2009].

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

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

ha comprobado que la micobacteria necesita la acción de ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados para su supervivencia frente al aumento en las concentraciones de Cu^+ y Zn^{2+} , mecanismo utilizado por el macrófago para intentar eliminar al bacilo [Botella, H. et al., 2011; Sarah, W., et al., 2010] .

Nuestro grupo de investigación se ha enfocado en la caracterización de las ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos debido a que podrían jugar un papel vital en el control de las concentraciones intrafagosomales de Ca^{2+} , K^+ y/o Cl^- cuyas variaciones han demostrado estar ligadas a la inhibición de la fusión fagosoma lisosoma [Soldati y Neyrolles, 2012].

De los 12 marcos de lectura codificantes de ATPasas tipo P presentes en el genoma de *M. tuberculosis* se escogió como enzima de estudio la secuencia CtpH debido no solo a su posible especificidad hacia el transporte de metales alcalinos y alcalinotérreos, sino también por la inusual presencia de un segmento largo N-terminal no encontrado en otras estructuras comunes de ATPasas tipo P. Aparentemente este segmento no está implicado en el mecanismo de transporte y su posible función podría ser regulatoria.

Por lo tanto, el desarrollo de la presente propuesta, puede aportar a la comprensión de los mecanismos mediante los cuales la micobacteria se adapta a las condiciones hostiles del hospedero, las cuales difieren en la concentración de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes. A largo plazo, se pretende contribuir a la búsqueda de nuevos compuestos antituberculosos encaminados a combatir la micobacteria resistente y/o latente.

2. Marco Teórico

2.1 Enfermedad tuberculosa

La TB es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *M. tuberculosis*. Típicamente afecta los pulmones (TB pulmonar), pero también puede afectar otros tejidos diferentes (TB extrapulmonar) como los órganos linfáticos o el tejido óseo. El bacilo tuberculoso es dispersado en el aire cuando las personas que tienen la enfermedad activa expulsan la bacteria durante la tos prolongada. Esas minúsculas gotas pueden permanecer en el aire por minutos u horas después de la expectoración. El número de bacilos en las gotas, la virulencia del bacilo, la exposición del bacilo a la luz UV, el grado de ventilación y el ambiente para la aerosolización de las micobacterias, son factores que influyen en la transmisión. La llegada de la micobacteria a los pulmones conlleva a la infección del sistema respiratorio [Knechel, 2009].

En general, solo una pequeña proporción (5-10%) de la población infectada con *M. tuberculosis* desarrollan la TB activa durante los primeros años después de la exposición; sin embargo la probabilidad de desarrollar los síntomas típicos de la enfermedad activa aumentan entre las personas infectadas con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH). La TB es la infección oportunista más común entre personas con el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA). De hecho la TB que podría ser un indicativo de casos de SIDA no diagnosticados [Vergne, et al, 2004]. La TB es más común entre hombres que entre mujeres y afecta en su mayoría a adultos y a personas que se encuentran en una edad económicamente productiva; se estima que cerca de dos tercios de los casos ocurren en personas entre los 15 y 59 años. Cuando esta enfermedad no es tratada con prontitud y de la manera adecuada los índices de mortalidad son altos.

Las combinaciones de medicamentos antituberculosos en los tratamientos pueden contribuir a una reducción dramática de las proporciones de mortalidad. En ensayos clínicos se han documentado hasta un 90% de personas curadas por el empleo de tales medicamentos. Sin embargo, a pesar de la disponibilidad de tratamientos altamente eficaces, la TB se mantiene como un problema de salud global. En el año de 1993, la OMS declaró la emergencia global de salud pública debido a la aparición de entre 7 y 8 millones de casos y 1,3 a 1,6 millones de muertes, por año. En el año 2010, se presentaron casi 9 millones de casos de infección con TB, de los cuales se reportaron 1,5 millones de muertes, incluyendo pacientes coinfectados con VIH. La TB se mantiene como la segunda causa de muerte por enfermedades infecciosas en el mundo, después del SIDA [WHO, 2012].

Una de las razones actuales más importantes que impiden el control de la TB es que, aun cuando se usan las mejores estrategias terapéuticas disponibles, el tratamiento debe ser continuo durante al menos seis meses. Este régimen no se cumple a cabalidad debido a que los pacientes, al sentirse bien después de unas pocas semanas, paran de tomar los medicamentos. La solución a esto es una terapia directamente observada en

la cual el paciente es supervisado mientras tenga tomar cada una de las dosis. La razón para que se necesite este régimen de seis meses es que la quimioterapia elimina la mayoría de bacterias en unos pocos días, pero hay algunas persistentes que presumiblemente no presentan un metabolismo completamente activo y, por tanto, no son eliminadas por los medicamentos. Estos bacilos persistentes pueden estar en un verdadero estado estacionario o pueden estarse replicando a una velocidad extremadamente baja en lesiones antiguas o en los sitios de fibrosis o calcificación donde la disponibilidad de oxígeno es bastante baja [Rook, Hernández-Pando, 1996].

2.2 Genero *Mycobacterium*

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

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

2.3 Características del bacilo *M. tuberculosis*

M. tuberculosis es un microorganismo aerobio no formador de esporas, cuyo genoma es rico en G+C (62-70%) y que mide entre 0,5 – 3 µm. A diferencia de las bacterias Gram-negativas, las micobacterias no tienen una membrana adicional en las capas externas de la pared celular. Estructuralmente, son más cercanas a las bacterias Gram-positivas, sin embargo, la micobacteria no se ajusta dentro de esta categoría debido a que las moléculas unidas a la pared celular son lípidos, más que proteínas o polisacáridos. Las micobacterias no retienen el cristal violeta lo cual hace que aparezcan como “fantasmas” después de la tinción de Gram, dándole categoría de Gram-indeterminadas. La pared

celular de la micobacteria es impermeable a anilina y a otros colorantes comúnmente usados a menos que se combinen con fenol. Se dice que las micobacterias con ácido-alcohol resistentes, es decir que son resistentes a la decoloración con soluciones de ácido – alcohol después de la tinción con colorantes tipo arilmetano, tales como fucsina. Esta característica es importante para la identificación de bacilos tuberculosos [Palomino, et al., 2007].

Una de sus características más sobresalientes es la presencia de una pared celular compleja y bien desarrollada, la cual contiene una cantidad considerable de ácidos micólicos covalentemente unidos a la capa subyacente de polisacárido arabinogalactano que a su vez se encuentra unida a peptidoglicano (Figura 2-1). Esta barrera, extraordinariamente rica en lípidos, se ha asociado a muchas de las características fisiológicas del bacilo tuberculoso, incluyendo la resistencia a los antibióticos y los mecanismos de defensa frente al hospedero. La composición y cantidad de los componentes de la pared celular influyen en la virulencia de la bacteria y en su velocidad de crecimiento. Otro componente importante de la pared celular es el lipoarabinomano (LAM), un carbohidrato que se ancla a la membrana plasmática y se extienden hasta el exterior de la pared celular [Knechel, 2009].

En general se pueden visualizar cuatro capas constituyentes de la envoltura celular de las micobacterias (Figura 2-1). La primera capa corresponde a la membrana plasmática (PM) que es similar a la encontrada en otras bacterias y que consiste de una bicapa lipídica semipermeable. Los fosfolípidos más comunes presentes en la PM son fosfatidilglicerol (PG), cardiolipina (CL), difosfatidilglicerol, fosfatidiletanolamina (PE), fosfatidilinositol (PI) y sus manosidos (PIMs) [Brennan, P., Nikaido, H., 1995]. Las micobacterias no tienen fosfatidilcolina (PC). El mayor componente de la membrana plasmática es la CL (aproximadamente 52%), PIM (36-38%) y PE (aprox. 10%) [Dafeé M, 2008; Goren M, 1972]. Esta interface provee protección osmótica, regula el tráfico de solutos específicos entre el citoplasma y el ambiente y abarca funciones de mantenimiento para la célula. La membrana contiene proteínas con diferentes funciones como por ejemplo proteínas encargadas de sensar cambios en la concentración de algunas moléculas en el medio exterior, proteínas translocadoras de señales, enzimas involucradas en procesos metabólicos y generación de energía, y transportadores que median el paso selectivo de nutrientes y iones. La segunda capa es llamada electro-densa (ED) debido a sus propiedades de tinción cuando es observada por microscopía electrónica de transmisión (TEM). En esta área se encuentran las fracciones de peptidoglicano y arabinogalactano que conforman los componentes estructurales básicos de la pared celular [Barrow, 1997]. La capa interna de peptidoglicano parece ser la responsable de la forma del bacilo y de su integridad estructural, a la vez que presenta un número inusualmente alto de entrecruzamientos. De hecho el grado de entrecruzamiento de la capa de peptidoglicanos en *M. tuberculosis* es de 70-80%, mientras que en *E. coli*, es 20-30%. A continuación se encuentra el arabinogalactano que esta unido de forma covalente al polisacárido ramificado peptidoglicano, cuyos extremos están esterificados con ácidos grasos de alto peso molecular conocidos como ácidos micólicos, los cuales se observan como una zona electro-transparente (ET) mediante

TEM [Palomino, et al., 2007]. Los ácidos micólicos están compuestos de cadenas ramificadas largas que contienen entre 60 – 90 átomos de carbono. Las diferentes especies de micobacterias presentan diferentes tipos de ácidos micólicos, una propiedad que permite la identificación de varias especies de micobacteria mediante el análisis mediante HPLC, y cromatografía en capa fina. Los ácidos micólicos específicos de *M. tuberculosis* son alfa, ceto y metoximicolatos que contienen 76 a 82, 84 a 89 y 83 a 90 carbonos, respectivamente. Se cree que estos ácidos micólicos son los mayores determinantes de la resistencia intrínseca de la micobacteria a la mayoría de antibióticos, agentes quimioterapéuticos y desinfectantes químicos [Niederweis, 2008].

En las capas más externas se pueden encontrar un arreglo de lípidos conocidos como lípidos libres [Barrow, 1997]. Entre ellos, específicamente para *M. tuberculosis*, se encuentran los ftiocerol dimicocerosatos (DIM), glicolípidos fenólicos (PGL) y sulfolípidos (SL) que contienen trehalosa [Barrow, 1997]. Los DIM tienen la característica de ser estructuras altamente apolares, tienen 35 carbonos como grupos metilo o metileno. También poseen dos grupos reactivos hidroxilo que están esterificados con ácidos micocerósicos. Se ha reportado su presencia tanto en cepas altamente atenuadas como en las más virulentas, incluyendo *M. tuberculosis* H37Rv [Brennan, P., 2003]. Los PGL se caracterizan por una fracción hidrofóbica larga que contiene un diol fenólico de 36 carbonos (C36) sustituido por dos moléculas del ácido graso micocerosato. La fracción de oligosacárido contiene de 1-4 residuos de azúcar, los cuales son deoxi azúcares o-metilados. Se ha encontrado que los PGLs contribuyen a la supervivencia intracelular de *M. leprae* dentro de los macrófagos debido a su capacidad para eliminar radicales de oxígeno [Brennan, P., Nikaido, H., 1995]. En cuanto a los SL, se ha establecido que juegan un papel importante en la virulencia en cobayos. Las cepas más virulentas fabricaban abundantemente SL, mientras que las atenuadas eran deficientes en esos componentes [Brennan, P., 2003].

Atravesando completamente la envoltura celular se encuentran otros glicolípidos tales como manósidos de fosfatidil-mioinositol, lipomananos (LM) y LAM. Los LAM presentan un carácter inmunogénico facilitan la supervivencia de la micobacteria dentro de los macrófagos. Estos lípidos han sido asociados específicamente a la inhibición de la activación de los macrófagos mediada por el interferón gamma (IFN- γ), la supresión de la proliferación de las células T, entre otras [Barrow, W., 1997]. En la capa externa también se pueden encontrar porinas formando poros hidrofílicos que permiten la difusión pasiva de solutos acuosos a través de la capa de ácidos micólicos. Estas porinas micobacterianas parecen ser diferentes de las encontradas en las bacterias Gram-negativas [Palomino, et al., 2007].

La envoltura celular de la micobacteria parece ser una estructura dinámica que puede ser remodelada a medida que el microorganismo crece o persiste en diferentes ambientes. De hecho hay estudios que demuestran que, al interferir con la síntesis de algunos componentes de la pared celular en condiciones de crecimiento, se pueden producir esferoplastos deficientes de pared que, aparentemente, no son patógenos [Palomino, et

al., 2007; Beran, V., et al., 2000]. También se ha observado el adelgazamiento de la pared celular en condiciones deficientes de oxígeno [Palomino, et al., 2007].

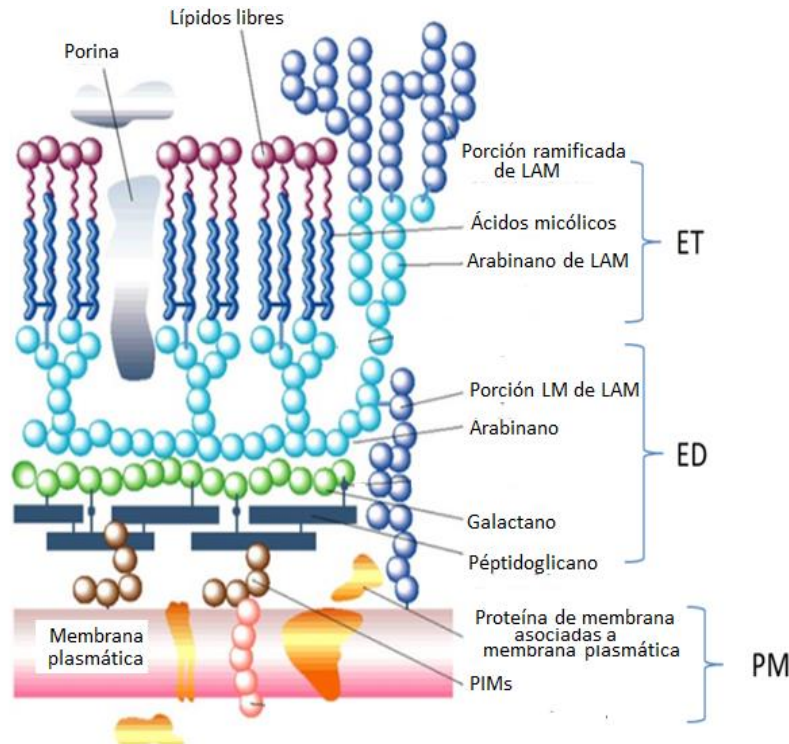


Figura 2-1. Envoltura celular de *M. tuberculosis*. (Modificado de Park, S., Bendelac, A., 2000). LAM: Lipoarabinomano, LM: Lipomano, PIMs: Manosidos de fosfatidilinositol. ET: capa electron-transparente, ED: capa electron-densa, PM: capa de la membrana plasmática.

2.4 Patogénesis de la infección con *M. tuberculosis*

Una vez inhaladas, las gotas infecciosas que contienen el patógeno se pueden adherir a través de las vías aéreas. La mayoría de bacilos son atrapados en las partes superiores de estas vías donde existen células secretoras de mucosa. La mucosa producida captura sustancias extrañas mientras que los cilios presentes en las células epiteliales empujan tanto la mucosa como las partículas atrapadas hacia afuera. Este sistema provee al organismo de una defensa física inicial que previene la infección en la mayoría de personas expuestas a la TB. Las bacterias que sobrepasan el sistema de mucosa y cilios y alcanzan los alveolos pulmonares son rápidamente rodeadas y envueltas por los macrófagos alveolares, que son efectoras inmunes más abundantes presentes en los espacios alveolares [Knechel, 2009].

Los macrófagos son células fagocíticas disponibles que combaten muchos patógenos sin requerir su exposición previa. Varios mecanismos y receptores están involucrados en la toma de la micobacteria por parte de los macrófagos (Figura 2-2). Un número de estudios

relacionados con los receptores de la superficie de los macrófagos involucrados en la toma de *M. tuberculosis*, han mostrado que los receptores complemento (CR) y la opsonización de la micobacteria mediada por el complemento constituyen la mayor ruta de entrada, aunque también han sido implicados receptores adicionales. Las proteínas del complemento se unen a la pared celular y mejoran el reconocimiento de la micobacteria por parte del macrófago. Los receptores de complemento CR1, CR3 y CR4 y los receptores de manosa (MMR) promueven la toma de la micobacteria por parte de estas células [Schlesinger, L., 1993]. El receptor CR3 puede facilitar la fagocitosis de la micobacteria vía opsoninas del complemento o vía mecanismos basados en lectinas comprometiendo distintos dominios de los receptores del complemento. Otros receptores presentes en la membrana plasmática de los macrófagos que podrían interactuar con la micobacteria son los *toll-like*, específicamente TLR-2 y TLR-4, los cuales interactúan presuntamente con los LAM [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003]. Algunos experimentos han mostrado que el bloqueo de receptores individuales no altera significativamente la internalización de la micobacteria [Vergne, et al., 2004]. Sin embargo, también se ha demostrado que la selección del receptor para la internalización de la micobacteria puede influenciar la respuesta celular; por ejemplo, la fagocitosis de la micobacteria opsonizada con IgG vía receptores Fc (FcR) resulta en la activación de los sistemas antimicrobianos del macrófago, mientras que la internalización vía CR3 no activa apropiadamente la respuesta de este tipo en la célula del hospedero [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003].

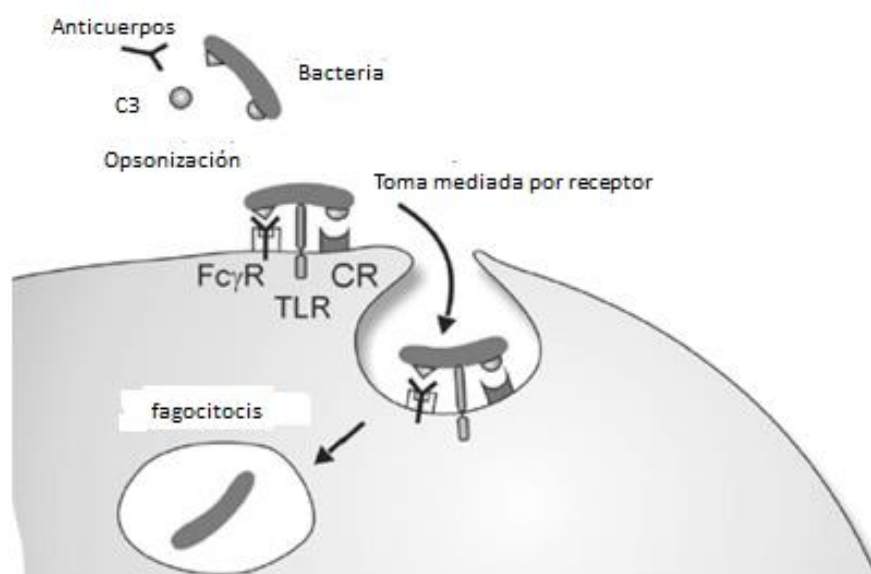


Figura 2-2. Receptores de macrófagos involucrados en la interacción con la micobacteria (Modificado de Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003). La fagocitosis de la micobacteria es mediada por varios receptores incluyendo receptores tipo *toll-like* (TLR), receptores complemento (CR) y receptores Fc- γ . La manera en que la micobacteria se internalice puede influenciar la respuesta celular.

La fagocitosis por los macrófagos inicia una cascada de eventos que en muchos casos resulta en el control de la micobacteria seguida por una infección latente, o en menor proporción a una progresión a una enfermedad activa, llamada TB progresiva primaria. La ruta que se escoja depende esencialmente de la calidad de las defensas del hospedero y del balance que ocurra entre estas y la invasión de la micobacteria (Fig. 2-3).

Después de ser internalizada por los macrófagos, la micobacteria se multiplica lentamente, con una división celular bacteriana ocurriendo cada 25 a 32 h. Sin importar si la infección es controlada o progresiva, el desarrollo inicial involucra la producción de enzimas proteolíticas y citoquinas por parte de los macrófagos en un intento por degradar la bacteria. Las citoquinas liberadas atraen a los linfocitos T, células que constituyen la inmunidad mediada por células, así como también a monocitos inactivados y neutrófilos, ninguno de los cuales mata la bacteria de manera eficiente [Smith, 2003]. Los macrófagos presentan antígenos micobacterianos sobre su superficie a los linfocitos T. Este proceso inmune inicial continúa por 2 a 12 semanas; los microorganismos continúan creciendo hasta que alcanzan el número suficiente para provocar completamente la respuesta inmune mediada por células, la cual puede ser detectada por un test de piel [Knechel, 2009].

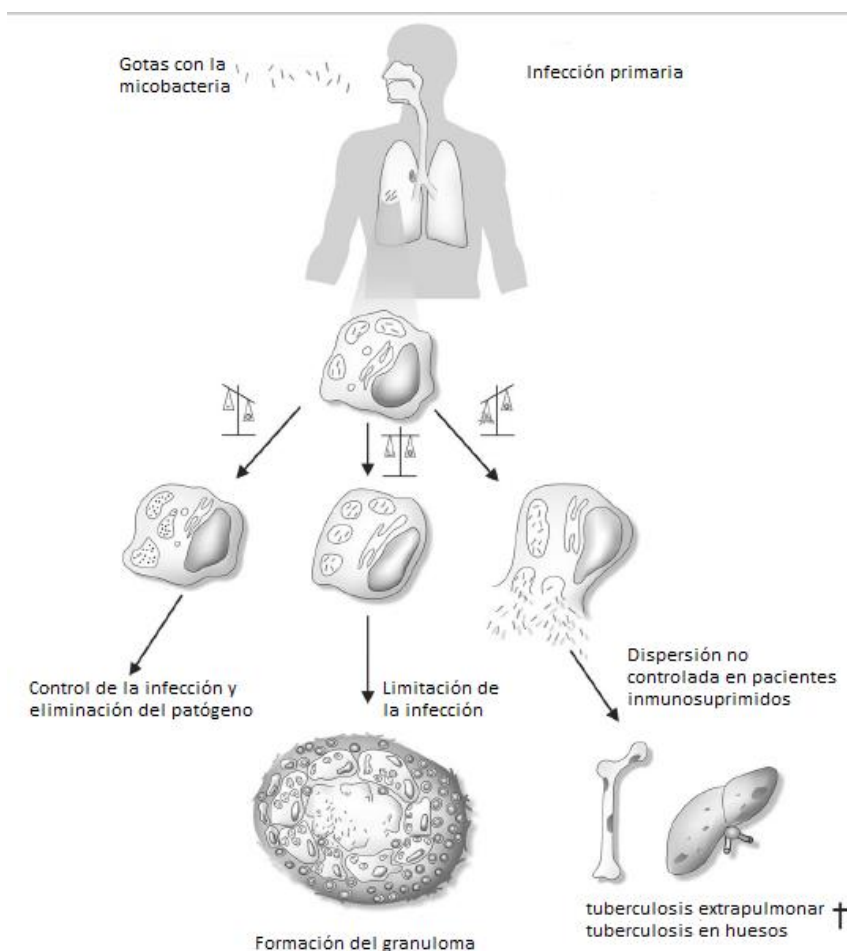


Figura 2-3. Balance entre *M. tuberculosis* y el sistema inmune del hospedero. *M. tuberculosis* es inhalado en gotas; Después de un periodo de incubación, entre 4-12 semanas, los macrófagos alveolares infectados destruyen a las bacterias (izquierda) o fallan en contener al patógeno y mueren (derecha). En el primer caso la infección es abortiva, en el segundo caso, el patógeno se dispersa por el cuerpo y causa TB activa. Dado que la respuesta inmune y la virulencia de *M. tuberculosis* se equilibran (centro), las bacterias intracelulares son restringidas por los macrófagos, y el sistema inmune aísla el sitio de infección primaria mediante la formación de granulomas (lesión primaria). (Tomado de Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003 y Knechel, 2009).

Para personas cuya inmunidad mediada por células es eficiente, el siguiente paso defensivo es la formación de granulomas alrededor del bacilo (Figura 2-3) [Knechel, 2009]. La formación del granuloma es una respuesta al impedimento por parte de las células del sistema inmune de matar a la micobacteria, por tanto la estrategia es limitar su diseminación mediante la formación de estas estructuras. Esas lesiones de tipo nodular se forman a partir de una combinación de linfocitos T activados y macrófagos, los cuales crean un microambiente que limita la replicación y la dispersión de la micobacteria. Este ambiente destruye a los macrófagos y produce una necrosis temprana en el centro de la lesión; sin embargo, los bacilos son capaces de adaptarse y sobrevivir. De hecho, *M. tuberculosis*, puede cambiar su expresión fenotípica para mejorar la supervivencia. El ambiente necrótico, referido como una necrosis caseosa, se caracteriza por niveles bajos de oxígeno, bajo pH y nutrientes limitados. Esta condición restringe el crecimiento y establece la latencia. En personas con un sistema inmune menos efectivo las lesiones progresan a TB primaria progresiva. Para personas menos inmunocompetentes, la formación del granuloma no contiene exitosamente el bacilo. El tejido necrótico sufre licuefacción y la pared fibrosa pierde integridad estructural. El material necrótico semilíquido puede drenarse por los bronquios o por los vasos sanguíneos cercanos, dejando una cavidad llena de aire en el sitio original. Si ocurre la descarga de bacilos dentro de los vasos sanguíneos, es probable que aparezca la TB extrapulmonar [Knechel, 2009].

Gran parte del éxito de *M. tuberculosis* en establecer una infección se debe a que este microorganismo tiene la capacidad de interferir con el tráfico intracelular de membrana en macrófagos infectados. Este bacilo bloquea la biogénesis del fagolisosoma, organelo responsable de la eliminación normal de microorganismos en las células fagocíticas. Dentro del fagolisosoma las bacterias pueden encontrar un ambiente hostil que incluye pH ácido, intermediarios reactivos de oxígeno (ROI), enzimas lisosomales y péptidos tóxicos. Algunos estudios han permitido definir que también los intermediarios reactivos de nitrógeno (RNI) producidos por macrófagos activados de ratón son elementos principales en la actividad antimicrobiana [Smith, 2003].

La predilección de la micobacteria para entrar al macrófago hospedero e impedir la fusión fagosoma-lisosoma es central para la infección tuberculosa, la latencia, la activación de la enfermedad, la dispersión por el organismo hospedero y la supresión de la detección inmunológica por parte del hospedero [Vergne, et al, 2004]. Las características más sobresalientes del fagosoma que contiene a *M. tuberculosis* son la acidificación

incompleta del lumen y la ausencia de hidrolasas lisosomales maduras. Algunos estudios han demostrado que la manipulación de Ca^{2+} por parte del patógeno es responsable de esos fenómenos. Ya que el Ca^{2+} puede estimular muchas de las respuestas del hospedero a la infección como la producción de óxido nítrico (NO) y citoquinas, la prevención del incremento en los niveles de Ca^{2+} ayudaría a *M. tuberculosis* a evitar esos mecanismos de defensa del hospedero [Smith, 2003].

2.3 Persistencia y latencia

Como se mencionó anteriormente *M. tuberculosis* es capaz de producir tanto una enfermedad progresiva como una infección latente. Con el fin de evitar la confrontación directa con la defensa inmune del hospedero, *M. tuberculosis* retarda su velocidad de replicación y se transforma a un estado de dormancia, es decir, un estado de baja replicación y actividad metabólica reducida [Rodríguez, J., et al., 2012]. Aun después del control exitoso de la infección, algunos bacilos se mantienen en este estado por el resto de vida del individuo [Palomino, et al., 2007].

La TB latente describe la infección micobacteriana asintomática, restringida a un sitio primario de infección en la cual está el bacilo intacto, pero dormante. En estas condiciones, el sistema inmune no es capaz de eliminar la micobacteria del organismo. *M. tuberculosis* se mantiene en estado de dormancia hasta que se altere el balance entre la persistencia de la micobacteria y la respuesta inmune. Una respuesta deficiente por parte del hospedero, debida a la malnutrición, al uso de esteroides o a la co-infección con VIH, permite la reactivación del bacilo resultando en la manifestación clínica de la TB (Figura 2-4) [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003]. De esta manera las personas con la infección latente se convierten en reservorios de la enfermedad [Flynn, J., Chan, J., 2001].

En un intento por reproducir las condiciones ambientales presentes dentro de un granuloma pulmonar, Wayne y Hayes [Wayne, L., Hayes, L., 1996] establecieron un modelo *in vitro* de persistencia micobacteriana. En este modelo un cultivo sellado se incubaba durante un periodo de días mientras que la bacteria consume el oxígeno disponible; el cultivo se vuelve progresivamente más hipóxico y simultáneamente ocurre una alteración en la fisiología del bacilo. La agitación suave y una proporción definida de cultivo y espacio encima del cultivo, mejoran la reproducibilidad. Este modelo permitió proponer que *M. tuberculosis*, un bacilo típicamente aerobio, se adapta al contenido bajo de oxígeno típico del interior del granuloma. Wayne y Lin demostraron una atenuación metabólica en la micobacteria durante la disminución gradual de oxígeno. Además del paso a un estado de dormancia no-replicativo similar al que se presenta durante la infección latente, los bacilos en un medio conteniendo poco oxígeno son relativamente resistentes a agentes antimicobacterianos como isoniazida, pero son susceptibles a metronidazol, un medicamento utilizado en contra de las bacterias anaerobias [Flynn, J., Chan, J., 2001]. Esta resistencia a isoniazida en condiciones de poco oxígeno confirma la existencia de modificaciones a nivel de pared celular que sufre la micobacteria durante la

hipoxia, ya que su acción principal es la inhibición de la biosíntesis de ácidos micólicos [Rattan, A., et al., 1998]. Sin embargo, un estudio subsecuente *in vivo* demostró que el metronidazol no fue efectivo en el tratamiento de la TB persistente en modelos murinos [Flynn, J., Chan, J., 2001]. Recientes estudios basados en el modelo de Wayne han identificado que la síntesis del NAD, el mantenimiento de la fuerza protón-motriz y la síntesis de ATP son procesos esenciales en la bacteria no replicativa [Rustad, T., et al., 2009].

Es también importante, para *M. tuberculosis* expuesta a condiciones hipóxicas, la sobreexpresión de unas enzimas involucradas en el ciclo del glioxilato, una vía metabólica que convierte los ácidos grasos en carbohidratos. Las enzimas isocitrato liasa y malato sintasa convierten Acetil-CoA derivado de los ácidos grasos a malato, el cual puede ser usado para la síntesis de glucosa [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003]. El ciclo del glioxilato permite a *M. tuberculosis* generar glucosa independientemente de los pasos consumidores de oxígeno de la síntesis convencional de carbohidratos. Una ventaja del ciclo del glioxilato es el uso de lípidos como fuente de energía, ya que estos se encuentran abundantes en los centros del granuloma. La enzima clave del ciclo del glioxilato es la isocitrato liasa. La disrupción del gen codificante de esta enzima atenuó la persistencia bacteriana y virulencia en ratones inmunocompetentes, sin afectar el crecimiento bacteriano durante la infección [McKinney, et al., 2000]. Lo anterior sugiere que el ciclo del glioxilato es esencial para la supervivencia del patógeno en el granuloma y, por tanto, contribuye a la persistencia de la micobacteria en ese ambiente [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003].

La adaptación de la micobacteria a bajas concentraciones de oxígeno dentro del granuloma parece que también requiere una enzima nitrato reductasa anaeróbica que permite el uso de nitrato como aceptor de electrones. Esas mismas condiciones requieren la inducción de varios productos génicos de los cuales solo una minoría ha sido investigada [Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003].

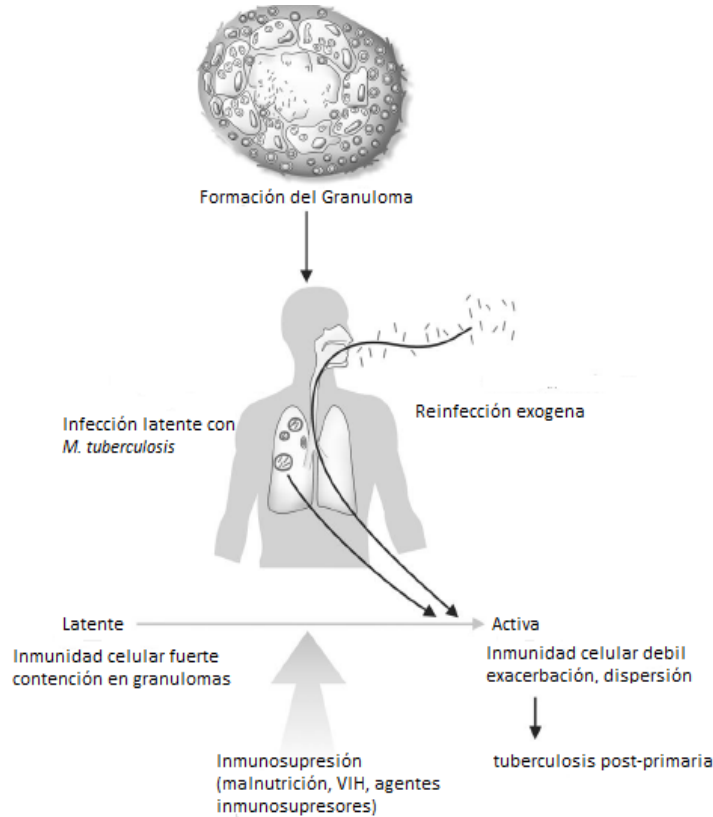


Figura 2-4. Reactivación de la TB debido a la inmunosupresión o a la reinfección exógena. *M. tuberculosis* puede persistir en un estado de dormancia durante largos periodos de tiempo. Cualquier desequilibrio entre el hospedero y el patógeno después del debilitamiento de la respuesta inmune celular (inmunosupresión) causa una exacerbación endógena [Modificado de Ulrichs, T., Kaufmann, S., 2003].

2.4 Quimioterapia actual contra la TB

La prevalencia de la TB incrementa no solo debido al aumento del número de pacientes infectados con VIH, sino también a la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los medicamentos [Knechel, 2009]. Por tanto se hace necesario no solo conocer las terapias disponibles en la actualidad sino también los mecanismos mediante los cuales la micobacteria ha logrado adquirir resistencia a tales agentes terapéuticos.

Actualmente la TB es tratada con un régimen intensivo inicial de 2 meses comprendiendo dosis diarias de los antibióticos rifampicina (RIF), isoniazida (INH), pirazinamida (PZ) y etambutol (EMB) o estreptomina (SM), para asegurar que no surjan cepas resistentes a algún medicamento de manera individual. Los siguientes 4 meses solo se administra RIF e INH diariamente o dos a tres veces por semana para eliminar cualquier bacilo tuberculoso persistente [Jureen, 2008; Niemman, S., Rusch-Gerdes, S., 2003]. INH y RIF, los dos medicamentos antituberculosos más potentes, eliminan más del 99% de los bacilos tuberculosos dentro de los dos meses siguientes a la iniciación de la terapia

[Jureen, 2008]. INH inhibe la biosíntesis de los ácidos micólicos de la pared celular, haciendo a la micobacteria susceptible a las especies reactivas de oxígeno y a otros factores ambientales mientras que RIF inhibe la elongación de los transcritos producidos por la RNA polimerasa uniéndose a la subunidad β de esta enzima [Rattan, et al., 1998]. El uso de esas drogas en conjunto con otras, reduce la terapia antituberculosa de 18 meses a 6 meses. Por tanto, el surgimiento de cepas resistentes a cualquiera de esos dos medicamentos causa una gran preocupación, ya que quedarían como únicas alternativas medicamentos que son menos efectivos, tienen más efectos tóxicos colaterales y resultan en mayores índices de mortalidad, especialmente en pacientes infectados con VIH.

La MDR-TB se refiere a la resistencia simultánea a INH y RIF [Rattan, et al., 1998]. Pacientes infectados con este tipo de cepas mueren en un lapso relativamente corto (4-16 semanas) desde el diagnóstico. Este tipo de resistencia hace que se tenga que cambiar el tratamiento a uno más complicado y prolongado. Hay un número de agentes de segunda línea propuestos para el tratamiento de este tipo de cepas, tales como fluoroquinolonas, kanamicina, capreomicina, etionamida, cicliserina y tioacetazon, entre otros. Ya que cada uno de estos compuestos tiene sus propias desventajas, como por ejemplo, alto costo, menor eficacia o especificidad y toxicidad para el paciente, se hace necesario la investigación de nuevas terapias de segunda línea menos problemáticas [Juréen, 2008]. En octubre de 2006 se anunció una nueva definición de cepas de *M. tuberculosis* XDR-TB. Tales cepas no solo son MDR-TB, sino que también son resistentes a cualquier fluoroquinolona y a uno o más de los siguientes medicamentos inyectables: kanamicina, amicacina y capreomicina. Con la detección de cepas XDR la mortalidad en pacientes infectados con VIH ha aumentado hasta un 98%. La mayoría de estos pacientes mueren dentro de los 30 días siguientes a la recolección del esputo [Juréen, 2008; M/XR-TB Global Report WHO, 2010].

2.4.1 Mecanismos de resistencia en *M. tuberculosis*

Un mecanismo común para la adquisición de resistencia entre las bacterias de relevancia clínica es la toma de DNA foráneo. Sin embargo, para *M. tuberculosis* la resistencia se origina a partir de mutaciones espontáneas al azar en un locus génico [Juréen, 2008]. Las velocidades de mutación que confieren resistencia difieren entre los diferentes medicamentos. Por ejemplo, *M. tuberculosis* tiene una probabilidad 100 veces mayor de ser resistente a INH que a RIF. Se considera que los mecanismos de resistencia a un medicamento no están relacionados con los de otros medicamentos, a menos que tales medicamentos sean químicamente relacionados, lo que explica por qué el régimen de múltiples antituberculosos es tan importante [Juréen, 2008].

El medicamento antituberculoso más ampliamente estudiado, INH, es un pro-medicamento que necesita ser activado por la enzima catalasa-peroxidasa de *M. tuberculosis*, la cual es codificada por el gen *katG*. La activación resulta en la formación

de diferentes radicales, los cuales tienen como blanco múltiples sitios en la bacteria. Las mutaciones en el gen *katG* se presentan en el 58% de las cepas resistentes a INH; la mayoría tienen una sustitución en la Ser315. La resistencia a este medicamento antituberculoso de primera línea ha sido también asociada a mutaciones en los genes *inhA* y *ahpC*; la proteína normal codificada por el *inhA* y su cofactor (un constituyente de la vía de biosíntesis de los ácidos micólicos) forman un complejo con INH activada, mientras que el gen *ahpC* codifica para una alquil hidroperóxido reductasa la cual tiene un efecto compensatorio cuando el gen *katG* está mutado [Juréen, 2008].

2.5 Toma de nutrientes en *M. tuberculosis*

A pesar de que los requerimientos nutricionales de las micobacterias han sido ampliamente estudiados, hoy en día la identidad de muchos de los transportadores de nutrientes esenciales todavía es desconocida. Aunque se sabe que *M. tuberculosis* emplea carbohidratos como fuente de carbono durante la primera semana de infección y se han identificado varios tipos de transportadores involucrados en la ingesta de estos componentes tanto en *M. smegmatis* como en *M. tuberculosis* (Figura 2-5), también se ha reportado que la fuente de energía puede ser remplazada por lípidos (ácidos grasos) durante el progreso de la enfermedad, aunque no se conocen las proteínas de membrana encargadas de mediar este proceso [Niederweis, 2008].

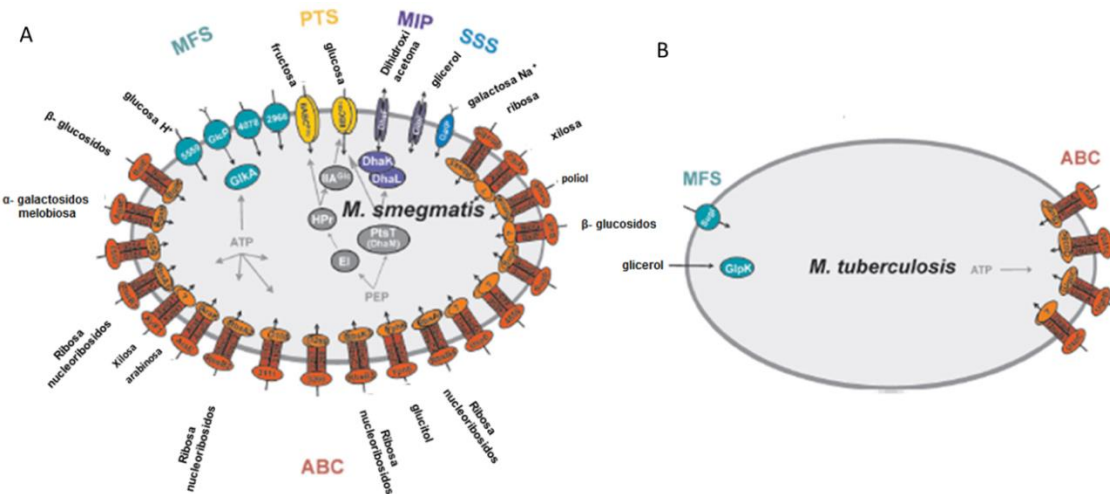


Figura 2-5. Transportadores involucrados en la ingesta de carbohidratos a través de la membrana citoplasmática de A) *M. tuberculosis* y B) *M. smegmatis*. Se presentan los transportadores pertenecientes a las familias de transportadores tipo ABC (ABC, rojo), al sistema de fosfotransferasa (PTS, amarillo), a la familia principal de transportadores facilitadores (MFS, verde), a la familia de proteínas intrínsecas principales (MIP, azul oscuro), y la superfamilia de soluto de sodio (SSS, azul claro). En cada transportador se observa el nombre del mismo de acuerdo a la identificación dentro del genoma o su número en el locus. Para aquellos transportadores que no se presenta sustrato, no se ha identificado experimentalmente [Modificado de Niederweis, M, 2008].

Por otro lado, estudios genómicos han identificado la presencia de genes que codifican proteínas transportadoras putativas de solutos que contienen sulfato, fosfato y algunos aminoácidos. En el genoma de *M. tuberculosis* también se han reportado la presencia de 28 genes que codifican para una gran variedad de transportadores primarios y secundarios de iones metálicos, representando así el 24% de todos los transportadores en el organismo, entre ellos 12 ATPasas tipo P (el mayor número reportado para un organismo procarionta). Las especificidades posibles de ion incluyen K^+ , Na^+ , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Mg^{2+} , Ca^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , $Fe^{2+/3+}$, Hg^{2+} , AsO_4^{3-} y AsO_2^- [Niederweis, 2008; Agranoff y Krishna 2004].

2.6 ATPasas

Las ATPasas son proteínas de membrana que hidrolizan ATP liberando energía con el fin de transportar al menos una sustancia a través de la bicapa lipídica. Se encuentran tanto en bacterias como plantas y animales y pueden clasificarse en 4 grupos. ATPasas tipo P, F, V y ABC [Pedersen, 2007]:

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

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

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

- **ATPasas tipo P:** Constituyen una gran familia de proteínas que bombean iones y lípidos a través de las membranas celulares; por esta razón también se les conoce con el nombre de bombas. Todas se caracterizan por la formación de un intermediario acil-fosfato con el fosfato y del ATP, el cual es estable en condiciones ácidas y son inhibidas específicamente por el ion vanadato. Todas las ATPasas tipo P son proteínas de membrana multi-dominio con pesos moleculares entre los 70 – 150kDa [Kuhlbrandt, 2004].

2.7 ATPasas tipo P

2.7.1 Estructura de las ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P contienen cinco dominios estructural y funcionalmente distintos: tres dominios citoplasmáticos (A, actuador; N, de unión a nucleótido; P, de fosforilación) y dos dominios embebidos en membrana (T, de transporte; S, dominio de soporte específico de clase). También se puede encontrar otro dominio, el dominio regulador (R), el cual se sitúa en el extremo N-terminal, en el C-terminal o en ambos (Figura 2-6) [Palmgren y Nissen, 2011].

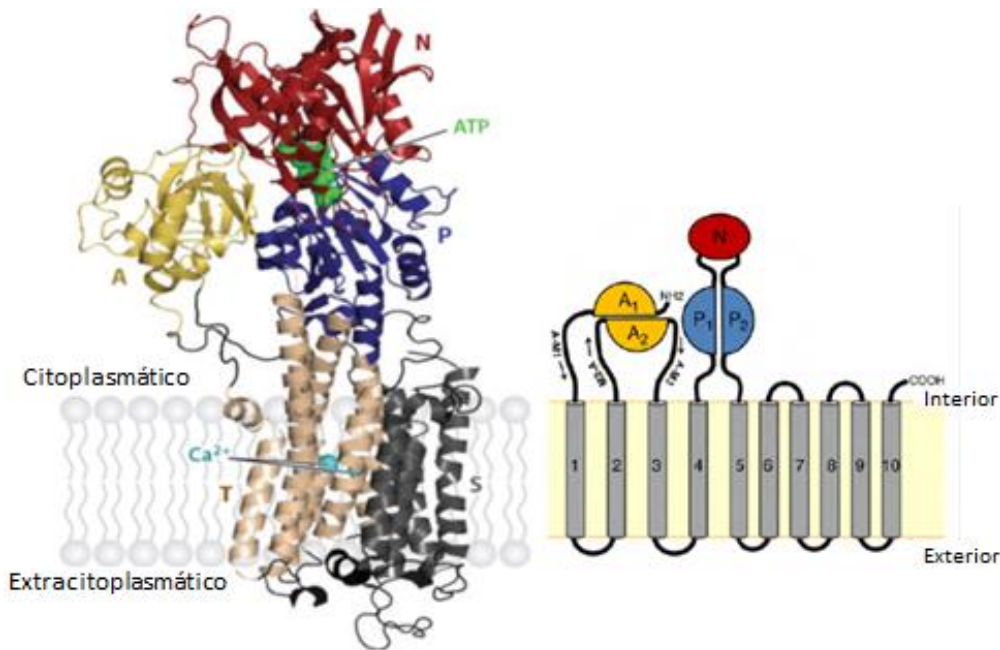


Figura 2-6. Organización estructural de las ATPasas tipo P. Modelo de estructura cristalina de la Ca^{2+} ATPasa de retículo sarcoplásmico (número de acceso PDB 1T5S). La bomba está organizada en tres dominios citoplasmáticos (A, P y N) y dos dominios embebidos en membrana (T y S) (izq) [Modificado de Palmgren, Nissen, 2011]. Diagrama de topología de una ATPasa tipo P típica con 10 hélices transmembranales (der) [Modificado de Bublitz, et al, 2010].

Durante el ciclo catalítico, el dominio N reconoce el ATP y posiciona el fosfato y para el ataque nucleofílico, mientras que un residuo de aspartato (Asp) ampliamente conservado en el dominio P acepta este grupo fosfato y forma un intermediario aspartil-fosfato de alta energía. Un glutamato (Glu) en el dominio A posiciona una molécula de agua para la hidrólisis subsecuente, la cual lleva a la liberación del grupo fosfato. De esta manera el dominio N opera como una proteína quinasa, el dominio A actúa como una proteína fosfatasa y el dominio P es el sustrato para ambos [Palmgren, 2011].

Los dominios citoplasmáticos son conectados a los segmentos transmembranales mediante cinco regiones “*linker*” (Figura 2-6), que forman las conexiones estructurales cruciales 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 [Bublitz, *et al*, 2010].

A continuación se presenta una breve discusión acerca de cada uno de los dominios localizados dentro de la estructura de las ATPasas tipo P.

Dominio actuador (A): Esta formado como un módulo globular conectado a las regiones transmembranales mediante dos (en las ATPasas tipo PI) o tres (en las ATPasas tipo PII – PV) “*linkers*” unidos a los segmentos transmembranales M1, M2 y M3. Este dominio contiene un motivo característico de las ATPasas tipo P (TGE) [Palmgren, 2011].

Dominio de fosforilación (P): Este dominio es el más conservado en este tipo de ATPasas y no contiene grandes inserciones o deleciones. El Asp fosforilado se sitúa en la secuencia conservada (DKTGTLT). Otras dos secuencias en este dominio (TGDN) y (GDGXND), están involucradas en la coordinación con el Mg^{2+} asociado con la unión del ATP al sitio de fosforilación. La estructura del dominio P es homóloga a la de miembros de la superfamilia de haloácido deshalogenasa, las cuales son proteínas solubles que llevan a cabo procesos de hidrólisis [Palmgren, 2011].

Dominio de unión a nucleótido (N): Este dominio lleva a cabo la unión al ATP y fosforila el dominio P. Consiste de una inserción modular dentro del dominio P y se conecta a este mediante una bisagra estrecha. Los residuos que interactúan con el ATP solo hacen contacto con la parte adenosina, lo cual deja los tres grupos fosfato lejos del sitio de unión. Este es el más variable de los tres dominios citoplasmáticos [Palmgren, 2011].

Dominio de transporte (T): Consiste de seis hélices transmembranales que contienen el sitio de unión al ion. Es altamente flexible y se mueve durante el ciclo catalítico a medida que los iones se asocian y se disocian. El número de sitios de unión al ion varía de uno (en las ATPasas PIII y PIIB) a dos (en las ATPasas PIIA) o tres (en las ATPasas PIIC) [Palmgren, 2011].

Dominio de soporte (S): Es una unidad auxiliar que provee soporte estructural al dominio T y puede tener funciones especializadas tales como proveer cadenas laterales adicionales como sitios de unión al ion. Este dominio muestra muy poca conservación entre las diferentes familias de ATPasas tipo P [Palmgren, 2011].

Dominio regulador (R): En muchas de las ATPasas tipo P uno de los extremos terminales actúa como un dominio R. Este puede localizarse en el N-terminal (bombas de metales pesados y bombas de Ca^{2+} que se unan a calmodulina), en el C-terminal (Na^+/K^+ ATPasa) o en ambos (bomba de H^+). Pueden actuar como auto-inhibidores interactuando con el resto de la molécula de la bomba, por ejemplo, para inhibir movimientos de los dominios, como sensores para los cationes transportados o como reguladores de las afinidades a los cationes [Palmgren, 2011].

2.7.2. Mecanismo catalítico de las ATPasas tipo P

Se define mediante el modelo de Post-Albers, el cual se muestra en la Figura 2-7. Este modelo propone que la bomba es fosforilada en la forma E1 para producir E1-P, que espontáneamente se convierte a E2-P y luego es desfosforilada a E2, la cual subsecuentemente se convierte de nuevo a E1. Los movimientos de los iones a través de la membrana ocurren espontáneamente con las transiciones E1-P a E2-P y E2-P a E1-P [Palmgren, 2011].

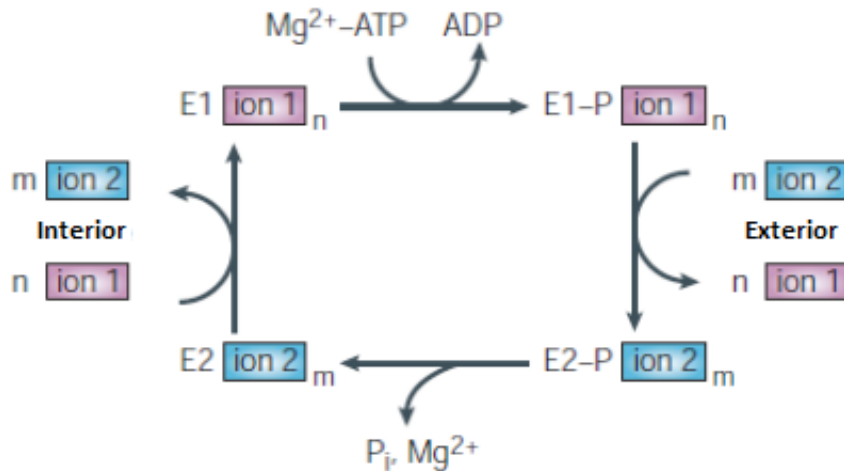


Figura 2-7. Modelo del mecanismo catalítico de transporte de iones llevado a cabo por la ATPasa tipo P basado en el ciclo de Post-Albers para una Na^+/K^+ ATPasa. El ion 1 desde un lado de la membrana (interno en este caso) se une a un sitio de alta afinidad en el estado E1 de la ATPasa. La unión al ion desencadena la fosforilación de la enzima lo cual lleva al estado fosforilado E1-P. Luego ocurre un cambio conformacional al estado fosforilado E2-P el cual es incapaz de fosforilar el ADP. Este estado tiene una baja afinidad por el ion 1, el cual se escapa al otro lado de la membrana (externo). Desde este lado el ion 2 se une a su sitio de unión a ion y, después de la hidrólisis del Asp fosforilado, es liberado al lado interno, donde la ATPasa se vuelve a unir al ion 1 y queda lista para iniciar otro ciclo [Modificado de Kuhlbrandt, 2004].

En la conformación E1 los sitios de alta afinidad al ion se exponen al lado citoplasmático, mientras que en la conformación E2 los mismos sitios son convertidos a sitios de baja afinidad al ion, expuestos al otro lado de la membrana [Palmgren, 2011].

La unión del sustrato al sitio transmembranal de unión al ion induce un rearrreglo de hélices que es transmitido al dominio P y genera un sitio de unión a Mg^{2+} cerca del Asp. Este ion deslocaliza la carga negativa tanto del aspartato como del ATP, permitiendo así su acercamiento y la fosforilación. Sin embargo, el Mg^{2+} solo puede ejercer esta función si los sitios de unión al ion a ser transportado están previamente ocupados. De esta manera se obtiene un acoplamiento estricto entre la unión al ion y la fosforilación [Kuhlbrandt, 2004].

La fosforilación del dominio P causa un cambio conformacional que resulta en el alargamiento de la secuencia entre el segmento transmembranal M3 y el dominio A

(Figura 2-8). Esto crea una tensión en la bomba que hace que el dominio sufra un cambio conformacional de tal manera que los sitios de unión al ion pierden su afinidad y se liberan al otro lado de la membrana. Este cambio conformacional corresponde a la transición E1-P a E2-P, paso clave del proceso debido a que ocurre la translocación del ion. Al mismo tiempo el motivo TGE se acerca al Asp fosforilado para la defosforilación. [Kuhlbrandt, 2004]

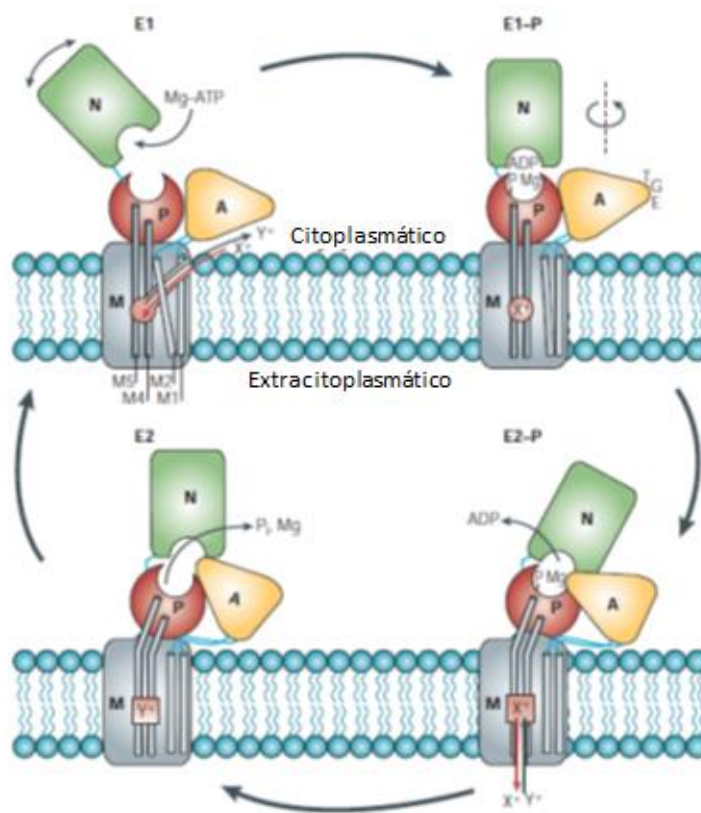


Figura 2-8. Esquema sencillo de los cambios conformacionales ocurridos durante el ciclo catalítico de las ATPasas tipo P [Modificado de Kuhlbrandt, 2004].

Una vez los iones han salido del dominio T la bomba tiene que defosforilarse. La unión de los iones que serán transportados en la dirección contraria (Y^+), a la conformación E2-P, causa la defosforilación del Asp en el dominio P (Figura 2-8). Para esto, una molécula de agua se coordina entre el residuo Glu del motivo TGE y el Asp fosforilado, y lleva a cabo un ataque nucleofílico sobre el enlace fosfato. De esta manera la unión del ion contratransportado y la oclusión estimulan la defosforilación de la bomba. Como resultado de la defosforilación y de la liberación de fosfato, ocurre un cambio conformacional para retornar a E1 y a la vez liberar los iones Y^+ al lado citoplasmático. [Kuhlbrandt, 2004, Bublitz, M., et. al., 2010].

2.7.3 Clasificación de las ATPasas tipo P

Axelsen y Palmgren propusieron un sistema de clasificación que resultó de una evaluación taxonómica precisa de 211 secuencias de ATPasas tipo P tanto de eucariotas como de procariotas. Más que una clasificación de acuerdo a la evolución filogenética de las secuencias, el resultado se fundamenta en la especificidad hacia diferentes tipos de iones [Axelsen y Palmgren, 1998]. En la Tabla 2-1 se muestran las cinco familias de ATPasas tipo P, las cuales son referidas como tipo I a tipo V. Dentro de esas familias se pueden distinguir un total de 10 diferentes subtipos. Cada subtipo transporta un tipo específico de sustrato en particular [Kuhlbrandt, W., 2004, Bublitz, M., et. al., 2010].

	Bacteria	Arquea	Hongos	Plantas	Invertebrados	Vertebrados	Especificidad	Función
IA	•	•					K ⁺	Regulación presión de turgor
IB	•	•	•	•	•	•	Cu ⁺ , Cu ²⁺ , Ag ⁺ , Cd ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺ , Co ²⁺	Detoxificación homeostasis
IIA	•	•	•	•	•	•	Ca ²⁺ , Mn ²⁺ (SERCA)	Señalización, homeostasis
IIB			•	•	•	•	Ca ²⁺ (PMCA)	
IIC			•		•	•	Na ⁺ /K ⁺ , H ⁺ /K ⁺	Mantenimiento potencial de membrana, acidificación.
IID			•		•		Na ⁺ , Ca ²⁺	Desconocida
IIIA	•	•	•	•			H ⁺	Potencial de membrana, homeostasis pH
IIIB	•						Mg ²⁺	Desconocida
IV			•	•	•	•	Fosfolípidos	Transporte de lípidos, asimetría de la membrana
V			•	•	•	•	Desconocido	Desconocida

Tabla 2-1. Principales funciones y distribución entre los organismos de las subfamilias de ATPasas tipo P. En azul se presentan las subfamilias de las bombas tipo I, en rosado las de las bombas tipo II, en verde las bombas tipo III y en amarillo y blanco se observan las bombas tipo IV y V respectivamente. [Adaptada de Bublitz, M., et. al., 2010].

2.7.4 ATPasas tipo P y patogenicidad bacteriana

A pesar de que las ATPasas tipo P se han estudiado como sistemas de transporte que regulan la entrada de metales pesados potencialmente tóxicos para las bacterias en ambientes especialmente ricos en ellos, han sido pocos los estudios que relacionen la supervivencia o la patogenicidad bacteriana con la presencia de ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos o alcalinotérreos.

Un estudio más reciente muestra la asociación entre la virulencia bacteriana y la ATPasa tipo P transportadora de Ca²⁺ presente en la membrana de la bacteria Gram-positiva *Streptococcus pneumoniae*. Esta bacteria permanece durante largos periodos de tiempo en la mucosa nasal y faríngea pero puede causar muchos tipos de infecciones en humanos y es la principal responsable de la neumonía cuando logra pasar hacia los pulmones. Además de que infecta principalmente a los pulmones, puede transportarse vía sanguínea a otros órganos [Rosch, et al, 2008].

En el genoma de *S. pneumoniae* se encontró una secuencia (*sp1551*) codificante de una ATPasa tipo P transportadora de Ca^{2+} por comparación con secuencias de SERCA ya caracterizadas. Para determinar la contribución de este transportador a la homeostasis catiónica, se generó un mutante por delección en la cepa patógena. Ensayos de susceptibilidad a altas concentraciones de iones ($\approx 1\text{M}$) mostraron una fuerte inhibición del crecimiento de la cepa mutante con respecto a la cepa silvestre específicamente para el caso de exposición a Ca^{2+} , [Rosch, *et al*, 2008].

Un experimento más determinante acerca de la importancia de este transportador para la patogenicidad bacteriana fue la determinación de la supervivencia de ratones infectados intranasalmente tanto con la cepa silvestre como con la cepa mutante. Los resultados indican que la cepa mutante fue completamente atenuada en su patogenicidad comparada con la cepa silvestre, además de que se presentó un decrecimiento en la colonización nasal y sanguínea [Rosch, *et al*, 2008], lo que permitió concluir que la bacteria necesita la ATPasa tipo P transportadora de Ca^{2+} presente en su membrana plasmática para el mantenimiento de la homeostasis y su virulencia en el ambiente al que se expone en el hospedero.

Estos estudios permiten proponer que este tipo de proteínas transmembranales transportadoras de metales alcalinos o alcalinotérreos también cumplen un papel importante en varios procesos bacterianos además de que llevan al planteamiento de mecanismos de regulación de estos iones similares para otros organismos infecciosos como *M. tuberculosis*.

2.7.5 ATPasas tipo P en *M. tuberculosis*

De acuerdo con Agranoff y Krishna [2004, 1998] el gran número de ATPasas presente en *M. tuberculosis* (Figura 2-9) puede dar la versatilidad requerida al bacilo para adaptarse a los nichos intra- y extracelulares durante las diferentes etapas de la infección, las cuales difieren marcadamente en osmolaridad, concentraciones de iones metálicos, pH y disponibilidad de nutrientes. Los mismos investigadores resaltan el hecho que al no haber datos de la influencia de estos metales (excepto del Mg^{2+}) en la expresión génica de *M. tuberculosis*, se convierte en un área de estudio significativa ya que los iones metálicos son muy importantes como cofactores metabólicos esenciales y mensajeros en la señalización fisiológica [Agranoff y Krishna, 2004; 1998].

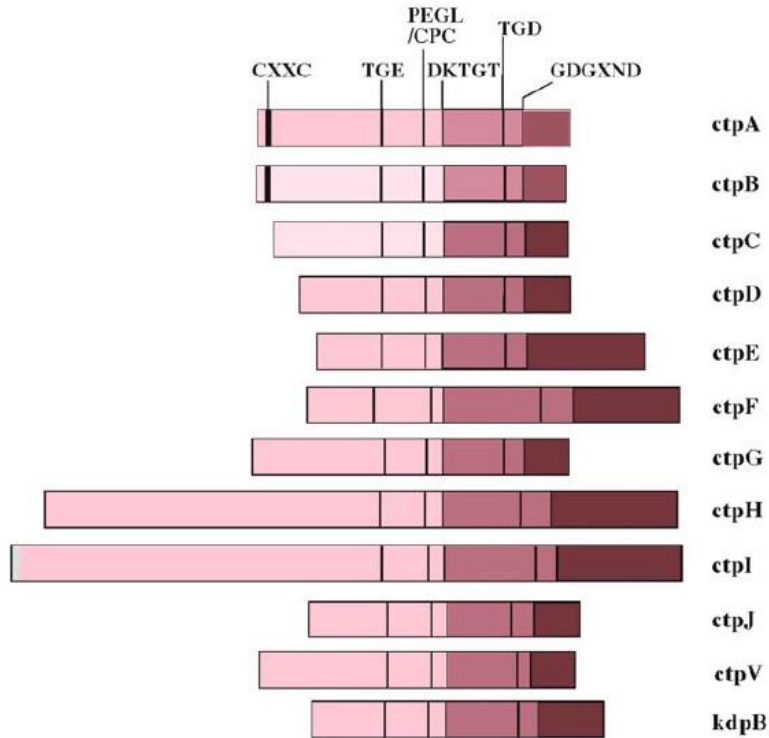


Figura 2-9: Esquema del alineamiento de las 12 secuencias proteicas de ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* transportadoras de iones metálicos. Se muestran las secuencias de los motivos conservados de las ATPasas tipo P. Los sitios de fosforilación han sido alineados para facilitar la comparación de los tamaños de varios dominios. En rosado medio se observa el loop citoplasmático grande, mientras que los dominios N y C-terminal se muestran en rosado y marrón, respectivamente. La localización de los motivos conservados se indica con líneas verticales. CXXC: motivo de unión a metal pesado, TGE: motivo fosfatasa, PEGL/CPC: motivo de unión a ion (metal alcalino y/o alcalinotérreo/metal pesado), DKTGT: sitios de fosforilación, TGD-GDGXND: motivo de unión a ATP [Tomado de Agranoff, D., Krishna, S., 2004].

Otros estudios de inactivación de genes descritos por Agranoff (2004,1998), más precisamente con el gen *mntH* de *M. tuberculosis*, que codifica para un transportador de Mn^{2+} , reportaron que no hay un fenotipo diferente del bacilo al crecer en medio de cultivo *in vitro* o *in vivo* en los macrófagos, a pesar de la aparente importancia de este catión para el metabolismo del bacilo. Esto podría confirmar el efecto compensatorio de las ATPasas tipo P y sus numerosas especificidades de sustrato.

Sarah, W y colaboradores (2010) demostraron que *M. tuberculosis* necesita una secuencia reportada como ATPasa tipo P transportadora de metal pesado (CtpV) para la resistencia a concentraciones elevadas de cobre, mientras que Botella, H y colaboradores (2011) reportaron que la ATPasa tipo P CtpC de *M. tuberculosis* protege al bacilo del exceso de Zn^{2+} y, por tanto, contribuye a la supervivencia intracelular, ya que se ha reportado el aumento en las concentraciones intrafagosomales de metales pesados, como uno de los mecanismos que utiliza el macrófago para tratar de eliminar su huésped bacteriano [Arguello, J., et al., 2011; Botella, H., et al., 2011]. Un estudio más

reciente indicó que la ATPasa CtpD de *M. smegmatis* presenta afinidad hacia Co^{2+} y Zn^{2+} , significando una posible flexibilidad de estas ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados en cuanto al tipo de ion transportado [Raimunda, D. et. al., 2012].

2.8 Electrofisiología basada en membranas soportadas en sólido (SSM)

El estudio de proteínas de membrana transportadoras de sustratos cargados eléctricamente se ha basado principalmente en los resultados obtenidos de técnicas electrofisiológicas, las cuales permiten la detección de procesos de transferencia de carga a través de la membrana., tales como Patch Clamp, Voltage Clamp y, más recientemente, membranas lipídicas artificiales [Tadini-Buoninsegni, F., et al, 2008].

En la técnica de Voltage Clamp se utilizan electrodos de un diámetro menor a 1 μm insertados dentro de la célula para registrar señales eléctricas debidas a procesos a través de la membrana citoplasmática. Con el fin de obtener señales eléctricas intensas, se sobreexpresan los transportadores o canales en oocitos de sapos *Xenopus*, los cuales tienen un diámetro de 1mm, permitiendo así una expresión de un alto número de transportadores. Por su parte, la técnica de Patch Clamp se basa en la formación de un sello de alta resistencia entre la punta de un electrodo de vidrio y la membrana celular, permitiendo el registro de corrientes pequeñas debidas incluso a canales unitarios presentes en la membrana. El electrodo utilizado se denomina electrodo-micropipeta, debido a que su interior puede simular las condiciones del exterior celular y a que en la punta del mismo es donde se forma el parche de membrana que contiene el transportador o canal a ser caracterizado. Esta última técnica puede ser aplicada tanto a oocitos de *Xenopus* como a proteínas expresadas heterológicamente en células eucariotas [Chen, T., et al., 2009]. El uso de los métodos electrofisiológicos mencionados presentan una baja resolución ya que, debido al bajo número de recambio de la mayoría de transportadores (es decir la baja velocidad con la que transportan los sustratos), se hace necesario utilizar células grandes (como células eucariotas) con capacidad de expresar un alto número de transportadores en la membrana para poder lograr la medición de las señales. Una solución a este problema es la utilización de oocitos, sin embargo los transportadores bacterianos se expresan con una baja eficiencia en estos sistemas [Schulz, P., et al., 2008; Tadini-Buoninsegni, F., et al, 2008].

Las medidas electrofisiológicas basadas en membranas lipídicas artificiales han sido utilizadas para la caracterización funcional de transportadores y bombas iónicas, y especialmente han sido útiles para la caracterización eléctrica de transportadores bacterianos. Las principales técnicas basadas en la formación de membranas lipídicas artificiales son Bicapas Lipídicas Planares (BLM, por sus siglas en inglés *Black Lipid Membranes*) y Membranas Soportadas en Sólido (SSM, por sus siglas en inglés *Solid Supported Membranes*) [Tadini-Buoninsegni, F., et al., 2008]. En BLM se ensambla una bicapa lipídica en medio de un septo hidrofóbico separando dos compartimentos donde se adicionan soluciones que simulan los ambientes extra e intracelulares. La activación

de un transportador embebido en este tipo de membranas se inicia mediante la liberación fotolítica del sustrato protegido, debido a que las membranas son muy frágiles y se destruyen con el intercambio de soluciones necesario para lograr un salto en la contracción del sustrato y así la activación del transportador. Una desventaja de esta técnica es que existen muy pocos sustratos protegidos disponibles comercialmente. Para las ATPasas tipo P existe comercialmente el ATP protegido (*caged-ATP*), sin embargo el uso del montaje óptico que permita la incidencia de una radiación de una sola longitud de onda justo en la membrana hace que la técnica sea compleja y costosa [Tadini-Buoninsegni., F., et al., 2008].

La técnica SSM soluciona los problemas de fragilidad de BLM ya que la membrana artificial está soportada en un sólido y no suspendida en medio de dos soluciones, siendo mecánicamente más estable y permitiendo que se obtengan señales eléctricas con una alta resolución a través de un intercambio rápido de soluciones.

En SSM, se ensambla una bicapa lipídica artificial sobre un soporte sólido (generalmente oro) que a su vez funciona como un electrodo. Para la formación de esta bicapa se ensambla primero una monocapa de un alcanoil de cadena larga (ODT, octadecanotiol) sobre la superficie del soporte de oro. Esta primera monocapa se forma gracias a los enlaces covalentes entre el grupo sulfhidrilo y la superficie de oro [Tadini-Buoninsegni., F., et al., 2008], dejando las colas hidrocarbonadas libres para la interacción hidrofóbica con las cadenas de ácido graso de los fosfolípidos (Figura 2-10), los cuales constituyen la segunda monocapa, y por tanto completan la formación espontánea de la bicapa lipídica. Sobre esta bicapa no se pueden integrar proteínas de membrana, debido a que un lado de la bicapa está unida a la superficie de oro. Por tanto la bicapa funciona principalmente como una superficie para la adsorción de fragmentos de membrana, vesículas de membranas o proteoliposomas que contengan la proteína responsable del proceso de transporte de carga a ser estudiado [Schulz, P., et al., 2008].

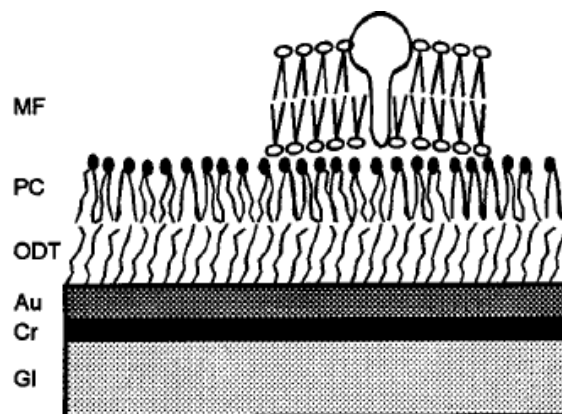


Figura 2-10. Estructura de la membrana soportada en sólido (SSM). La SSM está constituida por un soporte de vidrio (GI) de 1 mm de espesor, una capa de cromo (Cr) que permite la producción de una capa de oro mecánicamente estable (Au) de aproximadamente 150nm, una monocapa de octadecil mercaptano (ODT) y una monocapa de fosfolípido, generalmente difitanoil fosfatidilcolina (PC). Los fragmentos de membrana o vesículas de membrana (MF) que contienen la proteína de

interés, junto con la SSM forman una membrana compuesta [Tomado de Pintschovius, J., Fendler, K., 1999]

Se puede estudiar el proceso de transferencia de carga a través de vesículas de membrana o fragmentos de membrana obtenidos de las membranas citoplasmáticas nativas del organismo que exprese el transportador. Sin embargo, también es posible reconstituir el transportador purificado en liposomas, formando proteoliposomas constituidos por un solo tipo de proteínas y lípidos de naturaleza determinada [Schulz, P., et al., 2008]. Tales vesículas o proteoliposomas se adsorben sobre la bicapa lipídica soportada en oro formando una membrana compuesta (Figura 2-11).

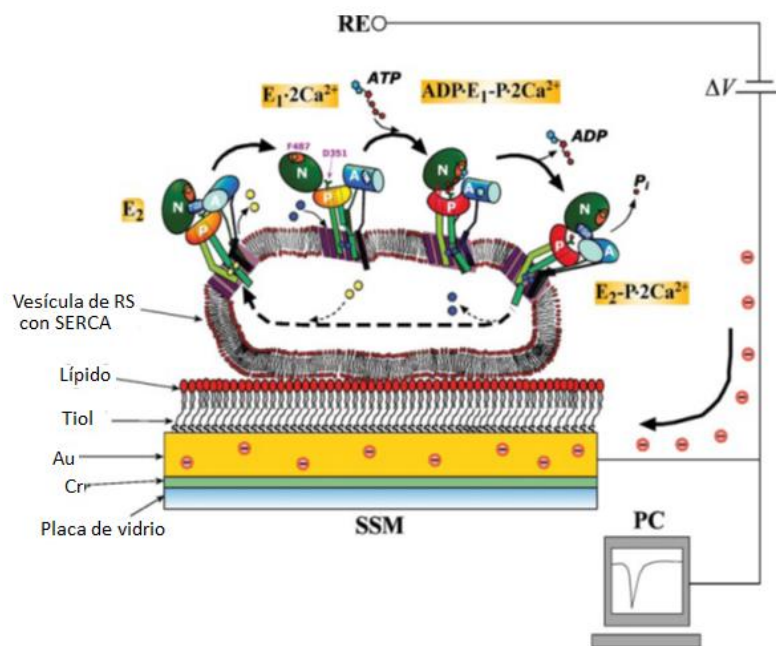


Figura 2-11. Diagrama de una vesícula de retículo sarcoplásmico adsorbida en una membrana soportada en sólido (SSM) y sometida a activación con ATP. RE es el electrodo de referencia de Ag/AgCl. Cuando ocurre un transporte electrogénico, fluye una corriente de compensación a lo largo del circuito externo para que el potencial aplicado sea mantenido constante; consecuentemente una corriente transitoria es registrada [Modificado de Tadini-Buoninsegni, F., et al., 2006].

La activación del proceso de transporte a través de la vesícula o proteoliposoma adsorbida sobre la bicapa artificial se lleva a cabo mediante un salto en la concentración del sustrato desencadenador del proceso de la translocación de carga, el cual se logra experimentalmente mediante un intercambio rápido de soluciones. Para esto, se hace pasar a través de la membrana compuesta una solución no activadora (NA) que contenga todos los iones específicos del transportador y los cofactores necesarios, menos el sustrato activador. Durante el paso de esta solución se establecen los gradientes de concentración de iones a través de las vesículas. Después de esta solución, se pasa solución activadora, constituida por los mismos componentes de la solución NA en la misma concentración además del sustrato activador. Para el caso de

las ATPasas tipo P se utiliza como activador el ATP. Finalmente, se vuelve a intercambiar las soluciones de A a NA para finalizar el proceso de transporte y así estudiar la translocación de carga debida únicamente a la activación de la proteína de membrana específica del sustrato activador [Bartolommei, G., et al 2009].

Las corrientes generadas por el transporte de carga desencadenado gracias al salto en la concentración de un sustrato se miden gracias al sistema de acoplamiento capacitivo.

2.8.1 Principio de medición de translocación de carga: acoplamiento capacitivo

El acoplamiento capacitivo es el principio de medición de la corriente generada por proteínas embebidas en proteoliposomas o fragmentos de membrana adsorbidos en membranas planares como SSM. Los proteoliposomas o fragmentos de membrana junto con la membrana planar subyacente forman una membrana compuesta, cuyo circuito equivalente se muestra en la Figura 2-12. Los movimientos de carga en la membrana adsorbida son capacitivamente acoplados al circuito de medida mediante la capacitancia de la membrana planar [Schulz, P., et al., 2008].

En la Figura 2-12 se observa que la capacitancia de la vesícula adsorbida sobre la SSM (C_p) está acoplada a la capacitancia de la bicapa soportada en la superficie de oro (C_m). Esto significa que el transporte neto que se lleve a cabo a través de la vesícula alterará la capacitancia de la bicapa soporte la cual será compensada por una corriente generada en el circuito externo a través de un electrodo de Ag/AgCl. Esta corriente estará relacionada de manera proporcional con la transferencia de carga a través de la vesícula [Schulz, P., et al., 2008].

El acoplamiento capacitivo permite la medida de los movimientos de carga bajo condiciones de estado pre-estacionario. Específicamente, si un ensamblamiento de bombas iónicas que están en estado estacionario es perturbado por un cambio repentino de un parámetro externo tal como la temperatura, el voltaje o la concentración de sustrato, las variables de estado del sistema se aproximarán a una nueva distribución de estado estacionario. La corriente transitoria (estado pre-estacionario) asociada con este proceso de relajación contiene información relacionada a los parámetros microscópicos del ciclo de transporte. Por una perturbación rápida, un estado inicial inestable (E_i) de la bomba es creado a tiempo $t=0$, y ese estado decae con una constante de tiempo τ_i a un estado estable E_{i+1} . Si el proceso de decaimiento está asociado con una translocación de carga, un movimiento compensatorio de carga debe ocurrir en el circuito externo. En consecuencia, una corriente transitoria (desplazamiento de carga) es observada. Las señales de corriente estacionarias no pueden ser observadas en la ausencia de ionóforos, aunque las fases transitorias correspondientes a la actividad de transporte estacionario de la proteína pueden ser identificadas [Lauger, P., 1991].

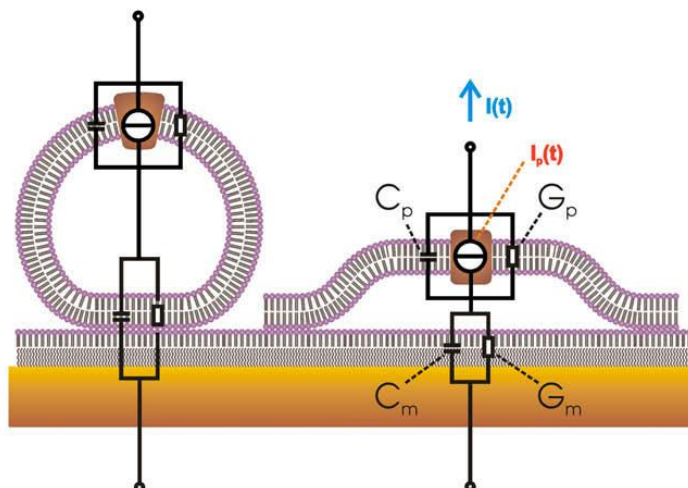


Figura 2-12. Geometría de la adsorción de vesículas de membrana/proteoliposomas y fragmentos de membrana en la SSM y circuito equivalente. La SSM consiste de una monocapa de octadecano sobre una película de oro; sobre la capa de octadecano se deposita una monocapa lipídica. Se observa el circuito equivalente que describe las propiedades eléctricas de la membrana compuesta. G_p y G_m son las conductancias de los fragmentos de membrana y de la SSM, C_p y C_m son las capacitancias respectivas [Tomado de Schulz, P., et al., 2008].

Dependiendo de si se obtienen corrientes positivas o negativas se concluye si el proceso de transporte es hacia el interior o hacia el exterior de la vesícula, respectivamente, permitiendo así, la determinación de la orientación del transporte hacia el lado citoplasmático o extracitoplasmático [Mager, T., et al., 2011].

3. Hipótesis Experimental

Las bombas de transporte catiónico (ATPasas de Tipo P) son enzimas esenciales relacionadas con la respuesta al estrés, y la toma de nutrientes, que hasta el momento han sido muy poco estudiadas en las micobacterias. Estas enzimas están presentes en la membrana celular y, poseen propiedades moleculares y fisiológicas que pueden facilitar el desarrollo de nuevos compuestos antituberculosos [Monk y Perlin, 2004]. En el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv se han reportado 12 ATPasas tipo P para las cuales no se tiene certeza acerca de la especificidad de iones transportados; sin embargo este número de marcos de lectura codificantes de ATPasas tipo P puede indicar la alta versatilidad requerida por la micobacteria para la adaptación a los nichos intracelulares y extracelulares durante la infección [Agranoff, Krishna, 1998; Novoa, et al., 2012].

Se ha descrito que las ATPasas transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos expresadas por diferentes patógenos intracelulares, jugarían un rol importante en el control de las concentraciones intrafagosomales de Ca^{2+} , K^+ y/o Cl^- [Soldati y Neyrolles, 2012]. En el genoma de *M. tuberculosis*, el gen *ctpH* (*Rv0425c*) ha sido anotado como una posible ATPasa tipo P transportadora de catión metálico. Por otra parte, experimentos *in silico* realizados por nuestro grupo de investigación han sugerido que CtpH es un posible transportador de metales como Na^+ , K^+ y Ca^{2+} [Novoa, L., et al., 2012], por lo que esta enzima podría ser importante en la regulación iónica y la viabilidad de *M. tuberculosis*. Con este trabajo se busca establecer si la proteína CtpH tiene preferencia para transportar alguno de los iones postulados.

4. Objetivos

4.1 Objetivo General

Determinar *in vitro* la especificidad iónica de la proteína codificada por el gen *ctpH* (*Rv0425c*) de *M. tuberculosis*.

4.2 Objetivos Específicos

- Construir un plásmido recombinante para la expresión del gen *ctpH* (*Rv0425c*) de *M. tuberculosis*.
- Establecer condiciones para la expresión heteróloga de la proteína CtpH de *M. tuberculosis* en *Escherichia coli*.
- Determinar la especificidad iónica de la proteína CtpH utilizando ensayos preliminares de actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas.

5. Materiales y Métodos

5.1 Cepas bacterianas, medios y condiciones de cultivo

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

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

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

5.2 Amplificación y clonación del gen *ctpH* (*Rv0425c*) de *M. tuberculosis* en el vector pJET1.2/blunt

5.2.1 Amplificación del gen *ctpH* desde DNA genómico

El gen *ctpH* (*Rv0425c*) presente en el genoma de *M. tuberculosis* con un tamaño de 4620bp, fue amplificado a partir de DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Ra, obtenido de la American Type Culture Collection (ATCC 25618D-5). Se logró una amplificación exitosa del gen utilizando la enzima DNA polimerasa de alta fidelidad Phusion (ThermoScientific, USA), la cual genera fragmentos con extremos romos. Debido al alto contenido de GC en la región de interés, se diseñaron tres parejas de iniciadores totalmente complementarios a regiones del genoma ubicadas corriente arriba y corriente abajo del gen. Estos iniciadores difieren en longitud y región de hibridación con el DNA genómico, como se muestra en la Figura 5-1 y Tabla 5-2. De esta manera se buscaba encontrar la pareja de iniciadores y las condiciones más adecuadas para la amplificación del gen *ctpH*. Las mejores condiciones de amplificación utilizando los iniciadores HFW1 y Hrev1 ó HFW2 y HRev2 se obtuvieron con Buffer GC (proveído por el fabricante para genomas de alto contenido de G y C), dNTP's 200 µM cada uno, iniciadores 0,5 µM, MgCl₂ 1,5mM, DMSO 3% y DNA genómico 2 ng/µL. El ciclo de amplificación consistió de

un primer paso de desnaturalización de 2 min a 98°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 98°C 20s, hibridación 30 s utilizando un gradiente entre 65°C y 72°C, y elongación 2,5 min a 72°C. El paso final de elongación consistió de 10 min a 72°C. Para la PCR con los iniciadores ctpH1 fw y ctpH1 rev las condiciones de amplificación fueron dNTPs 350 µM, MgCl₂ 2,5mM, iniciadores (ctpH1) 0,5 µM, DMSO 5% y se utilizó 1,5 U de la enzima True Start Hot Start DNA polimerasa (ThermoScientific). Para este caso el ciclo de amplificación consistió de un paso inicial de desnaturalización de 5 min a 95°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización 95°C 40s, hibridación 30 s a 60°C, y elongación 5 min a 72°C, y un paso final de elongación de 10 min a 72°C.

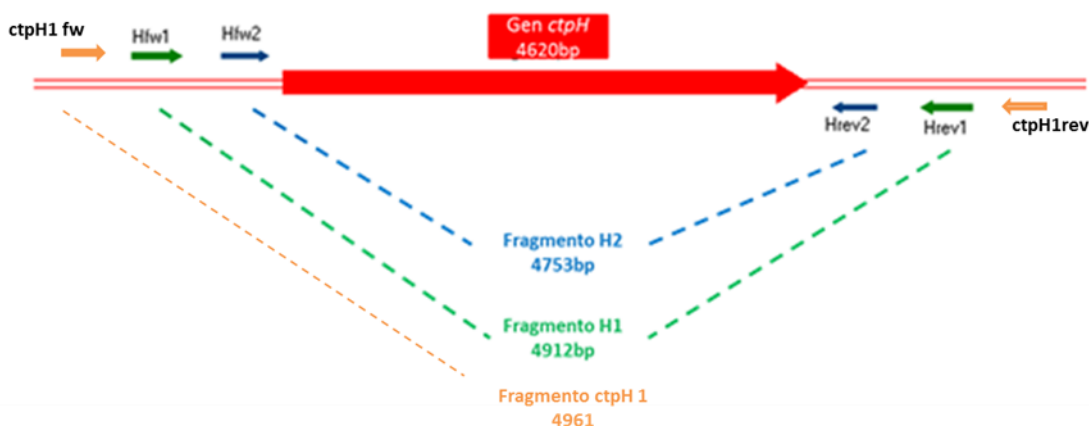


Figura 5-1. Esquema de la ubicación de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* desde DNA genómico y fragmentos esperados generados con estos iniciadores mediante PCR. Los iniciadores H1 (Hfw1 y Hrev1) se encuentran aproximadamente a 100bp de los extremos del gen (flecha roja), mientras que los iniciadores H2 (Hfw2 y Hrev2) se encuentran a aproximadamente 50bp de los extremos del gen. Los iniciadores *ctpH1 fw* y *ctpH1 rev* se encuentran aproximadamente a 150 bp de los extremos del gen.

Nombre del iniciador	Sequence 5'→3'	Número de nucleótidos	Tm (°C)	Tamaño del producto de PCR (bp)
			CloneM	
Hfw1	GCGCCAGCCAAAGCGAGCAAGACAACAG	28	75	4912
Hrev1	CTTCACTTGGCCGCAGATCGGGAGGTTTC	28	74	
Hfw2	GGCGTTGAGCAACTCTTGAGCATTGCTG	28	72	4753
Hrev2	ACGCTGAGATGTGCTCGACGCGTATTC	28	72	
ctpH1 fw	AAGGAAGCGCCAGCCAAAGC	20	64	4961
ctpH1 rev	CCGCCAGACCTCCGTAGTAG	20	66	

Tabla 5-2. Secuencias y características de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* usando DNA genómico de *M. tuberculosis H37Ra* como plantilla. Temperaturas de hibridación (Tm) calculadas mediante el programa Clone Manager.

Las reacciones de PCR fueron analizadas en geles de agarosa al 1% preparado en buffer TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) y visualizados con tinción con bromuro de etidio y radiación UV. Se emplearon como patrones de peso molecular los marcadores Genruler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific) y en algunos casos Massruler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific). La banda con el tamaño esperado fue cortada y purificada desde el gel utilizando el kit QIAquick Gel Extraction (QIAGEN).

5.2.2 Clonación del gen *ctpH* en el vector pJET1.2/blunt

El fragmento amplificado y purificado fue cuantificado mediante Nanodrop a 260nm e insertado en el vector de clonación pJET1.2/blunt (ThermoScientific) que se encuentra linealizado y posee extremos romos. Este vector contiene el gen *eco47IR* el cual codifica una endonucleasa de restricción que puede llegar a ser letal si no es interrumpido por la ligación del fragmento de DNA dentro del sitio de clonación, lo cual permite una fácil selección positiva de las células transformadas, ya que solo aquellas que contengan el plásmido recombinante serán capaces de propagarse. Además contiene un gen de resistencia a ampicilina que posibilita el mantenimiento de las células recombinantes (Figura A-1, Anexo A). La ligación del fragmento amplificado con el vector de clonación se realizó en una relación molar inserto:vector 3:1 (inserto aproximadamente 20 ng de DNA) utilizando 1U de la enzima T4 DNA ligasa (ThermoScientific) por cada 20µL de reacción e incubando la reacción durante 15 min a temperatura ambiente.

Después de este tiempo, se realizó la transformación de 50µL de células termocompetentes *E. coli DH5α* con 5 µL de la reacción de ligación (células termocompetentes preparadas como se describe en la sección 5.6). Brevemente, las células competentes se incubaron con el producto de ligación en hielo, durante 5 min seguido por un choque térmico de 45 s a 42°C y una incubación final en hielo de 30 min. Luego, 1 mL de LB fue adicionado a las células transformadas, las que se incubaron a 37°C durante 1 h y se plaquearon en cajas de LB-Agar suplementadas con 100 µg/mL de ampicilina. Finalmente, las placas se incubaron durante toda la noche (12 – 16 h) a 37°C. Los controles del experimento fueron: control de células que consistía en células de *E. coli DH5α* sin transformar sometidas a choque térmico cultivadas en medio LB sin antibiótico; control de transformación que consistía en células de *E. coli DH5α* transformadas con un plásmido pUC19 proveído por el fabricante; control de ligación empleando el vector pJET1.2 y un inserto de 976bp proveído por el fabricante y control de antibiótico que consistía de células sin transformar plaqueadas en caja de LB-Agar suplementada con ampicilina.

Diez de las colonias obtenidas fueron inoculadas separadamente en 5mL de medio LB líquido suplementado con 100 µg/mL de ampicilina, los cultivos fueron incubados con agitación constante (250 rpm) toda la noche a 37°C, para extracción de plásmido mediante el kit QIAprep Spin Miniprep (QIAGEN). Los plásmidos extraídos se utilizaron para hacer un tamizaje mediante corte con enzimas de restricción (sección 5.4). Una vez seleccionadas las colonias positivas en base a los resultados del mapeo de restricción, se les realizó extracción de plásmido en escala Midi- preparativa utilizando el kit Hi

Speed Midi (QIAGEN). El recombinante obtenido se identificó como H-pJET, cuya integridad se comprobó mediante secuenciación.

5.3 Subclonación del gen *ctpH* en el vector de expresión pBAD-A2

El recombinante *ctpH*-pJET (H-pJET) sirvió como plantilla para la nueva amplificación del gen *ctpH*, esta vez, se diseñó una nueva pareja de iniciadores que insertan en los extremos 5' y 3' del gen los sitios para corte con las enzimas de restricción BglII y EcoRI respectivamente (Figura 5-2). Además, los iniciadores fueron diseñados de tal manera que el gen *ctpH* se insertara en marco de lectura correcto con el vector de expresión pBAD-A2 (TABLA 5-3). Este vector es derivado del vector comercial pBAD-A (Invitrogen), al que se le incluyó un tag de 10 His en el extremo C-terminal y fue amablemente proveído en el Instituto Max Planck de Biofísica, Frankfurt, Alemania (Figura A-2, Anexo A.). El iniciador reverso se diseñó de tal manera que se eliminara el codón de terminación de la secuencia para poder incluir el His Tag C-terminal a la proteína (Figura 5-2). Las condiciones de la amplificación por PCR fueron similares a las utilizadas para la amplificación del gen a partir de DNA genómico, con la diferencia de que se utilizaron 3 ng de DNA plasmídico (H-pJET) por reacción y que el gradiente de temperaturas de hibridación se realizó entre 60 y 70°C.

Nombre	Sequence 5'→3'	# total nt (comp.)	Tm (°C)		%GC	Tamaño producto PCR
			Seq. completa*	Real**		
H-BglII fw	GAAGATCTCTATGCCGGTGCGTGCTGTC	28 (20)	72	68	57	4637bp
H-EcoRI rev	CGGAATTCGCGCTCGGGGTATGTCGAC	29 (19)	76	66	65	

Tabla 5-3. Secuencias y características de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* con sitios para corte con enzimas de restricción BglII y EcoRI utilizando como plantilla el recombinante H-pJET. Las secuencias en verde indican el sitio de corte con la enzima de restricción correspondiente (el sitio A[^]GATCT en el iniciador directo, es reconocido por la enzima BglII, mientras que la secuencia G[^]AATTC en el iniciador reverso, es reconocida por la enzima EcoRI), las secuencias en rojo son complementarias al gen en el DNA plantilla y los nucleótidos en negro son nucleótidos adicionados para brindar un soporte a la enzima y mejorar su eficiencia (https://www.neb.com/~media/NebUs/Files/Chart%20image/cleavage_olignucleotides_old.pdf Fecha de consulta: 15 /2/2013). Los nucleótidos subrayados corresponden al codón de inicio (ATG) del gen *ctpH* en el iniciador directo y al penúltimo codón (CCG) del gen en el iniciador reverso. *Tm calculado con la totalidad de los nucleótidos que hacen parte del iniciador. ** Tm calculado teniendo en cuenta solo los nucleótidos complementarios.

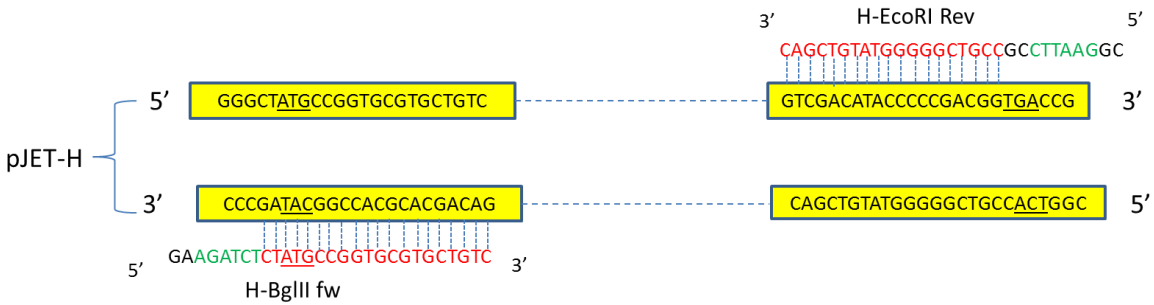


Figura 5-2. Esquema de ubicación de los iniciadores diseñados para la amplificación del gen *ctpH* con sitios de restricción para las enzimas *BglIII* y *EcoRI* (verde). Subrayado se observan el codón de inicio del gen (ATG) y el codón de terminación del gen (TGA). En rojo los nucleótidos del iniciador que presentan 100% de complementariedad con el DNA plantilla (recombinante H-pJET).

La banda de amplificación obtenida fue purificada a partir de gel de electroforesis utilizando el kit Zymoclean Gel DNA Recovery proveído por Epicenter, de acuerdo con las recomendaciones del fabricante. Una vez purificados, tanto el fragmento obtenido como el vector pBAD-A2 fueron pre-cortados con las enzimas de restricción *BglIII* y *EcoRI* (New England Biolabs, NEB) en reacciones de doble digestión utilizando el buffer NEB 2 con el que las dos enzimas utilizadas presentan un 100% de eficiencia. En las digestiones se utilizaron 800 ng de fragmento y 600 ng de vector, 1 U de cada enzima, y se incubaron durante 1 h a 37°C. Una vez concluidas las digestiones, el fragmento y vector cortados fueron purificados de la reacción utilizando el kit QIAquick PCR purification (QIAGEN) y cuantificados mediante Nanodrop (ThermoScientific) a 260nm. La ligación del fragmento con el vector pBAD-A2 previamente cortados se realizó utilizando el kit FAST Link DNA ligation (Epicentre) en una relación molar inserto:vector 2:1. A continuación, células de *E. coli* TOP10 o DH5α fueron transformadas con el producto de la reacción de ligación mediante choque térmico como se describió anteriormente (sección 5.2.2). Se seleccionaron 10 colonias para realizar extracción de plásmido a escala mini-preparativa para posterior análisis con las enzimas de restricción *EcoRI*, *HindIII* o *XhoI* (sección 5.4). Las secuencias de los plásmidos que presentaron el tamaño esperado después de corte con *EcoRI* se utilizaron para confirmación mediante mapeo de restricción y secuenciamiento. El recombinante de expresión obtenido se llamó H-pBAD.

5.4 Tamizaje de los posibles recombinantes mediante corte con enzimas de restricción.

De las colonias obtenidas durante la transformación de *E. coli* DH5α con el recombinante H-pJET y la posterior subclonación del gen *ctpH* en pBAD-A2 y su transformación en TOP10 para obtener H-pBAD, se seleccionaron 10 colonias en cada caso para hacer un análisis de restricción inicial y determinar cual de ellas poseía el recombinante esperado.

Los plásmidos extraídos a partir de algunas de las colonias obtenidas de la transformación fueron cuantificados mediante Nanodrop a 260nm. Para el caso de los plásmidos productos de la clonación de los fragmentos de PCR H1 o H2 en el vector de clonación pJET1.2 se escogió la enzima HindIII (New England BioLabs) que corta una vez el vector y una vez el fragmento, generando dos segmentos a partir de la secuencia correcta del recombinante. Para los plásmidos originados de la clonación del fragmento generado con sitios de restricción en el vector de expresión pBAD-A2 se utilizaron las enzimas EcoRI (corta una vez el vector), HindIII (corta una vez el vector y una vez el gen *ctpH*) y XhoI (corta dos veces el gen *ctpH*) (New England BioLabs). En cada caso se prepararon reacciones de 20 μ L empleando el buffer recomendado por el fabricante en una concentración final 1x, entre 200-400 ng de DNA plasmídico y 1U de enzima. Todas las reacciones se incubaron durante 1 h a 37°C. Los resultados de las digestiones se analizaron en un gel de agarosa del 1% preparado en buffer TAE y visualizado mediante tinción con bromuro de etidio y radiación UV. Los plásmidos que mostraron el patrón de bandas adecuado fueron enviados para secuenciación.

5.5 Comprobación de la integridad del inserto en los recombinantes de clonación y expresión

Para comprobar que el fragmento *ctpH* insertado en los recombinantes de clonación H-pJET y expresión H-pBAD estuvieran completos, y sin ninguna mutación se utilizaron dos aproximaciones experimentales: análisis por mapeo de restricción y secuenciación automática de los plásmidos.

5.5.1 Análisis por mapeo de restricción

El análisis de restricción se llevó a cabo para los plásmidos recombinantes H-pJET y H-pBAD. En el caso de H-pJET se emplearon las enzimas HindII, BglII, PstI y XhoI, mientras que para el recombinante H-pBAD las enzimas BamHI, NcoI, PvuI, EcoRI y BglII (New England Biolabs). En cada caso se prepararon reacciones de 20 μ L empleando siempre el buffer recomendado por el fabricante en una concentración final 1x, entre 400-600 ng de DNA plasmídico y 1U de enzima. Todas las reacciones se incubaron durante 1 h a 37°C. Los productos de reacción fueron separados en geles de agarosa al 1% preparados en buffer TAE (40mM Tris-acetato, 1mM EDTA) y visualizados con tinción de bromuro de etidio y radiación UV.

5.5.2 Secuenciación de los plásmidos

Para la secuenciación de los plásmidos recombinantes se optó por el servicio de la compañía Eurofins MWG Operon (Ebersberg, Alemania).

Se diseñaron iniciadores con el fin de secuenciar el gen *ctpH* y verificar la orientación en el vector. Dos de los iniciadores hibridaron en las regiones corriente arriba y corriente

abajo al sitio de clonación múltiple (MCS) del vector (pJET1.2 ó pBAD-A2) y los cuatro restantes distribuidos a lo largo de la secuencia de *ctpH* de tal manera que cada iniciador cubriera una región de aproximadamente 900bp (Figura 5-3). Estos iniciadores fueron diseñados en Clone Manager [Clone Manager 9,0 Professional Edition Software ,2010] teniendo en cuenta que tuvieran un porcentaje de GC menor a 60% y no presentaran hibridaciones significativas en regiones no específicas. Las secuencias de estos iniciadores se muestran en la Tabla 5-4.

Nombre del iniciador	Secuencia 5'→3'
pBAD fw	ATGCCATAGCATT TTTTATCC
pBAD rev	GATTTAATCTGTATCAGG
pJETseq fw	CGACTCACTATAGGGAGAGCGGCC
pJETseq rev	AAGAACATCGATTTTCCATGGCAG
HF1	GATCCAGGCGCTGAAAG
HF2	ATGTGGCGCTTGGTGTG
HF3	GCTGTCGGTGACCAAACAAG
HR4	GTGATAGCGCTGCCGAT

Tabla 5-4. Nombres y secuencias de los iniciadores diseñados para la secuenciación de los recombinantes H-pJET y H-pBAD.

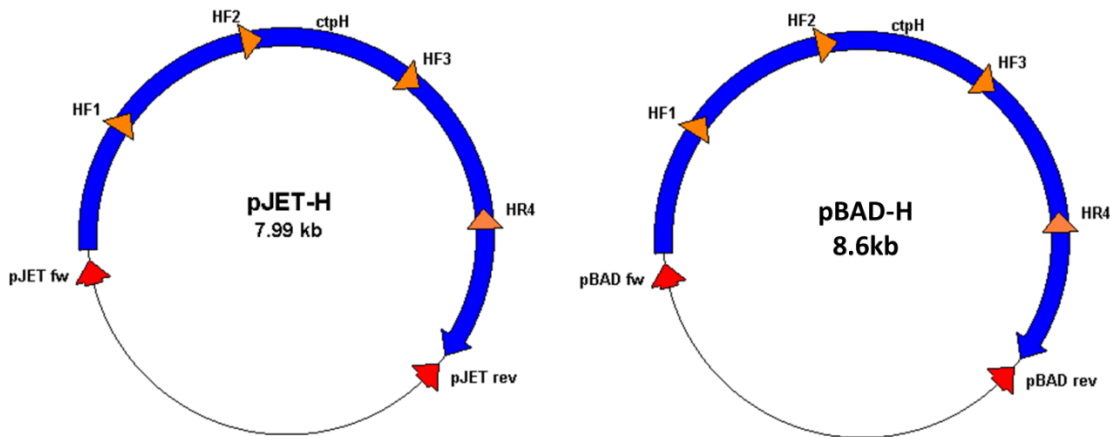


Figura 5-3. Ubicación de los iniciadores de secuenciación en los recombinantes obtenidos. Los iniciadores HF1, HF2, HF3 y HR4 son específicos del gen *ctpH*.

5.6 Preparación de células termocompetentes

Las diferentes cepas de *E. coli* termocompetentes empleadas para la transformación con los recombinantes obtenidos durante la presente de investigación, fueron preparadas por métodos químicos. Se inocularon 5 mL de medio LB con una colonia de *E. coli* y el cultivo fue incubado a 37°C, 250 rpm durante toda la noche. Después 1 mL del cultivo fue empleado para inocular 50 mL de medio LB fresco y se continuó la incubación hasta

alcanzar la fase logarítmica en OD₆₀₀ 0,35-055. En este punto se enfriaron las células sobre hielo durante 30 min y luego se recolectaron por centrifugación a 4000 rpm, durante 10 min a 4°C. El pellet bacteriano se resuspendió TSS (medio LB, PEG 8000 10% p/v, DMSO 5%, 20-50 mM MgSO₄). Las células se guardaron finalmente en alícuotas de 100µL a -70°C [Chung, et. al., 1989].

5.7 Expresión heteróloga de la proteína CtpH en *E. coli*

Para lograr la expresión de la proteína CtpH en *E. coli*, a partir de los recombinantes seleccionados, se establecieron primero las mejores condiciones de concentración de inductor (L-arabinosa), tiempo de inducción y cepa de expresión mediante ensayos de expresión a pequeña escala. Las condiciones de expresión seleccionadas se utilizaron a mayor escala para obtener lisados celulares que se analizaron para determinar si la proteína CtpH estaba presente en las membranas. Los resultados fueron analizados mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE) e inmunoblot en membranas de PVDF.

5.7.1 Optimización de las condiciones de expresión: ensayos a pequeña escala.

Una colonia de *E. coli* TOP10 o Rosetta2 transformada con el recombinante H-pJET fue utilizada para la inocular 2 mL de medio LB suplementado con 100 µg/mL de ampicilina en el caso de TOP10, o 100 µg/mL de ampicilina y 34 µg/mL de cloranfenicol para Rosetta2. Las colonias se incubaron con agitación a 37°C durante toda la noche. Un volumen de 200 µL de precultivo se utilizó para inocular por separado cuatro muestras de 10 mL de LB suplementado con el antibiótico correspondiente y se incubaron a 37°C hasta un cultivo (OD₆₀₀ 0,5 - 0,6). Antes de inducir el cultivo con L-arabinosa, se tomó 1 mL de muestra, se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min en una microcentrifuga estándar de laboratorio (Eppendorf), y el pellet obtenido se utilizó como control sin inducción. El cultivo restante fue inducido con L-arabinosa a concentraciones finales de 0,0002%, 0,002%, 0,02% y 0,2% y se continuó su incubación a 37°C con agitación de 250 rpm. A intervalos de 1 h, durante 6 h, se tomó 1mL de cada cultivo, se midió el OD₆₀₀ y se colectaron las células mediante centrifugación a 13000 rpm durante 1 min en una microcentrifuga estándar de laboratorio (Eppendorf). Los pellets celulares fueron almacenados a -20°C y posteriormente analizados por SDS-PAGE e inmunoblot.

5.7.2 Análisis mediante SDS-PAGE e inmunoblot

Los pellets celulares obtenidos a partir de 1 mL de cultivo fueron resuspendidos en 50-100µL SDS al 10%. Se calculó la cantidad de esta resuspensión para cargar aproximadamente 60 µg de proteína en cada carril del gel de poliacrilamida mezclados con buffer carga SDS 5x (10% SDS, 250mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol, 0,05% azul de bromofenol, 25% β-mercaptoetanol o 200mM de DTT) hasta una concentración final 1x.

La mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 10 min y posteriormente se centrifugó a 13000 rpm durante 5 min en una microcentrifuga estándar de laboratorio (Eppendorf). La fracción viscosa (DNA genómico) se separó de la muestra y la fracción soluble se cargó en un geles de poliacrilamida del 10% o 12%. La electroforesis se llevó a cabo durante 1 h a 100V en buffer de corrida Tris-glicina (25mM Tris, 192mM glicina, 0,1% SDS pH 8,3). Los geles se revelaron mediante tinción con Azul de Coomassie (0,1% Coomassie R250, 10% ácido acético, 40% metanol) o se utilizaron directamente para inmunoblot.

Para la transferencia de las proteínas del gel a la membrana de PVDF se emplearon tres sistemas diferentes: El sistema de transferencia seca se llevó a cabo utilizando el dispositivo iBlot Dry Blotting System (Invitrogen), (Figura 5-4), en el que los geles de electroforesis se montaron directamente en membranas de PVDF pre-ensambladas con los papeles de filtro y provistas por el fabricante (Invitrogen). El programa utilizado consistió de una diferencia de potencial de 20 V durante 10 min.

También se utilizó el sistema de transferencia húmeda en el equipo X-Cell Blot (Invitrogen) utilizando el buffer de transferencia recomendado por Bolt y Mahoney (1997) para proteínas de alto peso molecular. La composición del buffer de transferencia era la siguiente: 40mM Tris, 20mM acetato de sodio, 2mM EDTA, pH 7,4, 20% (v/v) metanol y 0,05% (p/v) SDS. Se utilizó un programa de electrotransferencia a 30 V durante 2 h (Figura 5-4).

Finalmente se probó un sistema de transferencia semi-seca utilizando el sándwich clásico de: papel de filtro/membrana de PVDF/gel de electroforesis/papel de filtro, que incluía dos variantes. En la opción 1, la transferencia se realizó en la celda Electroforética Semiseca Trans-Blot SD (BIORAD). En este caso en particular, el papel de filtro debía ser humedecido en buffer de transferencia (25mM Tris, 150mM glicina, 10% metanol) y la membrana debía ser activada en metanol y lavada con el mismo buffer antes de ensamblar el sándwich; el programa de transferencia consistía de 1 h a corriente constante de 145 mA y un voltaje máximo de 24V. Por otro lado, la opción 2 se realizó en el dispositivo semi-seco Trans-Blot Turbo (BIORAD) (Figura 5-4). En este caso la membrana previamente activada era provista junto con el papel de filtro, pre-humedecidos en buffer de transferencia por el fabricante (Transfer Pack, BIORAD), de tal manera que solo era necesario ensamblar la última parte del sandwich (gel de electroforesis /papel) sobre el cassette correspondiente el cual era insertado en la máquina de transferencia. Se utilizó el protocolo pre-programado en el equipo "High MW" especial para transferencia de proteínas de alto peso molecular; este protocolo consistía de 10 min a una corriente constante de 2,5 A y un voltaje de hasta 25V. Al finalizar la membrana era separada para la inmunodetección.

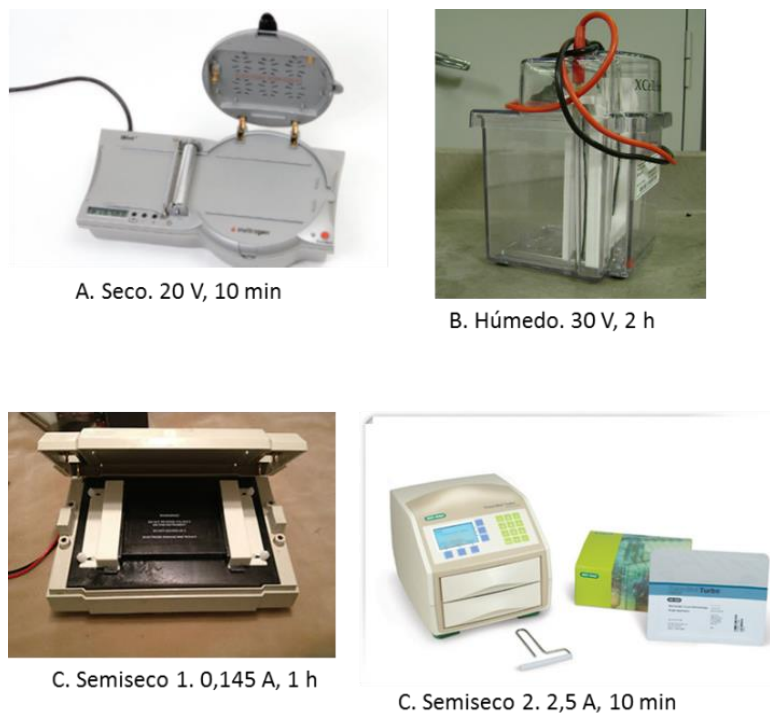


Figura 5-4. Sistemas de transferencia de proteínas desde geles de poliacrilamida a membranas de PVDF, utilizados durante la optimización del inmunoblot de la proteína CtpH. A. Sistema de transferencia seco iBlot Dry Blotting (Invitrogen), B. Sistema de transferencia húmedo X-Cell II (Invitrogen) C. Sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot SD (BIORAD). D. Sistema de transferencia semi-seca Trans-Blot Turbo (BIORAD). Para cada uno de los sistemas se muestran las condiciones a las cuales se llevaron a cabo las electrortransferencias. Electrortransferencias. (A y B tomados de <http://www.invitrogen.com/site/us/en/home/Products-and-Services/Applications/Protein-Expression-and-Analysis/Western-Blotting/Western-Blot-Transfer.html>, C y D tomados de http://www.bio-rad.com/evportal/evolutionPortal.portal?_nfpb=true&vertical=LSR&country=MX&lang=es&_pageLabel=productsPage&catID=5290044b-3d9b-4a5e-987b-9c3214086bd4 Fecha de consulta:4/5/2013)

En todos los casos, la membrana de PVDF se bloqueó con una suspensión de leche en polvo al 5% en buffer TBS, (solución de bloqueo) durante 30-45 min a temperatura ambiente. Luego se lavó 3 veces con buffer TBS 1x durante 5 min cada lavado. Después la membrana se incubó con anticuerpo primario durante toda la noche a 4°C. Se emplearon anticuerpos monoclonales Anti-His de ratón (Santa Cruz Biotechnology, sc-8036), en una dilución 1:1000 en solución de leche 1% en buffer TBS. Al día siguiente se hicieron 3 lavados con buffer TBS 1x y la membrana se incubó con anticuerpo secundario durante 2 h a 4°C. Se emplearon anticuerpos secundarios policlonales IgG de conejo Anti Ratón acoplados a fosfatasa alcalina (Sigma, A4312) en una dilución 1:1000 en solución de leche al 1% en buffer TBS. Finalmente se lavó la membrana 3 veces con buffer TBS 1x y se procedió a la detección cromogénica de la proteína con la adición de la solución del sustrato BCPI (Sigma) sobre la membrana. La Figura 5-5 muestra el mecanismo de detección con este sistema cromogénico.

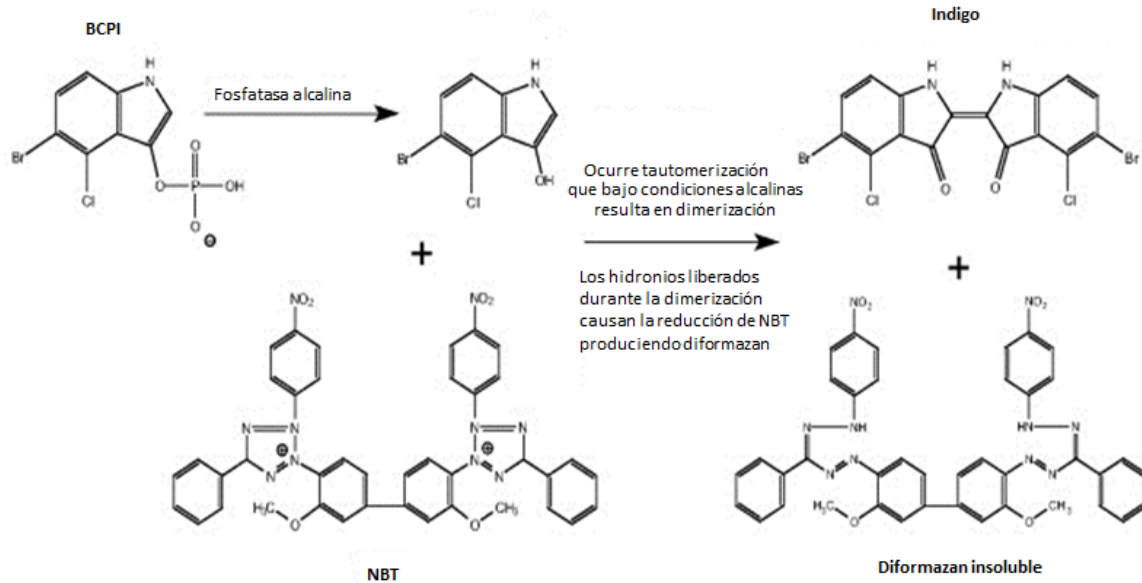


Figura 5-5. Mecanismo de revelado del inmunoblot usando anticuerpos acoplados a fosfatasa alcalina y los sustratos BCIP/NBT (Sigma Aldrich). El agente Nitroazul Tetrazolio (NBT) se usa con el sustrato de la fosfatasa alcalina 5-Bromo-4-Cloro-3-Indolilfosfato (BCIP) para la la detección en el inmunoblot. Este sistema produce un producto final insoluble que es azul-purpura y puede ser observado visualmente [Modificado de Sigma Aldrich <http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/colorimetric-alkaline.html> Fecha de consulta: 15/2/2013]

5.8 Expresión a gran escala de la proteína CtpH y localización subcelular

100 mL de medio líquido LB suplementado con 100µg/mL de ampicilina y 34µg/mL de cloranfenicol (Rosetta2) fueron inoculados con una colonia transformada con el recombinante H-pJET de la cepa correspondiente, e incubados a 37°C durante toda la noche con agitación de 250 rpm. El cultivo anterior se utilizó para inocular 6L de medio LB suplementado con 100µg/mL de ampicilina y 34µg/mL de cloranfenicol (Rosetta2). Este cultivo fue incubado a 37°C con agitación constante hasta OD₆₀₀=0,5. En este punto se indujo la expresión con L-arabinosa 0,2% (Rosetta2), debido a que a partir de los ensayos de optimización de la concentración de inductor se dedujo que 0,2% de L-arabinosa produjo el nivel máximo de expresión. Se continuó el crecimiento durante 5 h (Rosetta2) post-inducción. Después de este tiempo las células fueron colectadas por centrifugación a 4200rpm a 4°C durante 40 min en una centrifuga Beckman J6M1 utilizando el rotor JS4.2. Después, el pellet fue resuspendido en buffer de lavado (25 mM Tris pH 7,0 a 4°C, 100 mM KCl, 10% glicerol) y centrifugado de nuevo bajo las mismas condiciones. El pellet celular fue resuspendido en buffer de lisis (50 mM Tris pH 7,0 a 4°C, 10% glicerol, 200 mM KCl, 1 mM PMSF, 0,02 mg/mL DNAsa I, 5 mM EDTA) y las células fueron pasadas tres veces a través de una Prensa Francesa a 20000 psi para la lisis celular.

El lisado celular fue centrifugado a 11000 rpm durante 1 h en una centrifuga Sorvall RC-5B utilizando el rotor SS-34. El pellet (P1) conteniendo desechos celulares, células no lisadas y/o cuerpos de inclusión fue separado, mientras que el sobrenadante (S1: membranas citoplasmática y fracción soluble citosólica) fue centrifugado a 60000 rpm durante 1 h a 4°C en una ultracentrifuga Beckman utilizando un rotor tipo 60 Ti. El sobrenadante (S2, fracción celular soluble) fue retirado mientras que el pellet (MF) constituido por la membrana citoplasmática fue resuspendido en buffer de resuspensión (25mM TrisHCl, 200mM KCl, 10%glicerol, 3mM MgCl₂). Todas las fracciones fueron sometidas a cuantificación de proteínas y analizadas mediante inmunoblot. Estas mismas membranas se utilizaron para los ensayos funcionales.

5.9 Cuantificación de proteínas

La cuantificación de proteína se llevo a cabo por el Método de Bradford. Brevemente, en placas de 96 pozos se adicionaron 200 µL de solución de Coomassie G (BioRad) y 5 µL de muestra, se incubó a temperatura ambiente durante 5 min para desarrollar el color y se hicieron lecturas de Absorbancia a 562 nm. Para la curva de calibración se empleó como patrón solución de BSA entre 0,125 mg/mL-1,000 mg/mL [Bradford, 1976].

5.10 Ensayos funcionales realizados en vesículas de membrana

La actividad ATPasa estimulada por concentraciones fisiológicas de varios iones del grupo de los metales alcalinos o alcalinotérreos, y el transporte de iones estimado mediante medidas electrofisiológicas basadas en la técnica de membranas soportadas en solido (SSM), se determinó en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 expresando la proteína CtpH.

5.10.1 Determinación de la actividad ATPasa

La actividad ATPasa en membrana plasmática se determinó utilizando el método de Lanzetta y colaboradores con algunas modificaciones para la cuantificación colorimétrica del fosfato inorgánico (Pi) liberado en la reacción enzimática de hidrólisis de ATP [Lanzetta *et. al.* 1979]. Para determinar la cantidad de Pi liberado, se realizó una curva de calibración con concentraciones entre 5 – 300 µM de NaH₂PO₄.

Primero, se determinó la actividad ATPasa basal en las vesículas de membrana, que corresponde a la actividad ATPasa estimulada únicamente por Mg²⁺ y se debe a la presencia de una Mg²⁺ ATPasa en la membrana plasmática de *E. coli*. Para su determinación, los ensayos se llevaron a cabo en un volumen final de 25 µL en el siguiente medio de reacción: 20 mM HEPES pH 7,2, 15% glicerol, 0,25 mM de EGTA, 2mM de MgCl₂ y 0,2 mg/mL de proteína (vesículas de membrana). En este caso, no se adicionaron otros iones (a excepción del Mg²⁺, el cual es requerido como cofactor para la

actividad de las ATPasas). En el caso del blanco de reacción no se adicionaron las vesículas de membrana. La reacción enzimática se inició con la adición de Tris ATP hasta una concentración final de 1 mM y se incubó a temperatura ambiente durante 10 min. La reacción se detuvo con la adición de solución de H₂SO₄ 20 mM. El desarrollo del color se logró con la adición de 15 µL de una solución 14 mM verde malaquita/ 40% H₂SO₄ y 0,02% molibdato de amonio/Tween 0,4%. Las muestras se incubaron a temperatura ambiente durante 30 min y se leyó la absorbancia a 645 nm.

Para evaluar la actividad ATPasa estimulada por los diferentes iones, la reacción anterior se suplementó individualmente con: 30 µM CaCl₂ libre, 130mM NaCl, 40 mM KCl, y una combinación de 130 mM NaCl y 40 mM KCl. Todas las reacciones enzimáticas fueron llevadas a cabo por triplicado, y la actividad ATPasa se reportó como µmol de Pi liberado/mg de proteína*minuto a 25 °C y pH 7,2.

Para determinar la actividad ATPasa tipo P, las reacciones se suplementaron con ortovanadato de amonio ((NH₄)₃VO₄) a una concentración final de 50 µM, el cual se adicionó justo antes de añadir la proteína. El protocolo continuó como se describió anteriormente.

Como control en todos los experimentos, se utilizaron vesículas de membrana de *E. coli* no sometidas a inducción con L-arabinosa y se evaluó la significancia de la diferencia entre los valores mediante la prueba t de student. Un valor de *p* menor a 0,05 fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

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

5.11.2.1. Instrumento para la electrofisiología basada en SSM

La configuración general del sistema SSM consiste de: 1) cámara faradéica conteniendo el chip sensor donde se ensambla la SSM y que a su vez posee un mecanismo para el intercambio de soluciones (activación de la enzima), y 2) circuitos externos para la amplificación de la señal generada por el intercambio iónico y la adquisición y análisis de datos (Figura 5-6). La cámara faradéica incluye los contenedores de las soluciones A y NA (botellas de polietileno presurizadas con gas nitrógeno a una presión de 0,5 bar), válvulas y tubos requeridos para el manejo del flujo de soluciones (controladas por computador), así como la cubeta donde se encuentra la SSM sobre el electrodo de oro. La cubeta se conecta a un amplificador y un generador de función en el circuito externo [Schulz, P., et al., 2008].

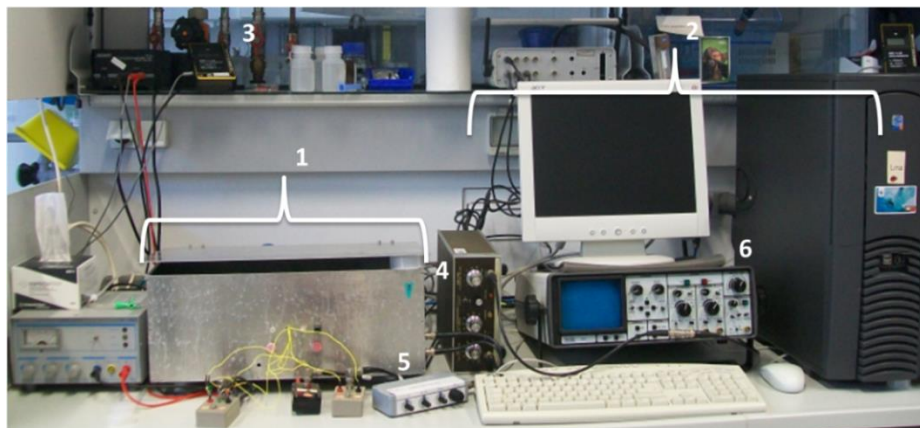


Figura 5-6. Configuración general del sistema SSM. 1- Cámara faradéica que contiene las soluciones A/NA dirigidas hacia la SSM mediante tubos y cuyos flujos se controlan mediante válvulas operadas por computador. 2- Sistema de adquisición, análisis y procesamiento de datos. 3- Manómetro que permite el monitoreo de la presión al interior de los contenedores de las soluciones la cual se debe mantener durante la medida en 0,5 bar. 4- Amplificador de la señal. 5- Generador de funciones, que permite la medición de los parámetros de la SSM mediante la aplicación de funciones de voltaje o saltos de corriente. 6- Osciloscopio que permite el monitoreo de la señal durante la medida [Schulz, P., et al., 2008].

El dispositivo que permite medir procesos de transferencia de carga a través de una membrana lipídica consta del chip sensor, constituido por una película de oro ensamblada sobre una superficie de vidrio, en donde se forma la bicapa lipídica (membrana soportada en sólido) (Figura 5-7) . Esta bicapa lipídica soportada en sólido se forma en dos pasos: primero la formación de una monocapa de octadecilmercaptano sobre la superficie de oro y luego la otra monocapa, constituida por fosfolípidos (difitanoi fosfatidilcolina), se establece sobre la primera monocapa, como se ilustra en la Figura 5-7 para el caso de una ATPasa tipo P. La adsorción de vesículas de membrana sobre la bicapa lipídica previamente establecida en la superficie de oro da lugar a la membrana compuesta; el chip sensor junto con la bicapa (SSM) es soportado en una cubeta que permite el paso de soluciones hacia la superficie de la SSM.

La cubeta junto con el chip sensor se ubican dentro de una cámara faradaica que permite el aislamiento eléctrico y, así mismo, la disminución del ruido en las señales obtenidas. En esta cámara faradaica también se encuentran las soluciones y las válvulas a través de las cuales se controla el flujo de soluciones hacia la SSM. El intercambio de soluciones que permite el salto en la concentración de sustrato se logra a través del cambio rápido entre las soluciones activadora (A) y no activadora (NA) que están en contacto con la membrana compuesta (Figura 5-7). Las soluciones A y NA tienen exactamente la misma composición, sin embargo la solución A también contiene el sustrato para la proteína transportadora, que en el caso de las ATPasas tipo P es el ATP. Una vez la ATPasa es activada en presencia del ion transportado, se genera una corriente eléctrica que puede ser medida mediante el acoplamiento capacitivo.

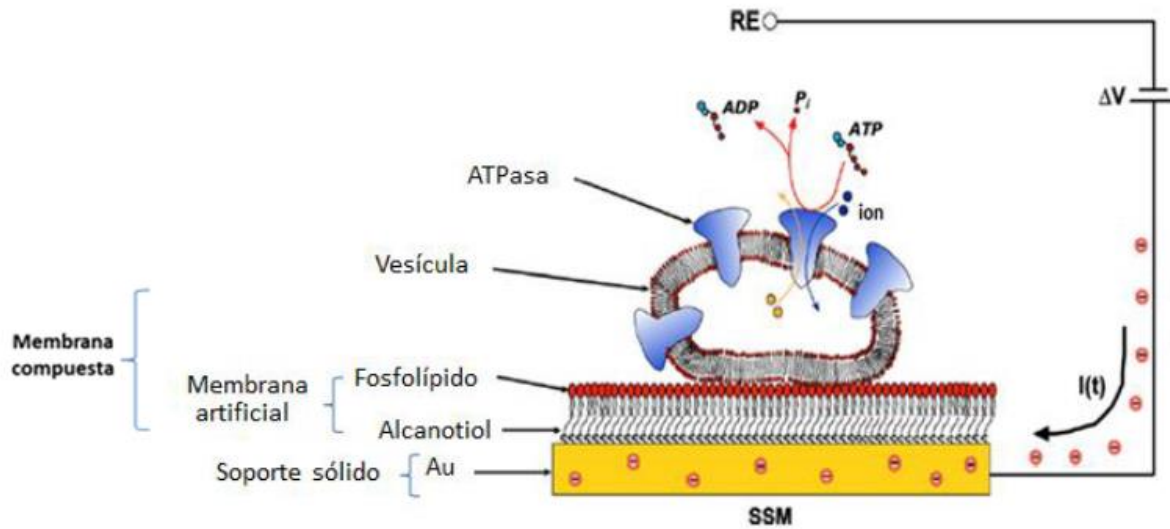


Figura 5-7. Esquema de una vesícula de membrana, conteniendo una ATPasa tipo P transportadora de iones, adsorbida sobre la bicapa lipídica soportada en sólido (SSM) y su respectivo sistema de medida. La SSM está constituida por la formación de una primera monocapa de alcanotiol (octadecilmercaptano) sobre la superficie de oro. La segunda monocapa se forma por la dispersión de fosfolípidos (difitanoil fosfatidilcolina) sobre la primera monocapa, de tal manera que la interacción hidrofóbica de las colas de ácido graso de los fosfolípidos con la cadena larga de carbonos del alcanotiol constituye una bicapa lipídica. La adsorción de una vesícula de membrana o un proteoliposoma sobre la bicapa lipídica forma la membrana compuesta. El paso de una solución activadora conteniendo ATP, en presencia de iones, permite la fosforilación del dominio P (sección 2.7.1) de la ATPasa y, así mismo, desencadena el cambio conformacional que llevará el ion desde un lado de la membrana hacia el otro. La transferencia de carga genera una perturbación momentánea de la capacitancia de la membrana compuesta que es compensada por una corriente en el circuito externo la cual es proporcional al proceso de transferencia ocurrido en la vesícula (Modificado de Tadini, et al., 2008).

A continuación se describirá en más detalle los protocolos de formación de la SSM y el procedimiento de medida.

5.11.2.2 Montaje y ensamblamiento de la membrana soportada en sólido (SSM)

El chip sensor conteniendo el electrodo de oro sobre el cual se ensambla la SSM se muestra en la Figura 5-8. Como se observa en la figura, la película de oro se compone de dos partes conectadas por una delgada porción. La parte que tiene la mayor área superficial (a) es la que está conectada al amplificador, mientras que la parte circular (c), hacia el centro de la membrana, es el lugar donde se forma la bicapa lipídica. Este chip sensor es incubado por un periodo de 6 h en solución etanólica de octadecanotiol 1mM con el fin de que una monocapa de octadecano se autoensamble sobre la superficie de oro [Schulz, P., et al., 2008].

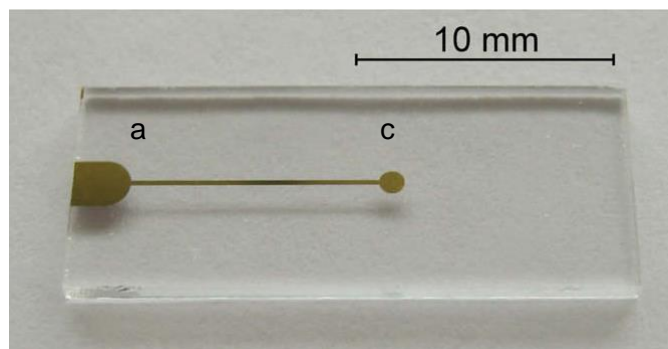


Figura 5-8. Chip sensor donde se ensambla la SSM conteniendo una película delgada de oro (electrodo). La parte circular (c) es el sitio donde se ensambla la SSM y tiene un área de 1 mm^2 . La parte de mayor área superficial (a) es el sitio de contacto con el amplificador [Tomado de Schulz, P., et al., 2008].

La bicapa planar o SSM se autoensambla una vez se adicionan $2 \mu\text{L}$ de una solución de lípidos sobre el electrodo de oro. La solución de lípidos consiste del fosfolípido difitanoil-fosfatidilcolina disuelto en n-decano a una concentración de 15 mg/mL . Este chip sensor con la SSM se monta en una cubeta como las que se observa en la Figura 5-9. Esta cubeta hecha de Plexiglass consta de una parte superior y una parte inferior (h y b) entre las que se encuentra el chip sensor ubicado de tal manera que la parte circular del electrodo de oro quede justo debajo del orificio de entrada de solución (in). En el orificio de salida se conecta el electrodo de referencia. Este electrodo de referencia es un electrodo de Ag/AgCl el cual se separa de la vía por donde fluyen las soluciones mediante un puente salino de poliacrilamida saturado con solución de KCl .

El montaje de la cubeta junto con la SSM se colocan en una cámara faradéica (Figura 5-10) y se conectan los electrodos. Mientras que el electrodo de oro se conecta al amplificador de corriente (10^9 V/A), el electrodo de referencia de AgAgCl se conecta a un generador.

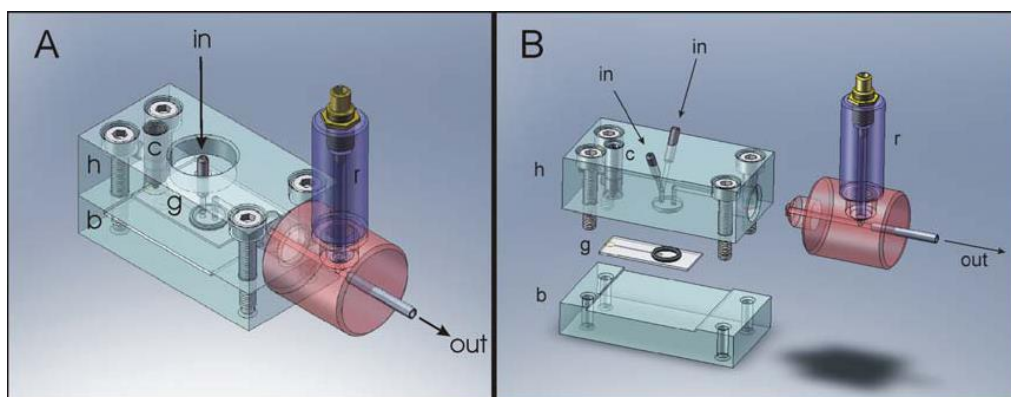


Figura 5-9. Cubetas utilizadas como soporte para el chip sensor con la SSM (g). La cabeza (h) y base (b) de las cubetas están hechas de Plexiglass. Los orificios de entrada (in) y de salida (out)

de solución tienen un diámetro de 1mm. El soporte con el electrodo de referencia (r) es ubicado en el orificio de salida [Tomado de Schulz, P., et al., 2008, Garcia-Celma, J., 2009].

En la cámara faradéica también se encuentran los reservorios de solución (A/NA) las mangueras por donde fluyen las soluciones hacia la cubeta con la SSM y las válvulas (V_1 y V_2), las cuales son controladas por computador. Los reservorios de soluciones son botellas de polietileno las cuales son presurizadas con gas nitrógeno a una presión de 0,5 bar.

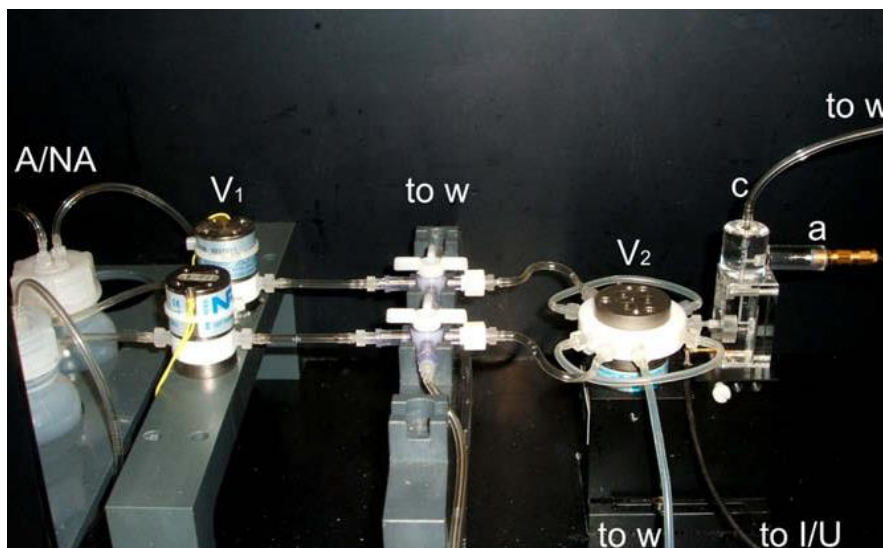


Figura 5-10. Interior de la cámara faradéica conteniendo el sistema completo de medida, compuesto por válvulas (V_1 y V_2), reservorios de las soluciones (A/NA) y el ensamblaje de la cubeta (c). En la cubeta se observa la ubicación del soporte del electrodo de referencia (a). El electrodo de oro se conecta a un amplificador (I/U). w: desechos de las soluciones [Tomado de Schulz, P., et al., 2008].

Una vez la válvula V_2 es conectada al orificio de entrada de solución de la cubeta (in), la SSM se lava con solución no activadora (NA) y se miden los parámetros de la membrana (capacitancia y conductancia) hasta que permanezcan constantes después de aproximadamente 1 h. Para la medición de la capacitancia se aplicó un potencial de onda triangular de 50mV mientras que para la conductancia se aplicó un pulso de voltaje positivo de 100mV y se midió la corriente después de 1 segundo de aplicado el pulso. Se aceptaron valores de 300-500nF/cm² para la capacitancia y 100-200nS/cm² para la conductancia.

5.6.2.2 Adición de las vesículas de membrana *E. coli* Rosetta2-CtpH

Las vesículas de membrana fueron diluidas a una concentración de 10 mg/mL y fueron sonicadas tres veces durante 10 s con intervalos de enfriamiento de 20s en hielo, con el fin de evitar la agregación de las mismas. Una vez suspendidas, 30 μ L de estas

vesículas fueron aplicados a la SSM a través del orificio de salida de solución de la cubeta. Se permitió que las vesículas de membrana se adsorbieran a la SSM durante 1 h para formar la membrana compuesta. Después de este tiempo la membrana compuesta fue lavada con solución NA.

5.6.2.3 Protocolo de intercambio de soluciones

Las medidas eléctricas en SSM se llevaron a cabo mediante un protocolo de intercambio simple de soluciones. Esto significa que dos soluciones son secuencialmente conducidas a través de la cubeta: la solución no activadora (NA) seguida de la solución activadora (A) la cual contiene el sustrato que desencadena el proceso de transporte mediado por la proteína inmovilizada en la SSM (Figura 5-11). Durante el experimento se asegura que se establezca un continuo flujo de soluciones. Este protocolo produce un salto en la concentración de sustrato (ATP en este caso) en la SSM iniciando el desplazamiento de carga.

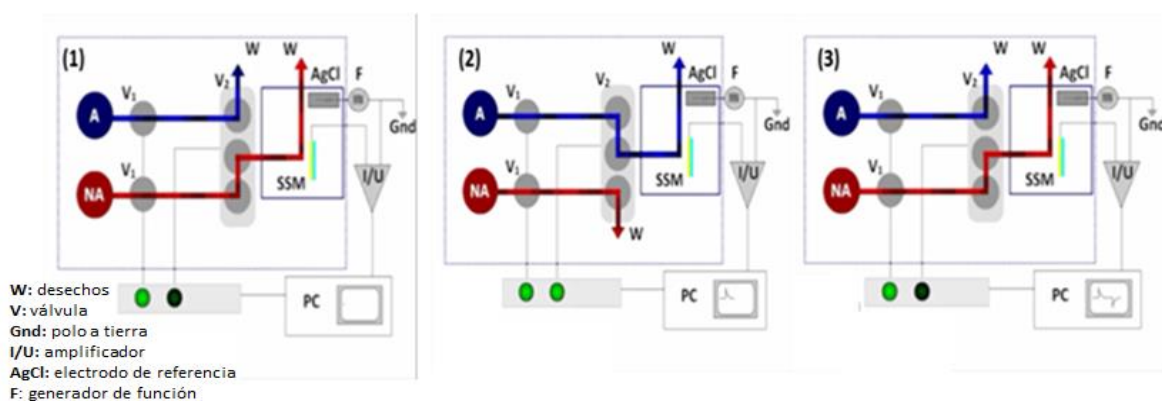


Figura 5-11. Esquema del sistema de medida, configuración de las válvulas y protocolo de intercambio simple de soluciones en SSM. El sistema completo es mantenido en una cámara faradaica. La corriente se mide con referencia a un electrodo de Ag/AgCl (AgCl) y amplificada mediante un convertidor corriente/voltaje (I/U). Se utiliza un generador de función (F) para medir las propiedades eléctricas de la SSM. Las válvulas son controladas y la corriente es registrada por computador (PC). Después de que las soluciones pasan a través de la cubeta son dirigidas a un recipiente con residuos (W). Los dos reservorios presurizados que contienen las soluciones NA y A se conectan a la cubeta (SSM) mediante válvulas de dos vías (V_1) y una válvula de tres vías (V_2). La apertura de las válvulas V_1 inicia el flujo de solución NA (1). Cuando la válvula V_2 es encendida la solución A se dirige hacia la cubeta (2) y luego esta misma válvula es apagada para el paso de solución NA hacia la SSM (3) [Modificado de Bazzone et.al. 2012]

En el caso de la caracterización de ATPasas tipo P se puede aplicar un salto en la concentración de ATP o de ion a ser transportado. En la tabla 5-5 se indica la composición de las soluciones utilizadas para las medidas del transporte en SSM en el presente trabajo. Cada fila corresponde a un experimento diferente en el que se buscó

comprobar si se presentaba una señal eléctrica debida al transporte del ion o iones correspondientes.

Sistema a ser medido	Salto en la concentración de ATP	
	A	NA
K⁺	KCl 50mM CholCl 80mM TrisATP 300μM	KCl 50mM CholCl 80mM
Na⁺/K⁺	NaCl 80mM KCl 50mM TrisATP 300μM	NaCl 80mM KCl 50mM
Na⁺	NaCl 80mM CholCl 50mM TrisATP 300μM	NaCl 80mM CholCl 50mM
Ca²⁺	0,25mM EGTA 0,5mM Ca ²⁺ (50μM libre) 129,5mM CholCl TrisATP 300μM	0,25mM EGTA 0,5mM Ca ²⁺ (50μM libre) 129,5mM CholCl
Mg²⁺ (Basal)	Tris ATP 300μM	-----

Tabla 5-5. Composición de las soluciones preparadas para las medidas electrofisiológicas en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 – CtpH adsorbidas a la SSM. Protocolo intercambio simple de soluciones. Todas las soluciones contenían 25 mM MOPS pH 7,0, 2 mM MgCl₂ y 0,2 mM DTT, además de la concentración de iones a ser probados y la cantidad de cloruro de colina (CholCl) necesaria para mantener la fuerza iónica constante en todas las medidas.

6. Resultados y Discusión

Las ATPasas tipo P son proteínas encargadas de mantener el equilibrio iónico a través de la membrana plasmática por lo que se hacen cruciales para la supervivencia de patógenos intracelulares, especialmente en las condiciones de estrés a las que son sometidos durante el proceso de infección.

Este tipo de proteínas transmembranales han sido ampliamente caracterizadas en organismos eucariotas, mientras que son pocos los estudios que reporten la caracterización de estas proteínas en bacterias. *M. tuberculosis* es la bacteria hasta ahora conocida con el mayor número de secuencias codificantes de ATPasas tipo P en su genoma, lo que podría indicar su importancia para la versatilidad requerida por la micobacteria para la adaptación a los nichos intracelulares y extracelulares durante la infección [Agranoff, Krishna, 1998]. Sarah, W. y colaboradores (2010) demostraron que *M. tuberculosis* necesita una de ellas (CtpV) para la resistencia a concentraciones elevadas de cobre, mientras que Botella, H y colaboradores (2011) reportaron que la ATPasa tipo P, CtpC de *M. tuberculosis*, protege al bacilo del exceso de Zn^{2+} y, por tanto, contribuye a la supervivencia intracelular. Un estudio más reciente indicó que la ATPasa CtpD de *M. smegmatis* presenta afinidad hacia Co^{2+} y Ni^{2+} , significando una posible flexibilidad de estas ATPasas tipo P transportadoras de metales pesados en cuanto al tipo de ion transportado [Raimunda, D. et. al., 2012].

Ninguna de las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* pertenecientes al grupo de transportadoras putativas de metales alcalinos y alcalinotérreos ha sido caracterizada experimentalmente hasta el momento. Este grupo de ATPasas adquiere importancia al considerar que se ha reportado la correlación entre variaciones intrafagosomales de Ca^{2+} , K^+ y/o Cl^- y la inhibición de la fusión fagosoma – lisosoma, característica clave de la infección tuberculosa [Soldati y Neyrolles, 2012].

6.1 Antecedentes

El gen *ctpH* (*Rv0425c*) presente en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv consta de 4620 bp y codifica una proteína de 1539 aminoácidos (159kDa), la cual se reporta en las bases de datos como ATPasa tipo P transportadora de cationes metálicos [TubercuList Database, <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>].

Junto con otras tres secuencias de *M. tuberculosis* (CtpF, CtpI y CtpE) hacen parte de un agrupamiento de ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos o alcalinotérreos, compartiendo una topología tipo II caracterizada por la presencia de 10 regiones transmembranales (Figura 6-1) [Novoa, L., et al., 2012]. CtpF fue propuesto anteriormente como un transportador de Mg^{2+} o Ca^{2+} [Botella, H., et al, 2011] mientras que CtpE, CtpH y CtpI constituyen secuencias de ATPasas tipo P inusuales. CtpH y CtpI son proteínas dos veces más largas comparadas con otras ATPasas tipo P, debido a la

presencia de un extremo N-terminal aparentemente no involucrado en el ciclo catalítico [Novoa *et. al.*, 2012; Agranoff, D y Krishna, S., 2004, 1998]. En CtpH, tanto las 10 regiones transmembranales como los 9 motivos característicos necesarios para la funcionalidad de la ATPasa tipo P se encuentran en un segmento C-terminal de aproximadamente 900 aminoácidos. Esto hizo que fuera clasificada dentro del grupo FUPA 24 (*Functionally uncharacterized P type ATPase family 24*) [Thever, M., Saier, M., 2009; Chan, H., et al., 2010].

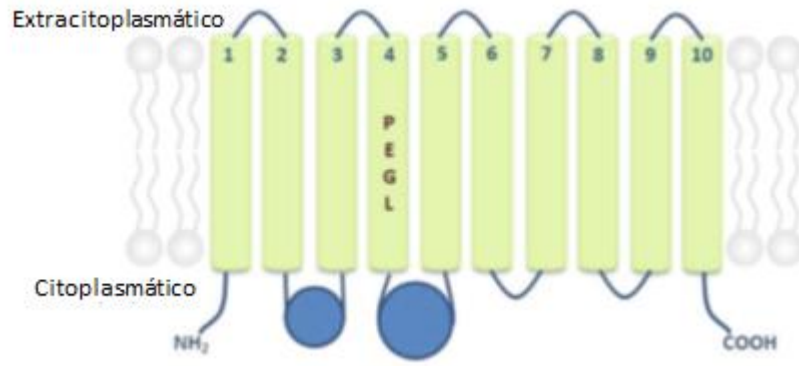


Figura 6-1. Topología tipo II presentada por las ATPasas tipo P de *M. tuberculosis* transportadoras de metales alcalinos y alcalinotérreos clasificadas como EAM (CtpH, CtpI, CtpF y CtpE). En el segmento transmembranal 4 se presenta un sitio común relacionado con la unión al ion [Modificado de Novoa, et al., 2012].

No obstante, recientes estudios bioinformáticos basados en la construcción de perfiles probabilísticos a partir de modelos ocultos de Markov y perfiles de hidrofobicidad indicaron no solo que la clasificación como FUPA 24 estaba equivocada debido a que se confirmaron las 10 regiones transmembranales, sino que la secuencia CtpH podría presentar características similares a las de una ATPasa tipo P transportadora de Ca²⁺ de retículo sarcoplásmico (SERCA) o de membrana plasmática (PMCA) presentes en organismos eucariotas (Figura 6-2) [Novoa, L., et al., 2012].

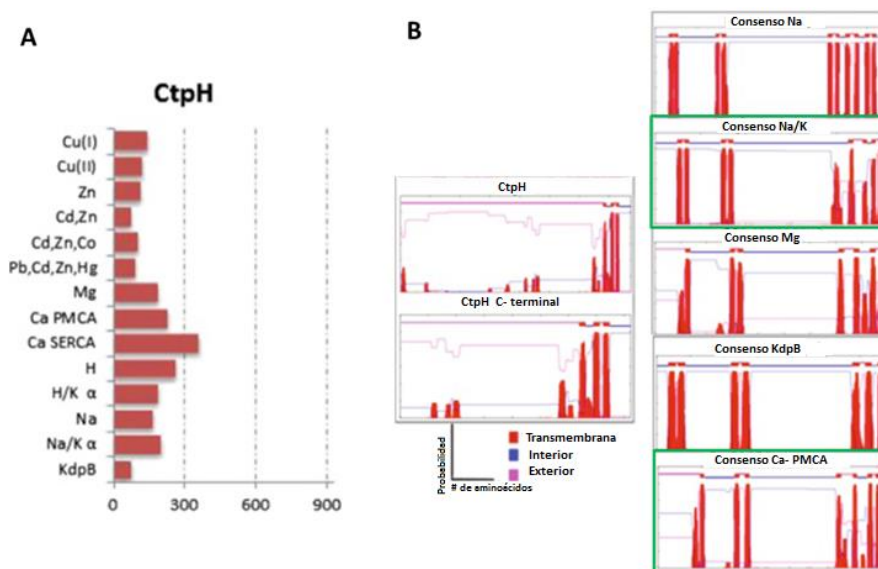


Figura 6-2. Análisis de perfiles probabilísticos construidos con base en modelos ocultos de Markov (HMM) y comparación del perfil de hidrofobicidad de CtpH con el de consensos para secuencias de Ca^{2+} -, Na^+/K^+ -, Na^+ -, Mg^{2+} - y K^+ -ATPasas tipo P. **A.** Perfil probabilístico de CtpH comparado con 16 consensos de ATPasas tipo P construidos con base en HMM, a partir del cual se indica la similitud con ATPasas tipo P transportadoras de Ca^{2+} presentes en el retículo sarcoplásmico (SERCA). **B.** Comparación del perfil de hidrofobicidad de CtpH con el generado para el consenso de ATPasas tipo P transportadoras de Ca^{2+} presentes en la membrana plasmática de eucariotas (PMCA), KdpB, Mg^{2+} , Na^+/K^+ y Na^+ , donde se observa una organización similar especialmente en la región C-terminal a la de Ca^{2+} -PMCA y Na^+/K^+ (rectángulos verdes) [Modificado de Novoa, L., et al, 2012].

Lo anterior podría considerarse un resultado que confirma estudios más tempranos de nuestro grupo de investigación en los que se evidenció la estimulación de la actividad ATPasa por el tratamiento con concentraciones fisiológicas de Ca^{2+} en vesículas de membrana plasmática extraídas de *M. tuberculosis* H37Ra, sugiriendo la presencia de una ATPasa tipo P transportadora de Ca^{2+} en la membrana citoplasmática de *M. tuberculosis* (Figura 6-3) [Patiño, M., 2010].

Sin embargo, para confirmar los resultados anteriores se hace necesario el estudio experimental del transporte mediado por CtpH. Para tal fin fue necesario la obtención de un recombinante que permitiera la expresión de la proteína en la membrana plasmática de *E. coli*. Técnicas bioquímicas y electrofisiológicas aplicadas sobre vesículas de tales membranas sirvieron como una aproximación hacia la definición de la especificidad iónica de CtpH.

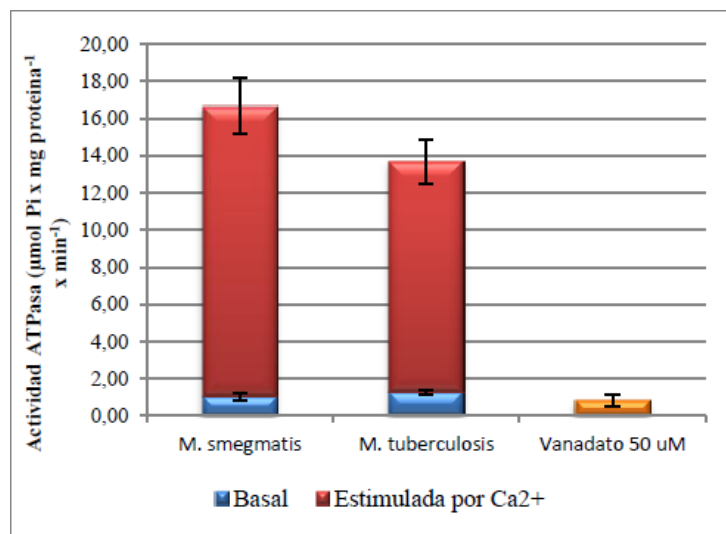


Figura 6-3. Estimulación de la actividad ATPasa en vesículas de membrana plasmática de *M. tuberculosis* H37Ra y *M. smegmatis* mc²155 con 500 µM de Ca²⁺ libre. Las barras azules indican la actividad basal, es decir la actividad ATPasa en presencia de iones Mg²⁺ necesario como cofactor para el funcionamiento de las ATPasas. Las barras rojas indican la actividad ATPasa en presencia de iones Ca²⁺. La barra amarilla indica la inhibición por iones vanadato (VO₄³⁻) de la actividad ATPasa estimulada con Ca²⁺ 500 µM en vesículas de *M. tuberculosis* H37Ra [Tomado de Patiño, M., 2010].

6.2 Obtención del recombinante H-pJET para la expresión de la proteína CtpH

El presente trabajo se inició con la amplificación por PCR del gen *ctpH* (*Rv0425c*) desde el genoma de *M. tuberculosis* H37Ra; lo que fue posible gracias a que el gen presenta 100% de identidad con el gen de la cepa virulenta *M. tuberculosis* H37Rv. Con el fin de optimizar las condiciones de la reacción de PCR, se debía tener en cuenta que el DNA genómico de *M. tuberculosis* presenta un alto contenido de GC (65,5%) favoreciendo la presencia de estructuras secundarias que dificultan el progreso de la DNA polimerasa. Además, el gen de *ctpH* es relativamente largo (4620 bp), por lo que era de vital importancia un diseño cuidadoso de los iniciadores y elección de la enzima a utilizar.

En principio se diseñaron unos iniciadores de 20 nucleótidos de longitud (*ctpH*1: *ctpH* fw y *ctpH* rev), los cuales eran totalmente complementarios a las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen *ctpH* en el genoma y generaban un fragmento de 4961bp (Tabla 5-2). En la Figura 6-4 (Gel 1) se muestran los resultados obtenidos de esta PCR empleando la enzima True Start Hot Start Taq DNA polimerasa (ThermoScientific). A pesar de que se obtiene un fragmento en el tamaño esperado, también se observan bandas de bajo peso molecular de mayor intensidad. Debido a que la enzima utilizada solo se activa durante el paso inicial de desnaturalización, no se esperarían bandas inespecíficas debidas a la unión de los iniciadores durante el incremento de temperatura. Por tanto, la causa de las inespecificidades en esta PCR puede ser debida a la

naturaleza de los iniciadores. A pesar de que iniciadores de 20 nucleótidos han resultado exitosos para la amplificación de otros fragmentos, una mayor longitud de los mismos puede resultar útil especialmente para la amplificación específica del gen a partir de genomas complejos [Dieffenbach, C., et al., 1993]. Se ha reportado que por cada nucleótido adicional la especificidad de la PCR aumenta cuatro veces, aunque se compromete su eficiencia debido a que el iniciador va a tomar mas tiempo en hibridarse a su secuencia blanco o secuencia complementaria [Dieffenbach, C., et al., 1993]. Además de elongar los iniciadores se decidió al mismo tiempo emplear una nueva DNA polimerasa Phusion de alta fidelidad y procesividad (ThermoScientific) que genera amplimeros con extremos romos. También se empleó el buffer de la enzima GC el cual esta especialmente diseñado para la amplificación de regiones de alta complejidad como el fragmento *ctpH* cuyo %GC es 69, en presencia y ausencia de DMSO.

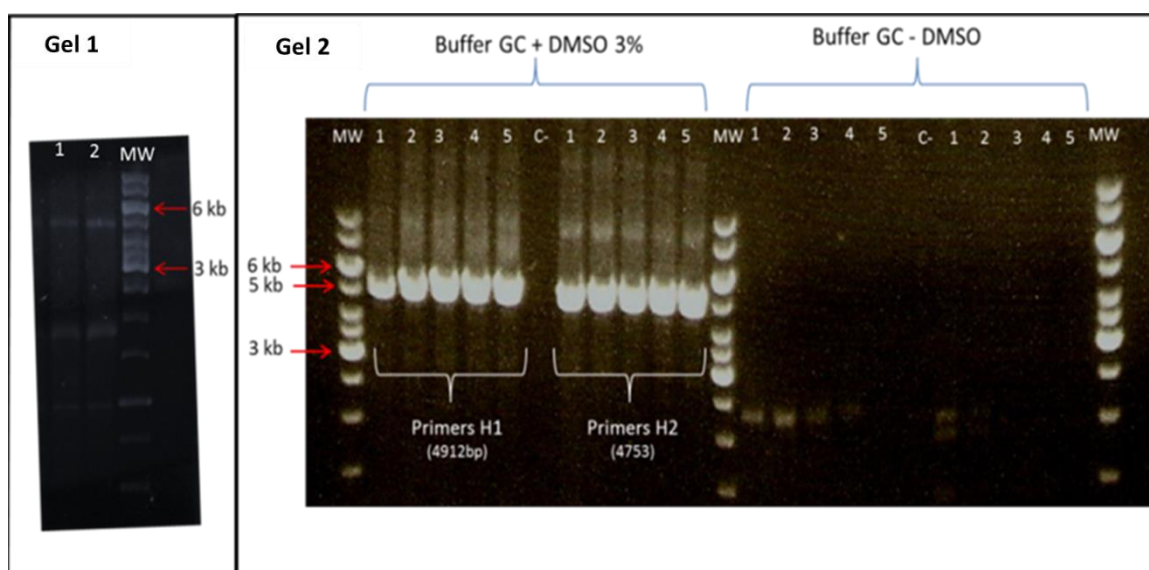


Figura 6-4. Geles de agarosa al 1% mostrando la amplificación del gen *ctpH* desde DNA genómico. La PCR se llevo a cabo utilizando diferentes iniciadores y polimerasas. Gel 1 PCR realizada con iniciadores *ctpH1 fw* y *ctpH1 rev*, Tabla 5-2, ($0,5 \mu\text{M c/u}$), dNTP's ($350 \mu\text{M c/u}$), Mg^{2+} ($2,5 \text{ mM}$), utilizando la enzima True Start Hot Start Taq DNA polimerasa (ThermoScientific) $1,5 \text{ U}$, y una temperatura de hibridación de 60 y $62 \text{ }^\circ\text{C}$ (carril 1 y 2 respectivamente) Gel 2 Optimización de la PCR con iniciadores H1 - HRev1 y H2 - HRev2 (Tabla 5-2) ($0,5 \mu\text{M c/u}$) con buffer GC (proveido por el fabricante), con DMSO 3% y sin DMSO, enzima Phusion High Fidelity DNA polymerase (ThermoScientific) 1 U , dNTP's ($200 \mu\text{M c/u}$), Mg^{2+} ($1,5 \text{ mM}$), DNA genómico ($2 \text{ ng}/\mu\text{L}$). El ciclo de amplificación consistió de un primer paso de desnaturalización de 2 min a 98°C , seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 98°C 20s , hibridación 30 s utilizando un gradiente entre 65°C y 72°C , y elongación $2,5 \text{ min}$ a 72°C . El paso final de elongación consistía de 10 min a 72°C . Para los diferentes amplimeros en los diferentes carriles se probaron diferentes temperaturas de hibridación, así: 1, $64,9^\circ\text{C}$; 2, $66,8^\circ\text{C}$; 3, $68,7^\circ\text{C}$; 4, $70,5^\circ\text{C}$; 5, $72,0^\circ\text{C}$. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific). c-: control negativo con todos los componentes menos el DNA.

Con las dos parejas de iniciadores H1 (HFw1 y HRev1) y H2 (HFw2 y HRev2) los cuales tienen una longitud de 28 nucleótidos y se hibridan completamente a las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen en posiciones diferentes a los primers ctpH1 (Tabla 5-2) se llevaron a cabo reacciones de PCR en experimentos diferentes. La pareja H1 produce un fragmento de 4912 bp mientras que la pareja H2 produce un fragmento más corto de 4753 pb. Además, la temperatura de hibridación se varió entre 65 y 72°C.

Para el caso de la PCR realizada con los iniciadores H1 y H2 (Figura 6-4, Gel 2) se obtuvo una banda muy intensa en el tamaño esperado al emplear cualquiera de las dos parejas de iniciadores y para cualquiera de las temperaturas de hibridación entre 65 y 72°C. Además se hace evidente la complejidad del DNA genómico de *M. tuberculosis* al ser necesaria la adición de DMSO para lograr la amplificación del gen. Este agente permite la separación de las hebras de DNA molde interfiriendo con los puentes de hidrógeno entre las bases de las hebras complementarias [Grunenwald, H., 2003].

La estrategia inicial de clonación seleccionada se basó en la construcción de un recombinante constituido por el fragmento amplificado y clonado en el vector pJET1.2/blunt. Este recombinante inicial permitiría tener el gen en una forma más estable y fácilmente accesible y evita tener que recurrir al DNA genómico para posteriores amplificaciones o para experimentos de mutagénesis. El vector de clonación pJET1.2/blunt, además de contener un gen de resistencia a ampicilina (que le permite al recombinante ser mantenido dentro de las células), contiene un gen letal para las bacterias *eco47IR* que codifica una endonucleasa de restricción letal para todas las cepas de *E. coli*. Este gen resulta interrumpido después de clonar un fragmento de DNA en el vector y, de esta manera, se vuelve un gen no funcional. Por tanto solo aquellas células que sobrevivan después de la transformación y sean capaces de formar una colonia en presencia de ampicilina tendrán el plásmido recombinante. Esta característica asegura una selección positiva de los clones recombinantes y evita el uso de la técnica de selección por α -complementación.

Debido a que la ligación del fragmento generado por PCR con el vector pJET1.2 es una ligación de extremos romos, el inserto puede quedar en dos diferentes orientaciones dentro del vector (Figura 6-5.A): sentido (S) o antisentido(AS) dependiendo si se inserta en la misma dirección del gen *eco47IR* en el vector o en la dirección contraria. A pesar de que es necesario tener en cuenta la dirección del fragmento en el recombinante para el correcto análisis de los resultados del posterior tamizaje de las colonias mediante corte con enzimas de restricción, es irrelevante para el paso subsecuente debido a que el recombinante obtenido (con el fragmento en una u otra dirección) será únicamente fuente del gen *ctpH*, siendo el DNA plantilla para la posterior estrategia de subclonación en el vector de expresión.

Para los dos posibles recombinantes se esperan diferentes patrones de restricción por el corte con la enzima de restricción HindIII como se muestra en la Figura 6-5.B. Se seleccionó esta enzima para realizar un tamizaje rápido debido a que presenta solo un sitio de corte en el vector y también en el inserto, de tal manera que a partir de la

digestión del recombinante esperado H-pJET, se obtendrán dos bandas. Sin embargo, si el fragmento está en dirección S o AS el tamaño de cada una de estas dos bandas es diferente. Específicamente en el caso de la inserción del fragmento H1 en el vector pJET cuando la inserción ocurre en dirección S se obtendrá una banda de 5581bp y una banda de 2305bp por el corte del recombinante con HindIII, mientras que si la inserción ocurre en AS se obtendrá una banda de 4769bp y una de 3117bp por el corte con la misma enzima.

La transformación de las células *E. coli* DH5 α con el producto de la clonación entre los fragmentos H1 y H2 y el vector pJET1.2 fue muy eficiente obteniendo más de 500 colonias, lo cual significó una eficiencia de transformación de 2×10^4 (UFC/ μ g DNA). Se seleccionaron 10 de ellas para hacer un tamizaje de restricción e identificar los posibles clones positivos.

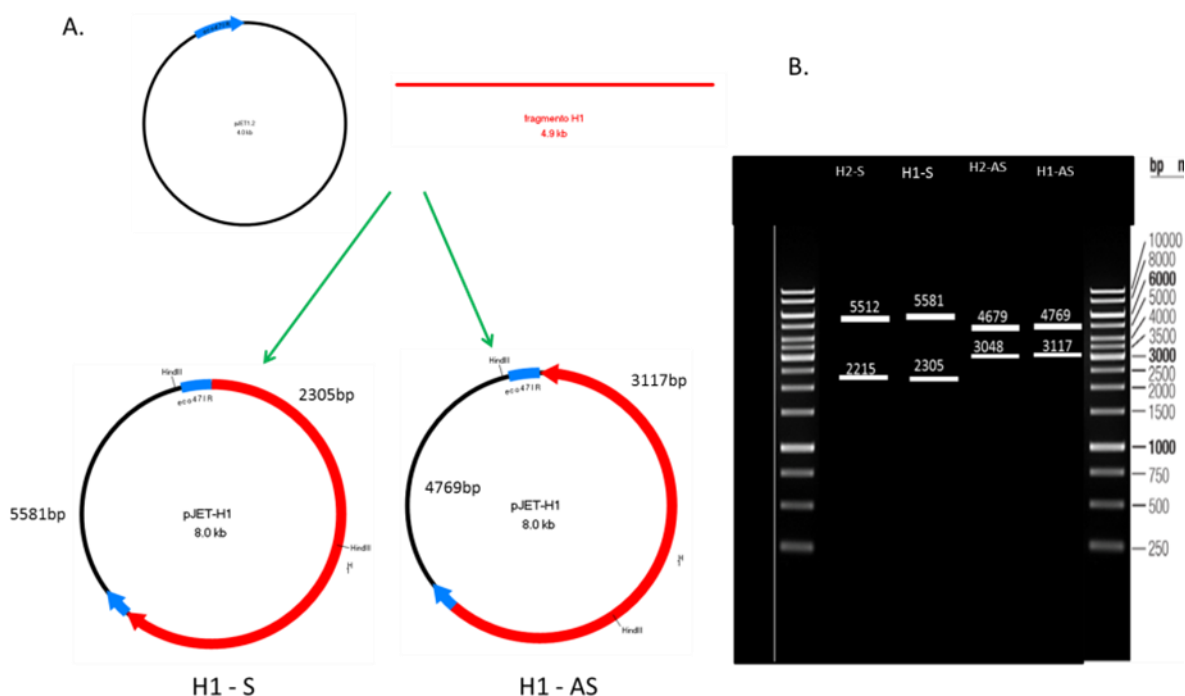


Figura 6-5. Simulación de la clonación del fragmento generado por PCR a partir del DNA genómico en el vector de clonación pJET1.2 del fragmento H1 (Figura 5-1) generado mediante PCR con los iniciadores Hfw1 y Hrev1 (Tabla 5-2). El fragmento azul representa el gen *eco47IR* el cual es interrumpido por la inserción del gen *ctpH* (rojo). El fragmento H1 (producto de la amplificación con los iniciadores Hfw1 y Hrev1) puede insertarse en dos posibles direcciones, sentido (S) o antisentido (AS) y la digestión del recombinante obtenido con HindIII produce fragmentos de tamaños diferentes. Lo mismo ocurre con el fragmento H2. **B.** Análisis *in silico* del patrón de restricción esperado para las posibles configuraciones del recombinante de clonación cortado con la enzima de restricción HindIII. A

partir del perfil de restricción se puede determinar la orientación del inserto en el recombinante (Datos obtenidos con el programa NEBcutter <http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

La Figura 6-6 muestra los resultados experimentales de la electroforesis para las digestiones de los plásmidos extraídos a partir de las colonias seleccionadas. En el caso de las colonias obtenidas para la clonación del fragmento H1 tres de las cinco colonias analizadas (H_{1c}, H_{1d} y H_{1e}) presentaron alguno de los patrones de bandas esperado según la Figura 6-5B. Específicamente, el plásmido H_{1c} presenta el patrón H1-S en la que el inserto H1 está en la misma dirección del gen *eco47IR*, mientras que en los plásmidos H_{1d} y H_{1e} el inserto está en la dirección contraria, representando así la configuración H1-AS de la Figura 6-5B (rectángulos rojos en la Figura 6-6). Por su parte, de las colonias analizadas en la clonación del fragmento H2, solo dos resultaron ser positivas, H_{2c} y H_{2e}, presentando la configuración S y AS respectivamente (rectángulos verdes en la Figura 6-6). De las colonias negativas algunas parecieran tener el plásmido pJET1.2 recircularizado (H_{2a}), lo cual podría explicarse si el gen *eco47IR* hubiese sido mutado, de esta manera el vector podría recircularizarse, produciendo una proteína no funcional y permitiendo el crecimiento de las células que lo contengan. En los casos donde apareció una sola banda no correspondiente con el tamaño esperado podrían deberse a inserciones de fragmentos más pequeños dentro del vector de clonación, como productos de degradación durante el proceso de purificación.

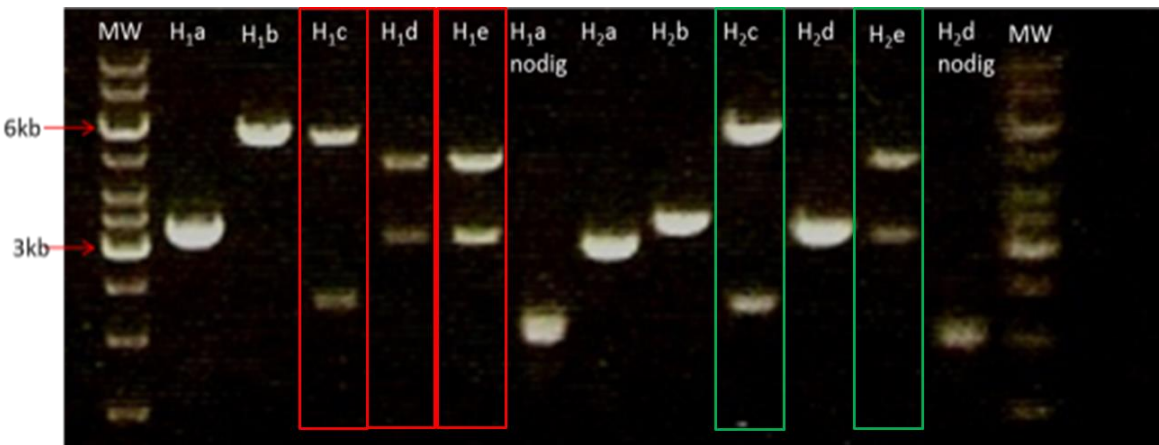


Figura 6-6. Gel de electroforesis en agarosa al 1% del tamizaje de restricción con *Hind*III de los plásmidos extraídos de las colonias de *E. coli* DH5α transformadas con el producto de ligación H-pJET. MW, marcador de peso molecular Genuler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific). H_{1a}-b: corte con *Hind*III de los plásmidos extraídos de cinco colonias producto de la transformación del resultado de la clonación entre el fragmento H1 y pJET1.2, H_{2a}-b: corte con *Hind*III de los plásmidos extraídos de cinco colonias producto de la transformación del resultado de la clonación entre el fragmento H2 y pJET1.2. H_{1a} nodig: plásmido extraído de la colonia H_{1a} no digerido. H_{2d} nodig: plásmido extraído de la colonia H_{2d} no digerido.

El plásmido extraído desde la colonia H_{1e} que mostró el patrón de bandas esperado mediante digestión con *Hind*III, fue adicionalmente analizado mediante mapeo de restricción con otras enzimas. La Figura 6-7 muestra los resultados obtenidos y permite concluir que el perfil de restricción experimental de este plásmido (Figura 6-7 A) es igual

al esperado para el recombinante H-pJET (Figura 6-7 B) con la excepción de que en la digestión con XhoI se presentan solo dos bandas, cuando según los datos simulados se esperaban tres bandas. Esto se explica debido a que la digestión con XhoI produce un fragmento pequeño que, en el gel de agarosa, se ve con una intensidad casi imperceptible. Además de las bandas esperadas que se observan en el gel de la Figura 6-7 A se observa una banda tenue de 8 kb para las digestiones con HindIII y BglII debida probablemente a plásmido no digerido o digerido solo una vez probablemente por un tiempo insuficiente de digestión. También se observa que en el carril del plásmido no digerido se presentan tres bandas de >10kb, 8kb y 6kb, siendo ésta última la más intensa. Estas bandas se deben a los diferentes enrollamientos que puede presentar el DNA circular. La banda mas intensa presenta un tamaño inferior al esperado para estel plásmido (~7,8 kb) debido a que al estar mas enrollado presenta una mayor migración en el gel de agarosa [Holt, M., 1990 http://humgen.wustl.edu/hdk_lab_manual/plasmid/plsmid10.html].

Finalmente, los resultados de secuenciamiento indicaron que el fragmento había sido clonado en su totalidad y que no presentaba ninguna mutación (Anexo C). El plásmido H₁e, cuya identidad fue confirmada por secuenciamiento, se denominó H-pJET.

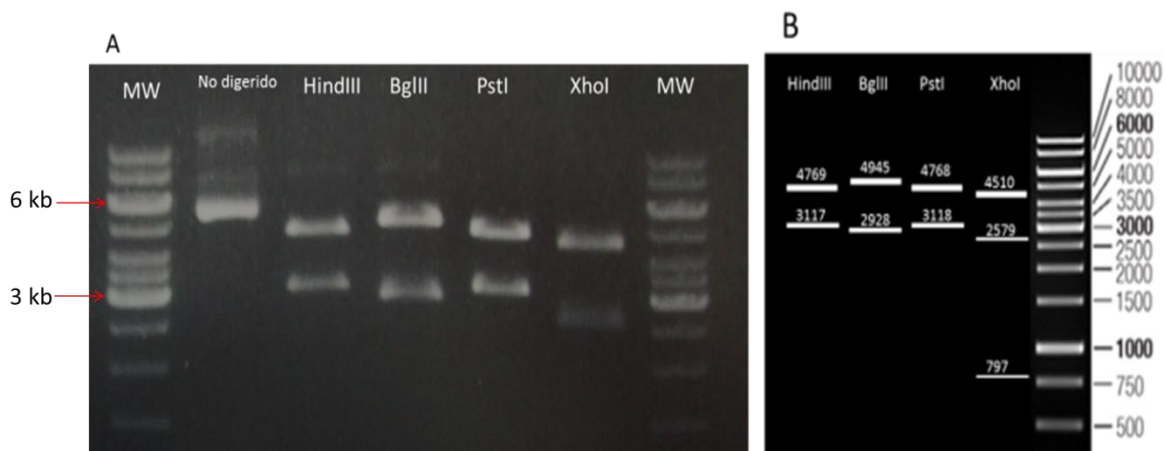


Figura 6-7. Gel de agarosa al 1% de la electroforesis del mapeo de restricción del plásmido obtenido de la colonia H₁e, resultante de la transformación de *E. coli* DH5α con el producto de ligación entre el fragmento H1 y el vector de clonación pJET1.2. **A.** Mapeo de restricción del plásmido H-pJET con las enzimas HindIII, BglII, PstI, y XhoI (NEB). Las digestiones se llevaron a cabo en reacciones de 20 μL empleando siempre el buffer recomendado por el fabricante en una concentración final 1x, entre 400-600 ng de DNA plasmídico y 1U de enzima. Todas las reacciones se incubaron durante 1 h a 37°C. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific), No digerido: plásmido no digerido, HindIII: resultados de la digestión con HindIII, BglII: resultados de la digestión con BglII, PstI: resultados de la digestión con PstI, XhoI: resultados de la digestión con XhoI. **B.** Resultados esperados de las digestiones (Datos obtenidos con el programa NEBcutter <http://tools.neb.com/NEBcutter2/> y esquematizados manualmente).

Este plásmido H-pJET sirvió como DNA plantilla para la amplificación por PCR del gen *ctpH* conteniendo sitios para corte con enzimas de restricción y posterior clonación dentro del vector de expresión pBAD-A2 (Figura 6-8). Como se mencionó anteriormente los iniciadores directo y reverso contenían sitios para corte con enzimas de restricción diferentes BglIII y EcoRI respectivamente, lo que permitiría una clonación dirigida, es decir la inserción del gen *ctpH* en solo una posible orientación y en el marco de lectura correcto con respecto al sitio de inicio de la transcripción en el vector de expresión cortado con las mismas enzimas. Como característica adicional el iniciador reverso debía ser complementario a la región 3' del gen omitiendo el codón de terminación original (TGA) (como se observa en la Figura 5-2, sección 5-3), lo que permitiría la transcripción del gen *ctpH* unido a la secuencia codificante del tag de 10His presente en el vector.

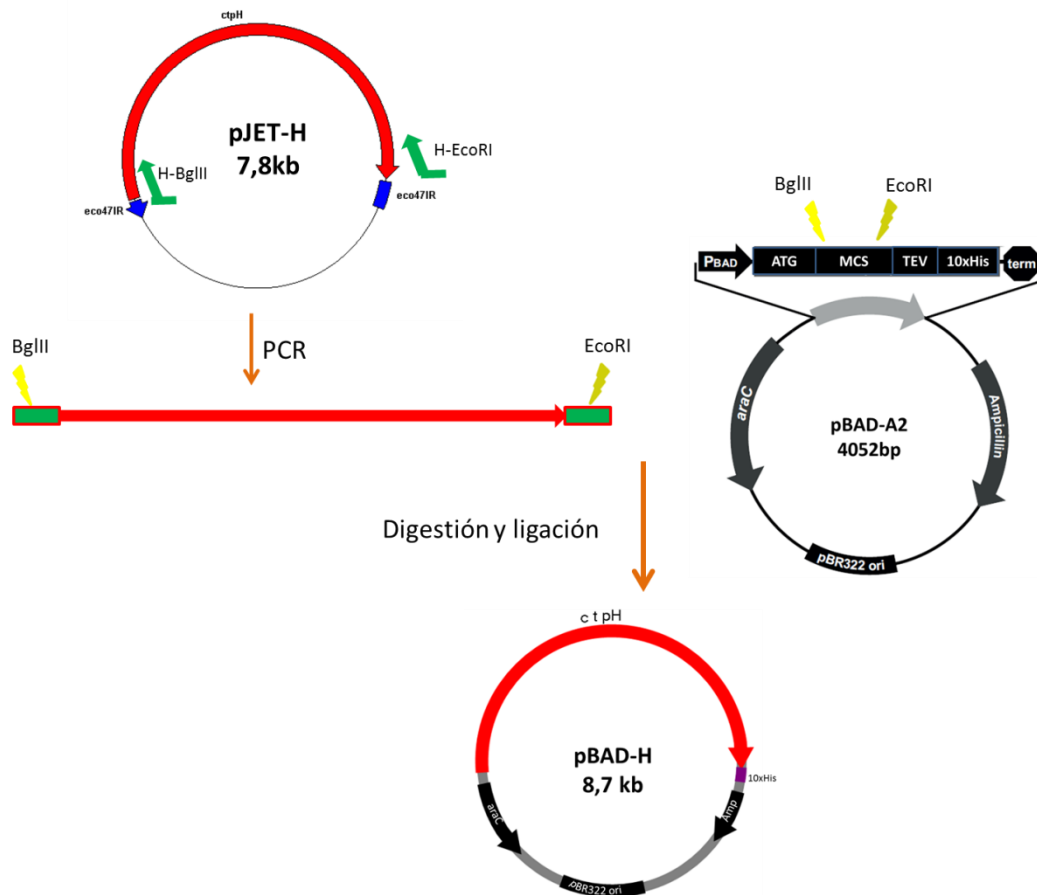


Figura 6-8. Esquema general de construcción del recombinante de expresión H-pBAD. Los iniciadores H-BglIII y H-EcoRI amplifican el gen *ctpH* con sitios para corte con enzimas de restricción en sus extremos, utilizando como plantilla el recombinante H-pJET. El fragmento amplificado y el vector de expresión pBAD-A2 son digeridos con las enzimas BglIII y EcoRI, lo que permite una clonación dirigida para dar como resultado el recombinante de expresión H-pBAD.

La Figura 6-9 muestra los resultados de la amplificación del gen *ctpH* utilizando los iniciadores H-BglIII (directo) y H-EcoRI (reverso). Se observa que sigue siendo necesaria la presencia de DMSO como aditivo para lograr la amplificación del gen, a pesar de que

se utiliza como plantilla DNA plasmídico el cual es menos complejo que el DNA genómico. Además se observan fragmentos producto de la amplificación inespecífica por debajo de 1000 bp, los cuales no se obtuvieron cuando se amplificó el fragmento H1 desde DNA genómico, debido posiblemente a que esta vez los iniciadores presentan un segmento 5' no complementario que puede hibridarse a otras regiones del recombinante. En este caso el gradiente de temperaturas de hibridación probado fue mas bajo que en el caso de la amplificación desde DNA genómico debido al segmento no complementario de los primers. No obstante, para todas las temperaturas probadas se obtuvo un producto de amplificación de aproximadamente 5000bp congruente con el tamaño esperado (4637 bp).

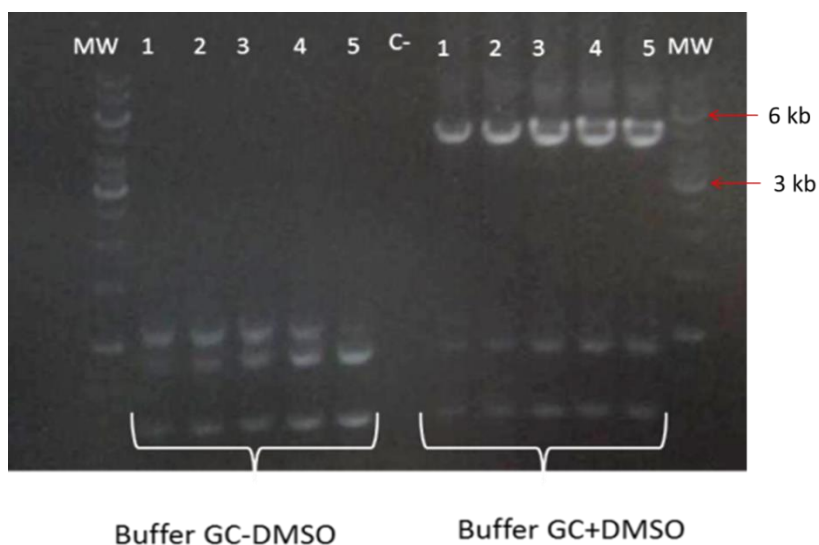


Figura 6-9. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando la amplificación del fragmento *ctpH* con inserción de sitios para corte con enzimas de restricción, usando el plásmido H-pJET como plantilla. Iniciadores: H-BglIII (directo) y H-EcoRI (reverso) (0,5 μ M c/u), buffer GC con DMSO 3% y sin DMSO, enzima Phusion High Fidelity DNA polymerase (ThermoScientific) 1U, dNTP's 200 μ M cada uno, $MgCl_2$ 1,5mM y DNA plasmídico 3 ng. En los diferentes carriles se cargaron reacciones con diferentes temperaturas de hibridación, así: 1, 60.1°C; 2, 62°C; 3, 63.9°C; 4, 67.7°C; 5, 70.6°C. El ciclo de amplificación consistió de un primer paso de desnaturalización de 2 min a 98°C, seguido por 35 ciclos de desnaturalización de 98°C 20s, hibridación 30 s utilizando un gradiente entre 60°C y 70°C, y elongación 2,5 min a 72°C. El paso final de elongación consistía de 10 min a 72°C. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific)

Para la clonación, las digestiones con dos enzimas de restricción tanto del fragmento amplificado como del vector se pueden realizar de dos maneras: secuencialmente o simultáneamente. En la primera se digiere inicialmente con una enzima, se purifica el fragmento y luego se digiere con la segunda enzima, mientras que en la simultánea se digiere el DNA al mismo tiempo, en la misma reacción, con las dos enzimas. Se escogió la opción de digestión simultánea, debido a que el paso de purificación en la digestión secuencial supone una pérdida de fragmento digerido y, así mismo, una disminución en la eficiencia de clonación. Es posible llevar a cabo la digestión simultánea en tanto se

tenga disponibilidad de un buffer en el cual las dos enzimas mantengan su actividad. En este caso las dos enzimas presentaban un 100% de actividad en buffer NEB 2 (New England BioLabs).

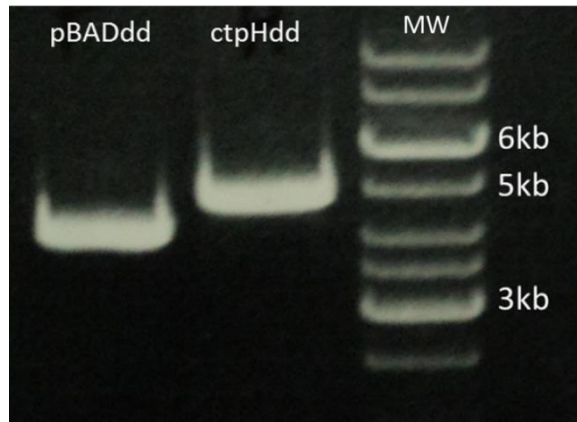


Figura 6-10. Gel de electroforesis en agarosa al 1% de la digestión tanto del fragmento amplificado desde el recombinante H-pJET como del vector de expresión pBAD-A2 con las enzimas de restricción EcoRI y BglIII (NEB). En las digestiones se utilizaron 800ng de fragmento y 600ng de vector, 1 unidad de cada enzima y se incubaron durante 1 h a 37°C. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific).

La Figura 6-10 muestra los resultados obtenidos de la digestión doble tanto del vector de expresión pBAD-A2 como del fragmento de PCR *ctpH*. Las bandas coinciden con el tamaño esperado teniendo en cuenta que el corte del vector con las enzimas BglIII y EcoRI solo libera aproximadamente 10bp del sitio múltiple de clonación y en el fragmento *ctpH* amplificado solo quita 3bp de los extremos 5'. La banda del vector digerido se toma como control positivo de la digestión.

La ligación de los dos fragmentos purificados desde el gel y la posterior transformación de células competentes de *E. coli* cepas TOP10 y XL1-Blue produjo solo 8 y 1 colonias respectivamente, siendo esta una muy baja eficiencia de transformación ($3,0 \times 10^2$ UFC/ug DNA). Se podría pensar que el procedimiento de preparación de células competentes no resultó efectivo, sin embargo esta opción se descarta al obtener una eficiencia de 3×10^4 UFC/ug DNA cuando se transformaron células de *E. coli* TOP10 con el vector pBAD-A2. Por lo tanto es probable que la obtención de un número tan bajo de colonias se deba a proporción molar inserto:vector no óptima durante la ligación. A pesar de que se utilizó una proporción sugerida (i:v 2:1) por el proveedor de la enzima T4 DNA ligasa, lo más recomendable es optimizar esta proporción para cada tipo de fragmento a ser clonado.

Se analizaron los plásmidos extraídos de las colonias transformadas mediante corte con enzimas de restricción. Inicialmente se utilizó la enzima EcoRI la cual corta solo una vez el vector pBAD-A2 y no corta el gen, de tal manera que el recombinante esperado sería cortado solo una vez generando una banda en electroforesis de aproximadamente 8700bp. La Figura 6-11 muestra los resultados del tamizaje de las colonias con EcoRI.

Se observa que ninguna de las seis colonias de TOP10 transformadas (T1 – T7) tiene el recombinante esperado; al parecer todas fueron transformadas con el vector pBAD-A2 vacío, debido a que las bandas están en un tamaño entre 4000 y 5000bp concordando con el tamaño de pBAD-A2 (4052bp). Sorprendentemente, la única colonia obtenida para la transformación de *E. coli* XL1 Blue (X1) resultó tener un plásmido de un tamaño similar al esperado (aproximadamente 8000 bp). Este plásmido fue posteriormente digerido con la enzima HindIII (Figura 6-12), la cual debería cortar dos veces el recombinante generando dos bandas de ~5800bp y ~2800bp. Se obtuvieron dos fragmentos de esta digestión, uno entre 2500 - 3000bp y el otro justo por debajo de 5000bp. Esta última banda generó dudas con respecto a la identidad del recombinante, la cual debía ser confirmada por secuenciación.

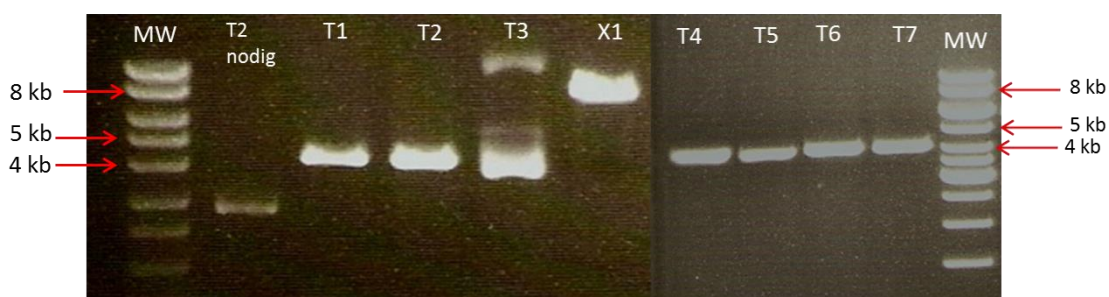


Figura 6-11. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando el tamizaje con la enzima de restricción *EcoRI* de los plásmidos extraídos de las colonias *E. coli* XL1-Blue (X1) y TOP10 (T1 – T7) resultantes de la transformación con el producto de ligación entre el vector pBAD-A2 y el fragmento *ctpH* doblemente digeridos. Se utilizó la enzima *EcoRI* 1U, aproximadamente 500 ng de cada plásmido, buffer *EcoRI* y 1 h de incubación a 37°C. Se esperaba un fragmento de 8700bp. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific). T2 nodig: Plásmido extraído de la colonia 2 de TOP10 transformada, no digerido.

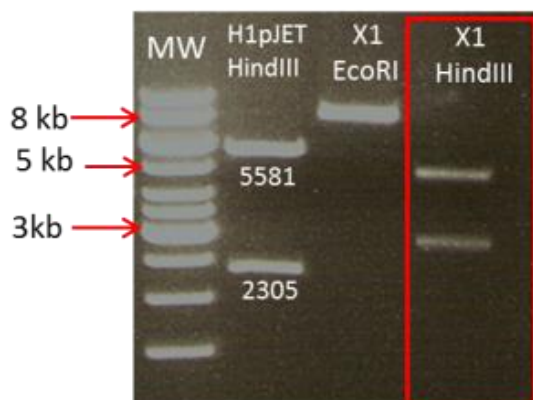


Figura 6-12. Gel de electroforesis en agarosa al 1% mostrando el corte con *HindIII* y *EcoRI* del plásmido X1 extraído de la colonia obtenida por la transformación de la cepa de *E. coli* XL1-Blue con el producto de ligación entre *ctpH* y pBAD-A2 doblemente digeridos. Se utilizó como control de la digestión con *HindIII* el plásmido H-pJET obtenido de la colonia H₁c (ver Figura 6-3). Las dos bandas obtenidas por el corte de X1 con *HindIII* tienen tamaños de aproximadamente 5000bp y <3000bp. MW: Marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific).

La Figura 6-13B muestra los alineamientos de las secuencias generadas con cinco de los seis diferentes iniciadores utilizados, los que están distribuidos a lo largo del gen *ctpH* (Figura 6-13A), con la secuencia esperada del recombinante H-pBAD. Se observa que la secuencia generada por el iniciador pBAD fw tiene una deleción de 1133bp; no se obtuvo la secuencia generada con el iniciador HF1 debido a que hibridaba en la región delecionada. Se descartó la posibilidad de que hubiese sido causada por un corte inespecífico de alguna de las enzimas debido a que tanto el fragmento generado por PCR como el vector presentaron el tamaño esperado una vez transcurrida la digestión doble (Figura 6-10). En principio también se descartó que la deleción hubiera surgido durante el paso de amplificación del fragmento a partir del plásmido H-pJET debido a que el fragmento purificado a partir del gel mostraba el tamaño esperado; esta deleción de 1133pb debería haberse podido detectar en el gel de electroforesis.

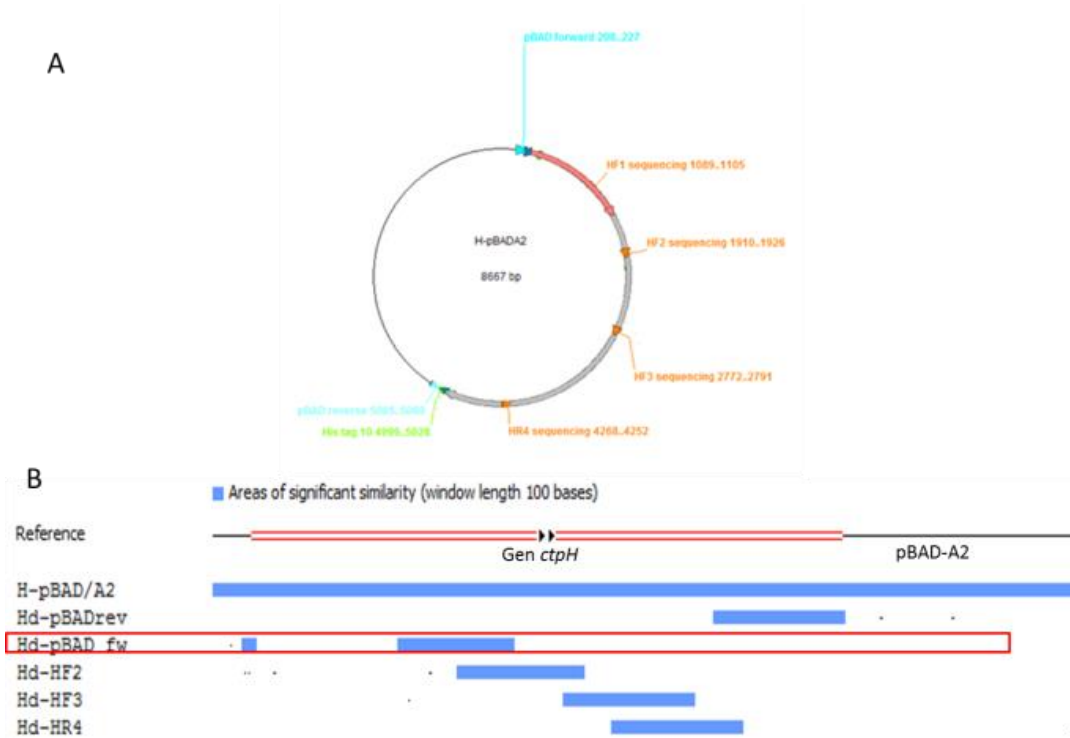


Figura 6-13. Secuenciación del plásmido obtenido a partir de la colonia X1 como posible recombinante H-pBAD. **A.** Distribución de los iniciadores, HF1 (directo), HF2 (directo), HF3 (directo), HR4 (reverso), pBAD forward (directo) y pBAD reverse (reverso), utilizados para la secuenciación del gen *ctpH* insertado en el vector pBAD-A2. En naranja se observan los iniciadores diseñados para secuenciar el gen *ctpH*, mientras que en azul se observa la ubicación de los iniciadores específicos del vector pBAD-A2. En verde se observa la ubicación del tag 10 His. La flecha roja indica la deleción identificada mediante los resultados de la secuenciación. **B.** Alineamientos de las secuencias generadas con los iniciadores de secuenciación tomando como referencia la secuencia esperada del recombinante (H-pBAD/A2). Los iniciadores pBADrev y pBAD fw son complementarios al vector de expresión en las regiones corriente arriba y corriente abajo del gen. Hd-HF2, Hd-HF3 y Hd-HR4 son las secuencias generadas con los iniciadores de

delección. Además, las temperaturas de hibridación para estas opciones son muy bajas con respecto a la temperatura utilizada experimentalmente. La segunda posibilidad era que el iniciador se hubiera hibridado por alguna secuencia interna, sin que necesariamente esta incluyera los nucleótidos 3'. Estas posibles hibridaciones inespecíficas serían, en teoría, menos probables debido a que la enzima polimerasa necesita la total complementariedad del extremo 3' para extender la cadena. No obstante una de estas opciones (Figura 6-15B, línea verde) parece concordar perfectamente con la delección obtenida a pesar que la temperatura de hibridación predicha es 30°C mas baja que las utilizadas en la PCR (60-70°C). Al parecer 9 nucleótidos del extremo 3' del iniciador se hibridaron a una región complementaria mas interna en el gen, mientras que los nucleótidos del extremo 5' se hibridaron a la secuencia complementaria esperada. Los 9 nucleótidos que se podrian haber unido a la región inespecifica coinciden con los nucleótidos pertenecientes a la secuencia presentada en el rectángulo rojo en la secuencia del iniciador de la Figura 6-14. Para que esto fuera posible debió existir una estructura secundaria en forma de loop de aproximadamente 1000bp en el DNA plantilla de tal manera que se amplificara un fragmento incorrecto del gen que llevara la delecion de la longitud correspondiente a ese loop (Figura 6-16).

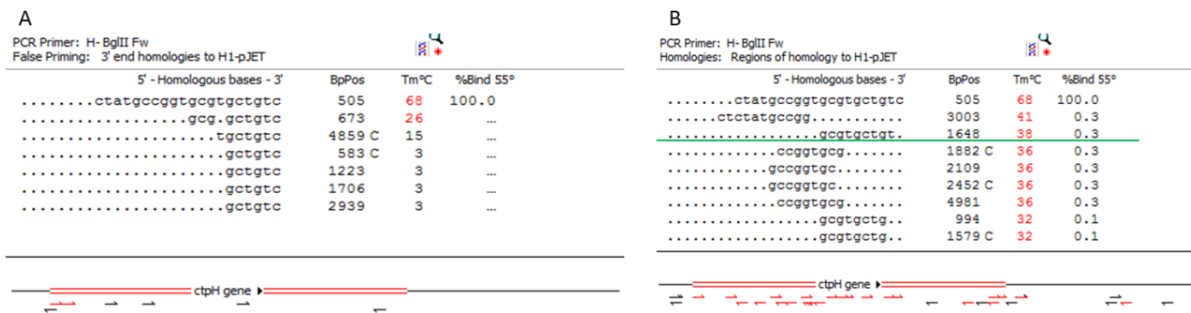


Figura 6-15. Predicciones realizadas en el programa Clone Manager de posibles hibridaciones inespecíficas del iniciador H-BglIII en la secuencia del recombinante H-pJET utilizada como plantilla en la PCR. **A.** Regiones de homología de la secuencia 3' del iniciador. **B.** Regiones de homología que no necesariamente incluían el extremo 3' del iniciador. La secuencia subrayada en verde concuerda con la posición de la secuencia faltante y con los nucleótidos ubicados exactamente después de la delección.

No es claro, sin embargo, cómo el fragmento amplificado presentaba el tamaño esperado (4637bp) al ser analizado en una electroforesis y al mismo tiempo tenía una delección de más de 1000bp. Para confirmar su identidad se realizó una digestión con la enzima XhoI la cual corta dos veces el gen *ctpH* generando tres fragmentos, como se observa en la Figura 6-17. Se obtuvieron las tres bandas con el tamaño y la intensidad predichas, confirmando la integridad del fragmento. Sin embargo, también se observan dos bandas por encima de 3000bp, las cuales no corresponden al tamaño del producto de PCR incompleto, sino que podrían ser producto de la digestión incompleta del fragmento de 4637bp. Así, a partir de lo anterior se explica claramente el origen de esta delección, pero no por qué no pudo ser detectada mediante electroforesis.

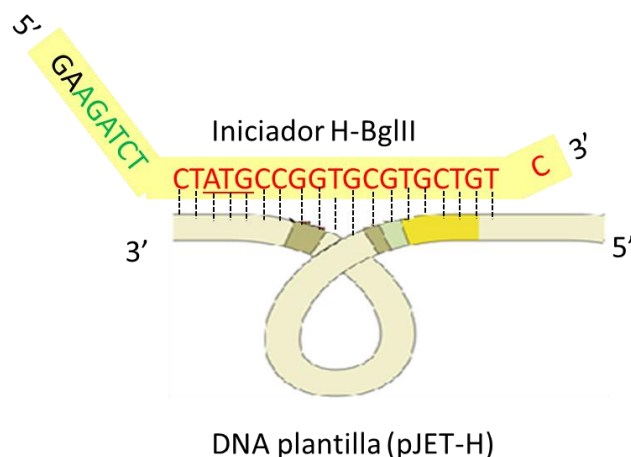


Figura 6-16. Esquema de hibridación inespecífico del iniciador H-BglIII en el plasmido H-pJET. Con letras verdes se indentifica a los nucleótidos que hacen parte del sitio de restricción para la enzima BglIII. Las letras en rojo indican la secuencia del iniciador que presenta un 100% de complementariedad con la región esperada en el DNA plantilla. De esta secuencia, los 10 primeros nucleótidos (CTATGCCGGT) se hibridaron en la posición correcta del DNA. Los siguientes 9 nucleótidos (GCGTGCTGT) se hibridaron a una posición inespecífica más interna en el gen. El nucleótido del extremo 3' del iniciador (C) no se anillo al DNA.

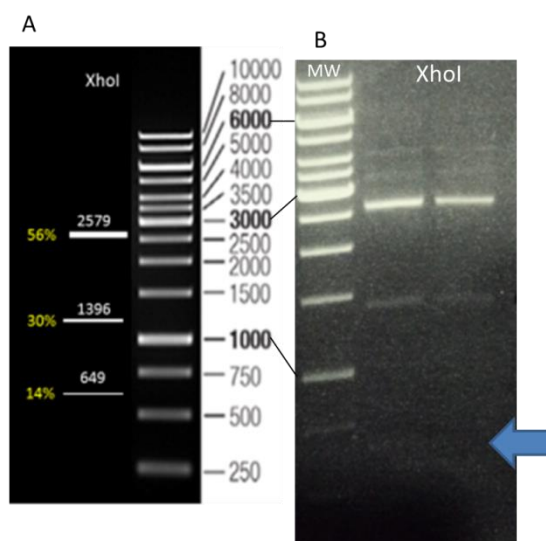


Figura 6-17. Digestión del fragmento amplificado con los primers H-BglIII y H-EcoRI a partir del recombinante H-pJET con la enzima XhoI. **A.** Predicción de los fragmentos obtenidos de la digestión del fragmento con la enzima XhoI, datos obtenidos a partir del programa NEBcutter y esquematizados manualmente. En amarillo se presentan las intensidades relativas de cada banda. **B.** Gel de electroforesis de la digestión del fragmento *ctpH* en agarosa al 1% con la enzima XhoI. La flecha azul indica la posición de la banda de 649 bp que presenta una muy baja intensidad. MW: Marcador de peso molecular Gennuler 1kb (ThermoScientific).

Se realizó de nuevo la amplificación del gen utilizando los iniciadores H-BgIII y H-EcoRI (Tabla 5-3), la enzima Phusion DNA polimerasa (ThermoScientific) y el recombinante H-pJET como plantilla. Después de la amplificación, se obtuvo el fragmento *ctpH* que se ligó en el vector pBAD-A2. El producto de ligación se transformó en células de *E. coli* DH5 α y se obtuvieron aproximadamente 20 colonias (eficiencia de la transformación $6,7 \times 10^3$ UFC/ μ g DNA) de las cuales 9 fueron analizadas mediante corte con enzimas de restricción como se mencionó anteriormente. Esta vez la digestión con HindIII evidenció la presencia del recombinante correcto en tres colonias, tal como se observa en la Figura 6-18A. Para confirmar los resultados obtenidos con HindIII se realizaron digestiones con XhoI y EcoRI; estas últimas se utilizaron solo para las colonias que habían resultado positivas con HindIII.

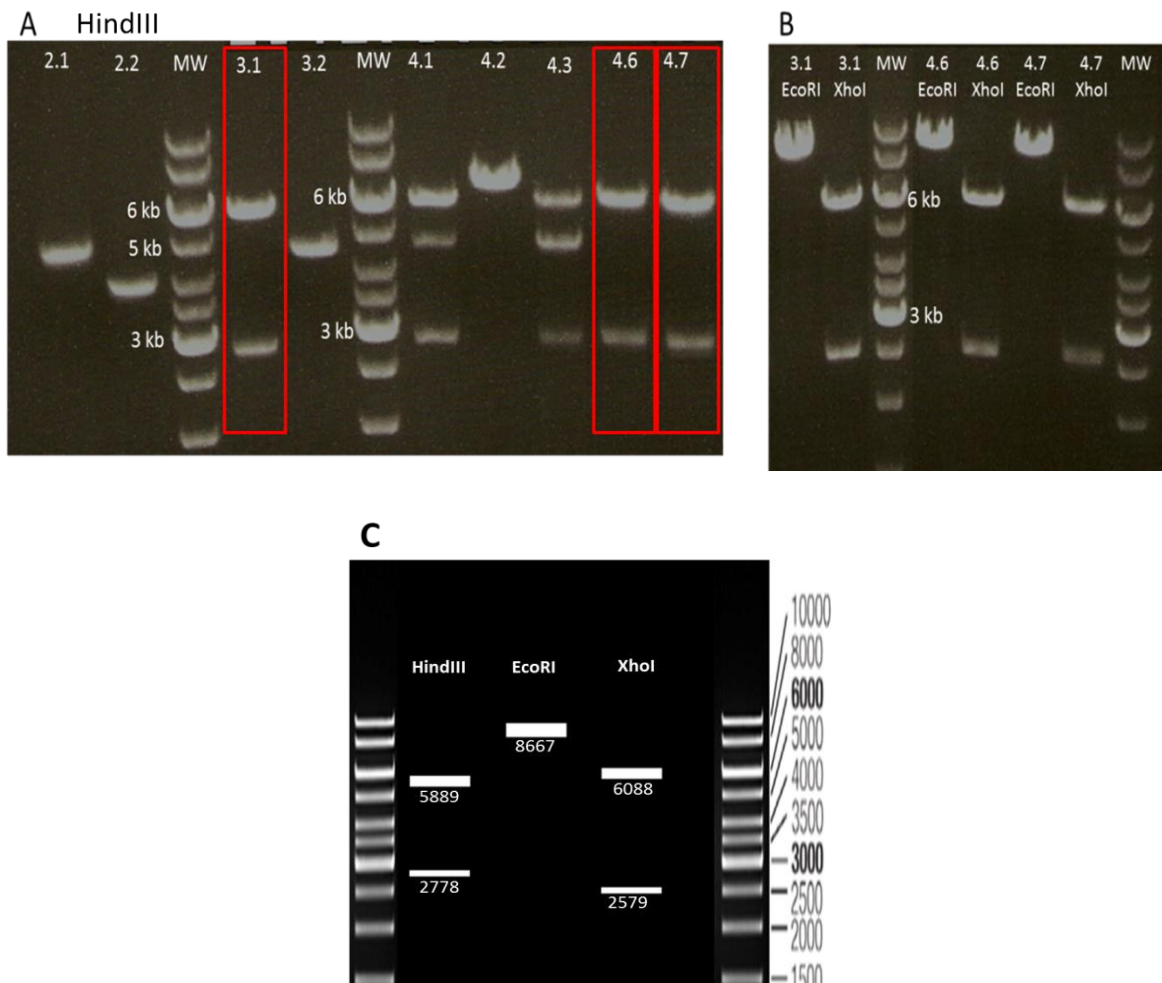


Figura 6-18. Tamizaje de las colonias de *E. coli* DH5 α transformadas con el producto de ligación entre el fragmento *ctpH* amplificado desde H-pJET y el vector de expresión pBAD-A2. El recombinante esperado de la ligación se denominó H-pBAD. **A.** Gel de electroforesis en agarosa al 1% de la digestión de los plásmidos extraídos de 9 colonias transformadas con la enzima HindIII. Los rectángulos rojos indican los plásmidos que presentaron el patrón esperado para el recombinante H-pBAD. **B.** Gel de electroforesis en agarosa al 1% de la digestión con EcoRI y XhoI de los plásmidos que presentaron el patrón esperado al haber sido cortados con HindIII (3.1,

4.6 y 4.7) **C.** Predicción del patrón de bandas esperado para la digestión del recombinante H-pBAD con las enzimas HindIII, EcoRI y XhoI. Datos obtenidos mediante el programa NEBcutter y esquematizados manualmente. MW: marcador de peso molecular Genruler 1kb (ThermoScientific).

Los plásmidos extraídos de las colonias 3.1, 4.6 y 4.7 presentaron dos bandas por el corte con HindIII del tamaño esperado, según lo que se esperaba de acuerdo a la Figura 6-15C. Así mismo el patrón de bandas para los plásmidos extraídos de estas tres colonias fue el esperado para corte con EcoRI y XhoI. Debido a que el recombinante obtenido sería utilizado directamente para expresión de la proteína CtpH, resulta de vital importancia asegurar que no existen mutaciones, para lo cual se realizó un nuevo mapeo de restricción con diferentes enzimas (Figura 6-19) del plasmido obtenido de la colonia 4.7.

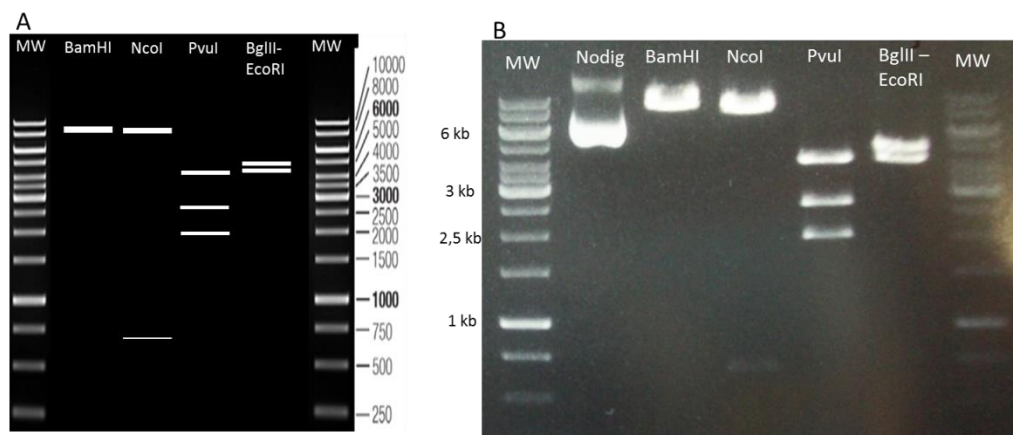


Figura 6-19. Mapeo de restricción del plásmido obtenido de la colonia 4.7 de *E. coli* DH5α transformada con el producto de ligación entre el fragmento *ctpH* y el vector de expresión pBAD-A2. **A.** Análisis in silico de la digestión del plasmido con las enzimas BamHI (8667bp), NcoI (7953bp y 714bp), PvuI (4161bp, 2592bp y 1914bp) y BglII-EcoRI (4627bp y 4040bp), realizada con el programa NEBcutter. **B.** Gel de electroforesis en agarosa al 1% de los resultados experimentales de la digestión con las mismas enzimas. Nodig: plasmido no digerido. MW: Marcador de peso molecular GenRuler 1kb DNA Ladder (ThermoScientific).

A partir del mapeo de restricción se concluye que el plásmido de la colonia 4.7 presenta el mismo perfil de restricción esperado para el recombinante de expresión H-pBAD. Al mismo tiempo, los resultados de la secuenciación de este plásmido (Anexo C) permitieron concluir que el gen *ctpH* está insertado, en marco de lectura, completo y sin mutaciones, en el vector de expresión pBAD-A2 (Figura B-1, Anexo B).

6.3 Expresión de la proteína CtpH de *M. tuberculosis* en la membrana citoplasmática de *E. coli*

Factores como la cepa de expresión, el tipo y concentración de inductor, el tiempo de expresión, entre otros, deben ser considerados y optimizados antes de iniciar la

expresión de la proteína recombinante. Aunque protocolos de expresión exitosos con proteínas similares pueden convertirse en puntos de referencia, las condiciones de expresión pueden variar drásticamente de proteína a proteína, por lo cual es recomendable realizar una optimización secuencial y sistemática a pequeña escala de tantas variables de expresión como sea posible.

Una gran cantidad de proteínas de bacterias han sido expresadas con éxito utilizando los vectores pET. Sin embargo, por tener un promotor fuerte como el T7, se pueden producir niveles altos de expresión de la proteína, lo que en el caso de las proteínas de membrana podría significar la obtención de cuerpos de inclusión. Aunque en la literatura se encuentran protocolos para la renaturalización de proteínas desde cuerpos de inclusión, la obtención eficiente de proteína funcional es muy baja para el caso de las proteínas de membrana, por lo cual se convierten en una condición a evitar. Los vectores pBAD se han convertido en una herramienta útil para la expresión de proteínas de membrana, debido a que presentan un promotor moderado (*araBAD*). A pesar de que no se obtiene el mismo nivel de expresión que con los sistemas pET, se ha reportado que para proteínas expresadas con el sistema pBAD existe una gran correlación entre su contenido en lisados celulares y su proporción en membrana plasmática; lo que significa que existe una gran probabilidad de que una proteína de membrana al ser expresada con el sistema pBAD se encuentre integrada de manera funcional en la membrana plasmática aunque su expresión haya sido en un bajo nivel comparada con la expresión que se podría lograr con los sistemas pET (Figura 6-20) [Lewinson, O., et al., 2008].

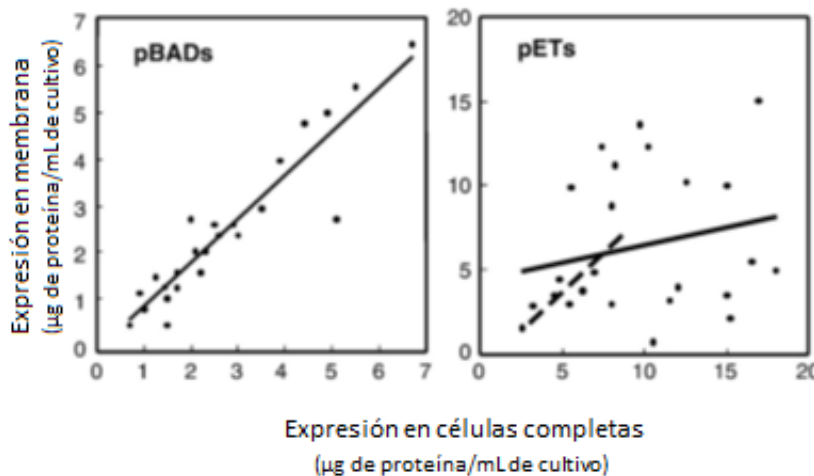


Figura 6-20. Correlación entre los niveles de expresión observados en células completas y los obtenidos en fracción membranal, para la expresión de 24 ATPasas tipo P utilizando vectores pET y pBAD. Cada punto corresponde a una proteína individual. [Modificado de Lewinson, O., et al., 2008].

El promotor *araBAD* es regulado positiva y negativamente por el regulador transcripcional AraC. Esta proteína se encarga normalmente de regular los niveles de expresión de las proteínas involucradas en el metabolismo de arabinosa tales como AraA, AraB y AraD. La proteína AraA se encarga generalmente de convertir arabinosa a ribulosa, AraB tiene

actividad ribuloquinasa para fosforilar la ribulosa y AraD convierte ribulosa-5-fosfato a xilulosa-5-fosfato. Este ultimo puede ser metabolizado por la via de las pentosas fosfato [Schlieff, R., 2002]. De esta manera la proteína AraC se convierte en un sensor de L-arabinosa que promueve la síntesis de las proteínas encargadas de la ingesta de arabinosa (AraE, AraF y AraG) y de las involucradas en el catabolismo de arabinosa (AraB, AraA y AraD). En ausencia de L-arabinosa la proteína AraC forma un dimero que se une a las regiones I_1 y O_2 del operon *araBAD* formando un loop de DNA de 210bp que restringe el acceso de la RNA polimerasa y que, por tanto, impide la transcripción de los genes que estén bajo el control del operon *araBAD* (Figura 6-21 A). Cuando L-arabinosa esta presente, se une al bolsillo de union a arabinosa ubicado en N-terminal de AraC, lo que promueve un cambio conformacional del dimero que conlleva a la unión a las regiones I_1 y I_2 y, así mismo, permite la unión de la RNA polimerasa al promotor (Figura 6-21 B) [Schlieff, R., 2002].

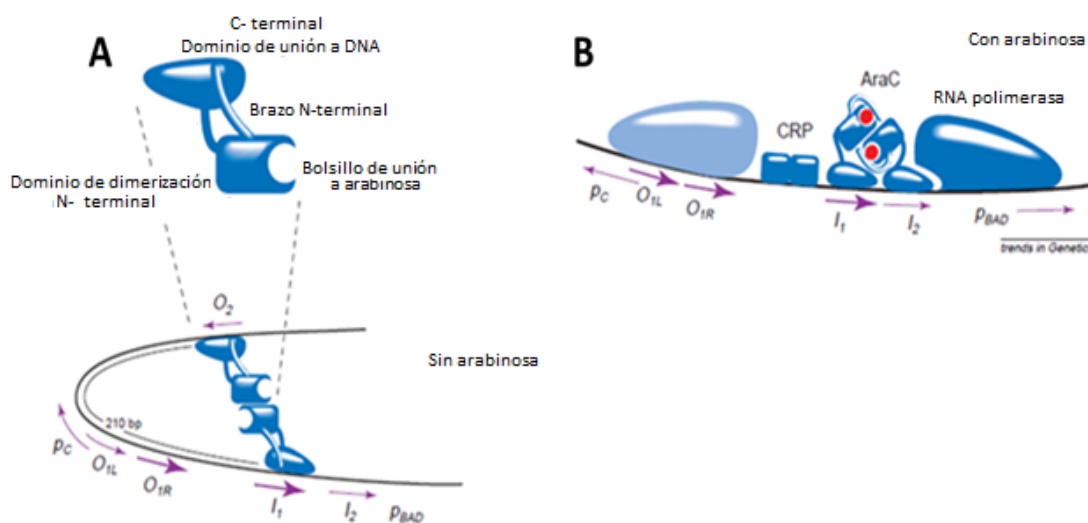


Figura 6-21. Mecanismo de regulación del promotor *araBAD* por parte de la proteína AraC. **A.** El regulador transcripcional AraC forma un dimero que, en ausencia de L-arabinosa, se une a las regiones O_2 y I_1 formando un loop de 210 bp que impide la transcripción. **B.** Cuando se adiciona L-arabinosa, esta se une al dominio de unión a arabinosa en la proteína AraC, la cual sufre un cambio conformacional que permite la liberación de la región O_2 y su unión subsecuente a la región I_2 adyacente a I_1 en el promotor, permitiendo la unión de la RNA polimerasa y, así mismo, el inicio de la transcripción [Modificado de Schlieff, R., 2002].

Es común que las proteínas expresadas heterológamente se unan a secuencias (tags) que pretenden ser un marcaje para facilitar la detección y posterior purificación. Uno de los tags mas utilizados es el tag de 10 ó 6 histidinas, el cual permite la purificación de la proteína mediante una cromatografía de afinidad de metal inmovilizado, en donde la columna mas utilizada esta hecha de Ni^{2+} -NTA esta resina emplea el quelante ácido nitrolotriacético que es capaz de coordinar el ion Ni^{2+} en 4 sitios y es capaz de retener los

iones bajo condiciones fuertes de lavado (QUIAGUEN, 2003). Se ha reportado que la ubicación y longitud del tag de His puede tener un efecto determinante en la producción de la proteína, sin embargo el posicionamiento del tag en N- o C-terminal depende exclusivamente de las características propias de la proteína como por ejemplo la localización de los sitios funcionales y la presencia o no de péptido señal [Lewinson et. al. 2008].

En el caso de CtpH se prefirió ubicar el tag de 10 His en el extremo C-terminal debido a que se predijo la presencia de un péptido señal en el extremo N-terminal que no presenta sitio de corte con la peptidasa de señal (Figura 6-22). Este tipo de señal hidrofóbica podría ser indispensable para el reconocimiento del complejo proteína naciente-ribosoma por parte de la partícula de reconocimiento de señal (SRP) y, por tanto, para el direccionamiento co-traducciona de la proteína hacia su inserción en la membrana. Especialmente, las proteínas de membrana endógenas de *E. coli* poseen este tipo de segmentos hidrofóbicos en el extremo N-terminal, lo que reafirmaría la importancia de la secuencia encontrada en CtpH para su inserción en la membrana durante su expresión en *E. coli* [Lee, H., Bernstein, H., 2001].

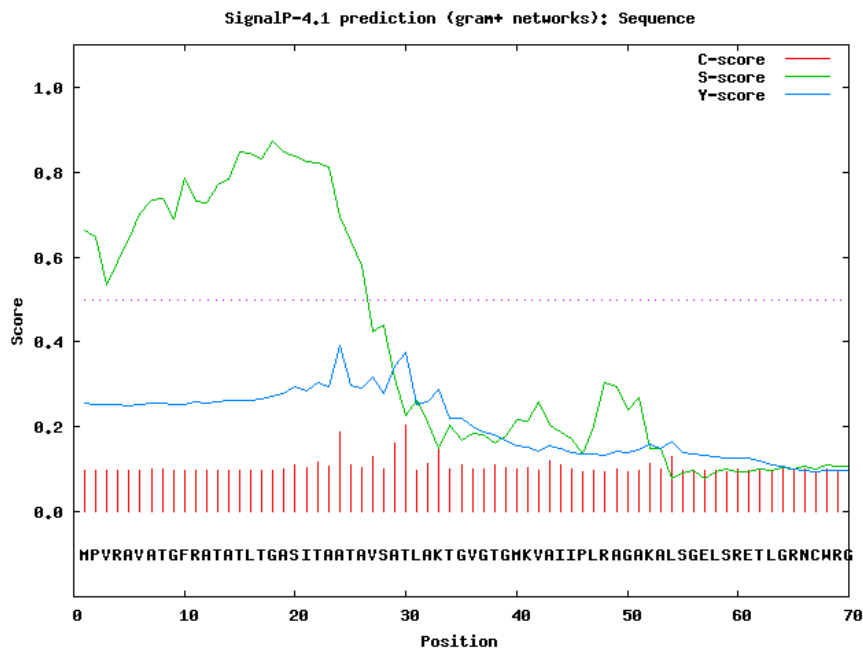


Figura 6-22. Predicción de péptido señal en la secuencia proteína CtpH de *M. tuberculosis*, utilizando la herramienta SignalP 4.1 con el algoritmo para bacterias Gram-positivas (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>). La línea verde indica el S-score e indica la probabilidad de que los aminoácidos representados hagan parte de un péptido señal. En este caso se observa que el S-score está por encima del umbral 0,5 (línea horizontal punteada) para los primeros 26 residuos de CtpH aminoácidos que probablemente corresponden a un péptido señal. La línea roja (C-score) indica la probabilidad de que los residuos analizados sean un sitio de reconocimiento de

la peptidasa de señal. La secuencia predicha como péptido señal no es removida en el caso de CtpH.

Es inusual la predicción de péptido señal en proteínas pertenecientes a *M. tuberculosis* debido a que las herramientas existentes para la predicción de péptido señal han diseñado algoritmos aplicables solo en el caso de organismos eucariotas, bacterias Gram-negativas y bacterias Gram-positivas. Sin embargo, Leversen, N. y colaboradores (2009) compararon la eficiencia en proteínas de *M. tuberculosis*, de algunos de los algoritmos más utilizados en la predicción de péptidos señal y concluyeron que la mejor herramienta era Signal P empleando la opción para bacterias Gram positivas a pesar de que *M. tuberculosis* se considera Gram-indeterminada [Leversen, N., et al., 2009]. Utilizando esta y otras dos herramientas de predicción: SPEPLip y Phobius, se encontró que CtpH es la única secuencia de las 12 ATPasas tipo P presentes en *M. tuberculosis* que presenta péptido señal (Tabla 6-1). No es claro por que esta señal no removible solo estaría presente en la proteína CtpH, sin embargo algunos estudios han indicado que este tipo de secuencias N-terminal serían de especial importancia para el adecuado plegamiento de proteínas de membrana [de Souza, G., et al., 2011] y podría ser bastante relevante en el caso de que tales proteínas tuvieran tamaños grandes (como es el caso de CtpH).

Algoritmo	CtpE	CtpF	CtpH	CtpI	KdpB	CtpA	CtpB	CtpC	CtpD	CtpG	CtpK	CtpV
Signal P (Gram+)	-	-	+(1-23)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SPEPLip (Gram + y -)	-	-	+(1-26)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Phobius	-	-	+(1-28)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Tabla 6-1. Predicción de péptido señal para las secuencias de ATPasas tipo P transportadoras de metales alcalinos/alcalinotérreos presentes en *M. tuberculosis*, utilizando las herramientas Signal P (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>) para bacterias Gram-positivas (Gram+), SPEPLip (http://gpcr.biocomp.unibo.it/cgi/predictors/spep/pred_spepcgi.cgi) para bacterias Gram-positivas y Gram-negativas (Gram-) y Phobius (<http://phobius.sbc.su.se/>). (-) indica que no se predijo péptido señal para la ATPasa analizada con la herramienta correspondiente. (+) indica resultado positivo para la predicción de péptido señal y en paréntesis se muestran las posiciones de los aminoácidos que hacen parte del mismo.

Teniendo en cuenta lo anterior, se utilizó el vector de expresión pBAD-A2, el cual es modificado a partir del vector comercial pBAD-A para poder ubicar el tag de 10 His corriente abajo del sitio múltiple de clonación (ver Figura A2, Anexo A) y así poder expresar la proteína CtpH con el tag en C-terminal y así no bloquear la secuencia N-terminal presumiblemente importante para la expresión en la membrana.

El fabricante de este tipo de vectores (Invitrogen) recomienda el uso de la cepa TOP10 de *E. coli*, la cual presenta una mutación del sistema *araBAD*C, evitando que la L-arabinosa sea metabolizada y, de esta manera, la totalidad de este carbohidrato

adicionado sea completamente dirigida a la inducción de la expresión. La cepa TOP10, ha sido empleada con éxito en otros estudios de expresión de ATPasas tipo P de *M. smegmatis* [Raimunda, D., et al., 2012].

El tiempo post-inducción fue la primera condición considerada para la optimización, es decir, el tiempo transcurrido desde el momento de adicionar el inductor y la recolección de células. En la Figura 6-23A se observa el gel de electroforesis SDS-PAGE obtenido para muestras de lisados celulares de la cepa TOP10 transformada con el recombinante H-pBAD y sometida a diferentes tiempos de inducción; claramente se observa que en los casos donde hubo presencia de inductor existe una mayor proporción de una proteína con peso molecular ligeramente por encima de 150 kDa, tamaño que coincide con el de la proteína CtpH unida al tag de 10 histidinas (162 kDa). Para el caso de no inducción también se presenta una banda del mismo tamaño pero de una intensidad significativamente menor; esto podría corresponder a la inducción basal de la proteína causada por una débil represión del promotor, como se ha reportado anteriormente [Guzman, L., et al., 1995]. Aparentemente, después de 2 h de inducción la proteína comienza a ser degradada para las dos concentraciones de inductor probadas, ya que la intensidad de la banda se hace menor. Esto podría ser causado por un mal plegamiento de la proteína o por la no inserción de la proteína en la membrana, lo cual lleva a la formación de cuerpos de inclusión y a la activación de la maquinaria de degradación en *E. coli* [Samuelson, J., 2011].

Con el fin de confirmar si las bandas de mayor intensidad obtenidas en los geles de SDS-PAGE correspondían a la proteína CtpH expresada en *E. coli* se llevaron a cabo electrotransferencias de las proteínas desde el gel a membranas de PVDF utilizando los sistemas seco (iBlot Dry Blotting System, Invitrogen), húmedo (X-Cell Blot, Invitrogen) y los sistemas de transferencia semiseca Trans-Blot SD y Turbo (BIORAD) como se mencionó en la sección 5.8.2.

A pesar de probar varias transferencias con el sistema seco (iBlot Dry Blotting System, Invitrogen) no se logró detectar la proteína en la membrana de PVDF, debido a que los programas del sistema están ajustados a tiempos cortos de transferencia, útiles para detecciones preliminares de proteínas de bajo peso molecular.

La membrana mostrada en la Figura 6-23B se obtuvo mediante el sistema húmedo de transferencia (X-Cell Blot, Invitrogen). En ella se observa con alta intensidad la banda de 75 kDa del patrón de peso molecular y bandas por encima de 150 kDa para los ensayos de expresión con diferentes tiempos de inducción. Estas últimas bandas corresponden a la proteína CtpH marcada con el tag de 10 His. Sin embargo la baja intensidad de estas bandas no se correlaciona con la intensidad de las bandas ubicadas en la misma posición en el gel de SDS-PAGE. A pesar de que, a diferencia del sistema seco, con el sistema húmedo de transferencia se logra detectar la proteína CtpH, la transferencia es aun muy pobre. No obstante, para 0,02% de L-arabinosa, después de 4 h de inducción no se detectó la proteína y para 0,2% de L-arabinosa el mismo tiempo de inducción evidencio una banda más tenue que las bandas de 2h y 1h de inducción.

La baja eficiencia en la transferencia de debió posiblemente a un tiempo insuficiente de electrotransferencia, teniendo en cuenta que se trabajó con una proteína de alto peso molecular. Se ha reportado que para proteínas de alto peso molecular se necesitan buffers especiales y tiempos mas largos de transferencia [Bolt, M., Mahoney, P., 1997].

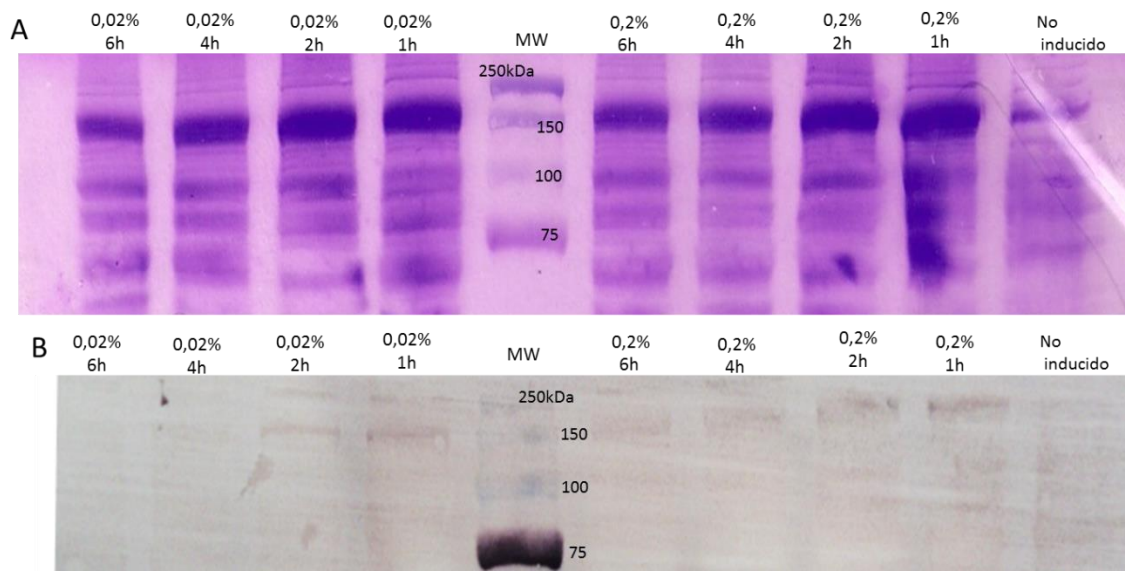


Figura 6-23. Optimización del tiempo de inducción con L-arabinosa 0,02% y 0,2% de la expresión de la proteína CtpH en la cepa *E. coli* TOP10. **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de lisados celulares obtenidos en diferentes tiempos de inducción a 37°C. En cada carril se cargaron 60 µg de proteína total estimados. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron teñidas con solución Coomassie R-250 0,1%. **B.** Inmunoblot de los lisados celulares obtenidos para diferentes tiempos de inducción a 37°C utilizando el sistema de electrotransferencia humedo (X-Cell Blot, Invitrogen) a membrana de PVDF mencionado en los materiales y métodos. Ab 1°: Monoclonal Anti-His (sc-8036), Ab 2°: Policlonal Anti ratón producido en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina (A4312). La detección cromogenica de la proteína se realizó con solución de sustrato BCPI/NBT (Sigma) sobre la membrana. MW: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIORAD).

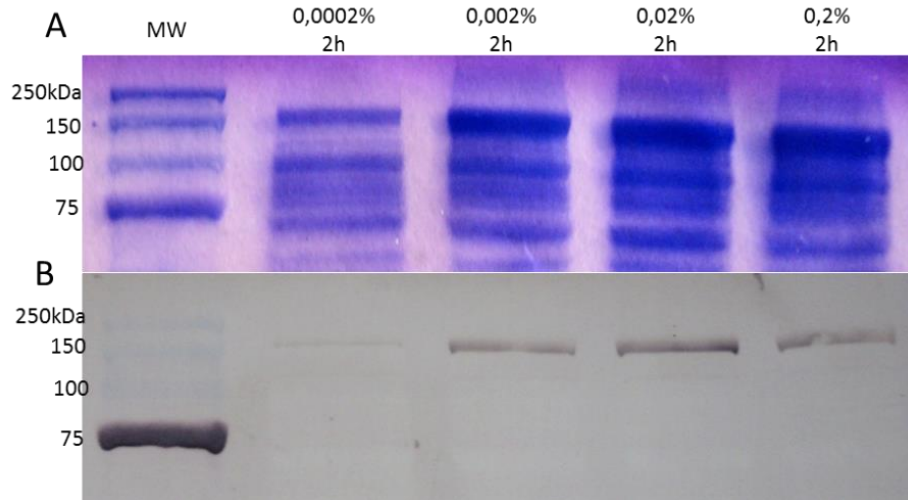


Figura 6-24. Optimización de la concentración de L-arabinosa necesaria para la inducción de la expresión de la proteína CtpH en la cepa *E. coli* TOP10 después de 2 h de inducción a 37°C. **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de los lisados celulares obtenidos para diferentes concentraciones de L-arabinosa entre 0,0002% y 0,2%. En cada carril se cargaron 60 µg de proteína total calculados como se explica en la sección 5.8.2. Una vez transcurrida la electroforesis las proteínas en el gel fueron teñidas con solución Coomassie R-250 0,1%. **B.** Immunoblot de los lisados celulares obtenidos para la inducción de la expresión con concentraciones de L-arabinosa entre 0,0002% y 0,2% a 37°C utilizando el sistema de electrotransferencia semiseca Trans-Blot SD (BIORAD) a membrana de PVDF mencionado en los materiales y métodos. Ab 1°: Monoclonal Anti-His (sc-8036), Ab 2°: Policlonal Anti ratón producido en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina (A4312). La detección cromogénica de la proteína se realizó con solución de sustrato BCPI/NBT (Sigma) sobre la membrana. MW: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIORAD).

Una vez optimizado el tiempo de inducción en donde se presentó la mayor expresión de proteína (2 h), se decidió llevar a cabo la optimización de la concentración de L-arabinosa. Se empleó un rango de concentraciones de L-arabinosa entre 0,00002 – 0,2% el cual es recomendado por el proveedor del vector y ha sido empleado exitosamente en la expresión de numerosas proteínas de membrana [Wang *et.al.* 2003]. Se encontró mediante SDS-PAGE (Figura 6-24A) que concentraciones de L-arabinosa de 0,02% y 0,2% indujeron un nivel máximo y similar de expresión, sin embargo en el inmunoblot la banda correspondiente a 0,02% de L-arabinosa presentó mayor intensidad, indicando un nivel máximo de expresión con esta concentración de inductor (Figura 6-24B). A pesar de que también se detectó expresión de proteína con 0,0002%, el nivel era significativamente bajo.

Para el caso del inmunoblot de la Figura 6-24B se utilizó el sistema de transferencia semiseca Trans-Blot SD (BIORAD), debido a que, como se mencionó anteriormente, los sistemas húmedo y seco no mostraron transferencias satisfactorias. En este caso, las bandas permitieron una mejor definición de la tendencia con respecto a las diferentes concentraciones de L-arabinosa utilizadas y mostraron una mejor intensidad que los

inmunoblots anteriormente mencionados; sin embargo la transferencia es aun menor a lo esperado de acuerdo a las intensidades de las bandas de SDS-PAGE.

Aunque ampliamente dependiente del tipo de proteína y del sistema de expresión, se ha reportado que en promedio la expresión de proteínas de membrana y proteínas periféricas ocurre a un nivel máximo entre un tiempo de 3 – 6 h de inducción a 37°C [Terpe, K., 2006]. Esto podría indicar que un tiempo de 2 h de expresión sería prematuro para lograr un nivel máximo. Como se mencionó anteriormente, la disminución de la expresión después de 2 h de inducción se podría deber a un mal plegamiento de la proteína o a la no integración de la misma en la membrana de *E. coli*. Este error en el plegamiento de la proteína podría ser causado por la diferencia de uso codónico entre *M. tuberculosis* y la bacteria de expresión *E. coli*. Varias estrategias se han reportado para la compensación de la diferencia codónica, dentro de las cuales se encuentra el uso de cepas que contienen plásmidos codificantes de tRNA's de uso poco frecuente en *E. coli*, tal como la cepa *E. coli* BL21 Rosetta2 [Lakey, D., et al., 2000; Chen, D., Tezada, D., 2006, Terpe, K., 2006].

Por lo explicado anteriormente, se llevaron a cabo los mismos ensayos de expresión a pequeña escala con la cepa *E. coli* BL21 Rosetta2. Una de las desventajas de utilizar esta cepa con el sistema de expresión seleccionado, es que presenta el metabolismo de arabinosa, es decir que parte de este carbohidrato es metabolizado por la bacteria y la otra parte se dirige hacia la inducción del promotor de pBAD para la expresión de CtpH. Sin embargo, varios estudios han reportado la expresión exitosa de proteínas utilizando los vectores pBAD en la cepa Rosetta2 [Frechin, M., et al., 2009].

En la Figura 6-25 A se muestran lisados celulares totales de Rosetta 2 obtenidos para diferentes tiempos de inducción con 0,2% de L-arabinosa, (concentración máxima recomendada por el fabricante al iniciar ensayos de expresión y además considerando que Rosetta 2 es capaz de metabolizar L-arabinosa) en donde se obtiene un aumento de la intensidad de una banda por encima de 150 kDa conforme aumenta el tiempo post-inducción, siendo constante después de 4 h. A su vez, el mayor nivel de expresión se obtuvo para 0,2% de L-arabinosa tal como se evidenció por SDS-PAGE e inmunoblot (Figura 6-25B). Los lisados de las células no inducidas muestran también una banda poco intensa en la misma posición, la cual está ausente en el inmunoblot.

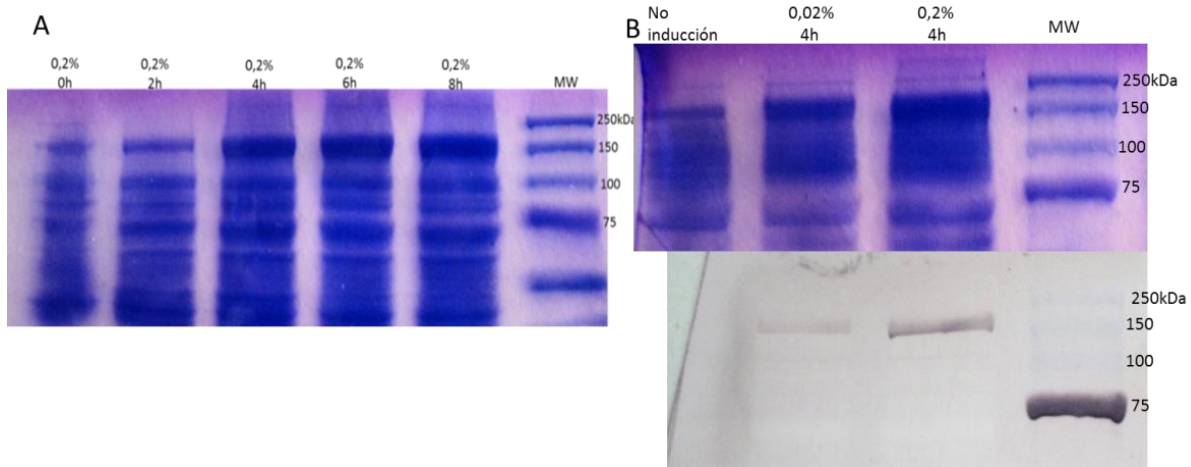


Figura 6-25. Optimización del tiempo de inducción y la concentración de L-arabinosa para la expresión de CtpH a 37°C en *E. coli* BL21 Rosetta2. **A.** Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de los lisados celulares obtenidos para diferentes tiempos de inducción bajo una concentración de L-arabinosa de 0,2% a 37°C. En cada carril se cargaron 60 µg de proteína total calculados como se explica en la sección 5.8.2. **B.** (arriba) Gel de electroforesis SDS-PAGE al 12% de los lisados celulares obtenidos para dos concentraciones de L-arabinosa 0,02% y 0,2% después de 4 h de inducción. En cada carril se cargaron 60 µg de proteína total calculados como se explica en la sección 5.8.2. Una vez terminada la electroforesis, las proteínas fueron teñidas con solución Coomassie R-250 0,1%. (abajo) Inmunoblot de los lisados celulares obtenidos para la inducción de la expresión con concentraciones de L-arabinosa 0,02% y 0,2% a 37°C utilizando el sistema 1 de electrotransferencia semiseca (BIORAD) a membrana de PVDF mencionado en los materiales y métodos. Ab 1°: Monoclonal Anti-His (sc-8036), Ab 2°: Policlonal Anti ratón producido en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina (A4312). La detección cromogénica de la proteína se realizó con solución de sustrato BCPI/NBT (Sigma) sobre la membrana. MW: Marcador de peso molecular Precision Plus Protein Standards (BIORAD).

Para el caso de la concentración de inductor, fue necesario una concentración de L-arabinosa diez veces mayor (0,2%) para lograr el máximo nivel de expresión en *E. coli* BL21 Rosetta2 comparada con la cepa *E. coli* TOP10 (0,02%). Esto se puede explicar debido a que Rosetta2 metaboliza parte de la L-arabinosa añadida, mientras que TOP10 dirige la totalidad del inductor adicionado hacia la expresión de la proteína controlada bajo el promotor *araBAD* en el recombinante H-pBAD. Aparentemente la proteína comienza a ser degradada después de 2 h de inducción en *E. coli* TOP10 con 0,02% y 0,2% de L-arabinosa, mientras que en la cepa Rosetta2 el nivel de expresión se mantiene en un nivel alto después de 4 h de inducción a una concentración de 0,2% de L-arabinosa. De hecho, al comparar las curvas de crecimiento de ambas cepas transformadas con el vector de expresión H-pBAD se observó una disminución del crecimiento después de 4 h de inducción con la cepa TOP10, mientras que la cepa Rosetta2 continua su crecimiento incluso después de 6 h de inducción, lo que indica que la expresión de la proteína podría causar estrés dentro de esta cepa debido posiblemente al aumento en la expresión de proteasas encaminadas a la degradación de la proteína mal plegada o no insertada exitosamente en la membrana [Samuelson, J., 2011] (Figura 6-26).

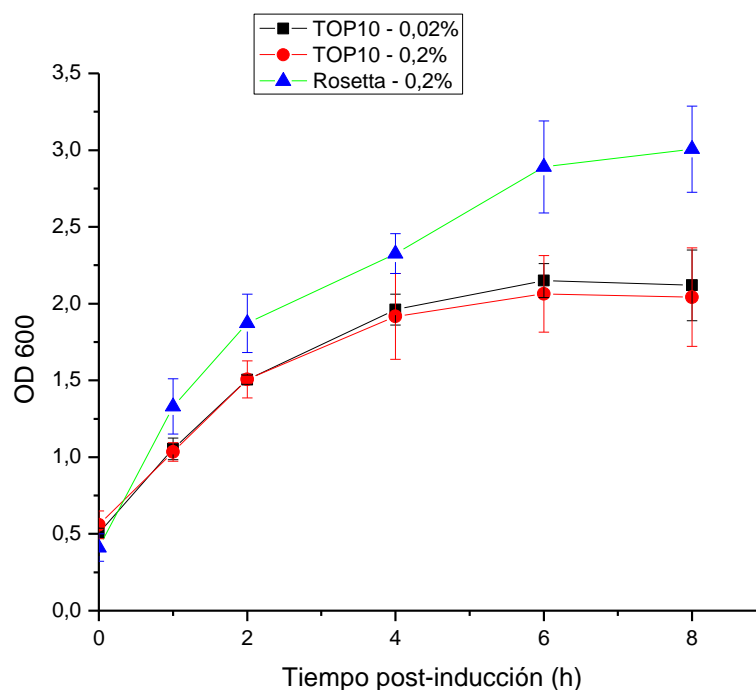


Figura 6-26. Seguimiento del crecimiento post-inducción de las cepas TOP10 y Rosetta2 de *E. coli* durante la expresión de la proteína CtpH con 0,2% de L-arabinosa. Una vez los cultivos celulares alcanzaban la fase logarítmica de crecimiento ($OD_{600} = 0,5 - 0,6$) fueron inducidos con L-arabinosa y el OD_{600} fue determinado a intervalos de 2 h post-inducción. En cada punto se hicieron medidas por triplicado, las barras de error corresponden a la desviación estándar de los datos.

Esta disminución del crecimiento en la cepa TOP10 también podría ser causada porque la falta de tRNA's de uso frecuente en *M. tuberculosis* lleve a la producción de proteínas truncadas o mutadas que pueden llegar a ser tóxicas para la célula [Sorensen, H., Mortensen, K., 2005].

En un intento por determinar si algo de la proteína CtpH podría expresarse en la membrana de *E. coli* TOP10, se indujo la expresión con 0,2% de L-arabinosa durante 2 h y se extrajeron membranas de las células sometidas a expresión según el procedimiento detallado en la sección 5.8.

La Figura 6-27 muestra el inmunoblot obtenido utilizando el anticuerpo monoclonal Anti-His (sc-8036) como anticuerpo primario y el anticuerpo policlonal Anti ratón producido en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina (A4312) como anticuerpo secundario, en las diferentes fracciones de membrana obtenidas de la expresión de CtpH en las células *E. coli* Rosetta2 y *E. coli* TOP10 transformadas con el recombinante H-pBAD. Los resultados observados sugieren que la proteína CtpH no está presente en la fracción de membrana para la proteína expresada en esta cepa TOPO 10, pero si en la cepa Rosetta2. No se muestra el gel de SDS-PAGE debido a que solo se utilizó uno para la

transferencia, ya que solo se quería detectar la proteína CtpH en las membranas de *E. coli*.

En la expresión a gran escala de CtpH en Rosetta2 se aumentó el tiempo de inducción de 4 h a 5 h para asegurar que la proteína se expresara en la membrana plasmática de *E. coli*. Esto no afecta el nivel de expresión de la proteína, ya que, como se mencionó anteriormente después de 4 h de inducción el nivel de expresión se mantuvo constante.

Como se esperaba en el sobrenadante 1 (S1), donde está la fracción citosólica de las bacterias y la membrana citoplasmática, se detectó la proteína CtpH, mientras que está ausente en la fracción soluble después de la centrifugación a alta velocidad (S2). La presencia de CtpH en el pellet 1 (P1) puede deberse a que la ruptura celular no tuvo una eficiencia del 100% y, por tanto, quedaron células no lisadas en este pellet. Finalmente, se observó que al igual que en los lisados celulares totales (LCT), hay una única banda en la fracción de la membrana citoplasmática (MF) confirmando así la inserción de la proteína CtpH en la membrana de *E. coli* BL21 Rosetta2.

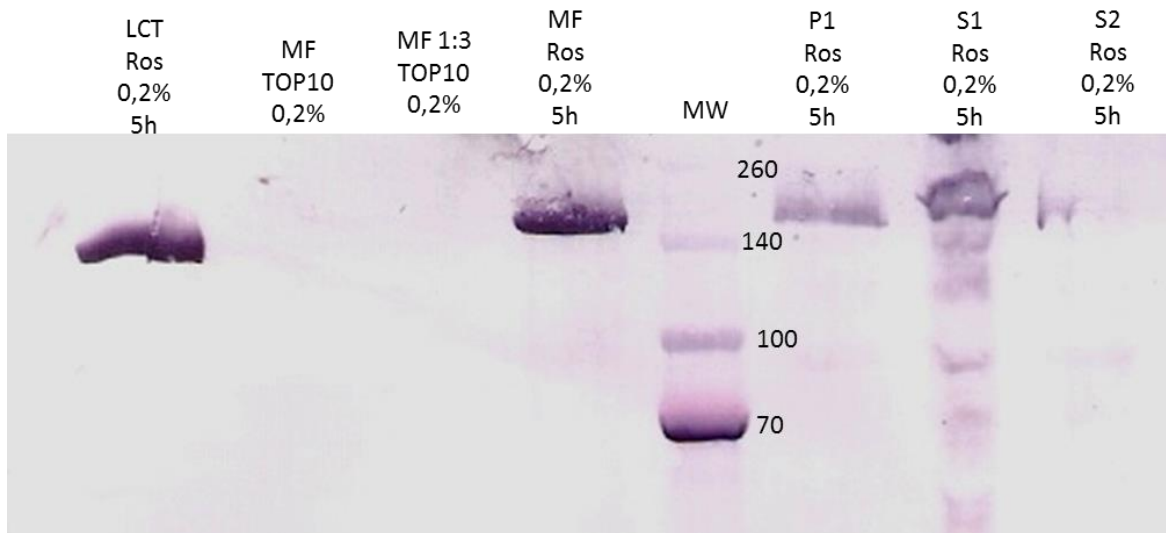


Figura 6-27. Inmunoblot en membrana de PVDF de la ubicación de la proteína CtpH en las fracciones subcelulares obtenidas de la expresión en Rosetta2 con una concentración de L-arabinosa de 0,2% durante un tiempo de 5h. Este inmunoblot se obtuvo con el sistema Trans-Blot Turbo (BIORAD) a partir de un gel de SDS-PAGE de gradiente entre 4 -12%. LCT (lisados celulares totales), MF (fragmentos de membrana), P1 (Pellet 1, células no lisadas, cuerpos de inclusión), S1 (Sobrenadante después de la primera centrifugación, membranas celulares y fracción citosólica), S2 (sobrenadante 2, fracción celular soluble). Los resultados para las fracciones obtenidas de *E. coli* Rosetta2 (Ros) se comparan con las fracciones de membrana de TOP10. Ab 1°: Monoclonal Anti-His (sc-8036), Ab 2°: Policlonal Anti ratón producido en conejo, acoplado a fosfatasa alcalina (A4312). MW: Marcador de peso molecular Spectra™ Multicolor Broad Range Protein Ladder, util para SDS-PAGE e inmunoblot. (ThermoScientific).

En esta membrana resultante del inmunoblot se observan bandas más intensas comparadas con las presentes en las membranas anteriormente mencionadas debido a

que el sistema de electrotransferencia utilizado (sistema de transferencia semiseca Trans-Blot Turbo, sección 5.8.2) contenía un programa especialmente diseñado para transferir proteínas de alto peso molecular y que difería con los demás sistemas en que permitía una corriente más alta (2.5 A). También se ha reportado mayor facilidad en la electrotransferencia de proteínas de alto peso molecular desde geles de poliacrilamida contruidos con gradientes entre el 5-20% [Moore, C., 2009].

En esta membrana de PVDF también se observa la detección del marcador de peso molecular. Esto se debió al uso del marcador Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder (ThermoScientific), el cual permite la transferencia de las bandas de colores a la membrana de PVDF y la detección de algunas de ellas sobre la misma.

6.4 Estudio preliminar de la especificidad iónica de la proteína CtpH expresada en membranas de *E. coli*.

El haber detectado que la proteína CtpH fue expresada en las membranas de *E. coli* BL21 Rosetta2, no implica necesariamente que la proteína está embebida de una manera funcional. Para comprobar esto se tiene que recurrir a estrategias experimentales que permitan concluir acerca de la integridad de la proteína a partir de su función. En este caso se sabía que la proteína es una ATPasa tipo P, es decir que transporta sustratos a través de la membrana a expensas de la hidrólisis de ATP, y que posiblemente presenta alguna especificidad hacia el transporte de iones pertenecientes al grupo de los metales alcalinos o alcalinotérreos, como Na⁺, K⁺ y/o Ca²⁺ [Novoa, et al., 2012].

Los estudios funcionales con proteínas de membrana requieren la reconstitución de las proteínas purificadas en liposomas, lo cual implica la estandarización de la solubilización con detergentes y del paso de purificación, proceso que no es trivial en todos los casos. Sin embargo, la funcionalidad de este tipo de proteínas también puede estudiarse estando embebidas en las membranas en donde fueron heterológicamente expresadas, en este caso membranas de *E. coli*. Los ensayos funcionales en vesículas de membranas nativas tienen la ventaja de ser una evaluación rápida del correcto plegamiento y la funcionalidad en un ambiente similar al nativo. No obstante, la validez de los resultados con este sistema depende de la disponibilidad de un control. En este caso los ensayos funcionales deben realizarse en las vesículas de membrana obtenidas de la misma bacteria antes de haber sido sometida a inducción de la expresión, siendo éste el control [Wang, D., 2003]. Han sido varios los estudios en donde se han caracterizado proteínas de membrana, específicamente proteínas transportadoras, embebidas en vesículas de membranas nativas. Dentro de estos estudios se destacan ensayos de transporte y actividad ATPasa en vesículas de membrana de bacterias como *Enterococcus hirae* [Solioz, M., Odermatt, A., 1995], *Bacillus sp.* [Kitada, M., Horikoshi, K., 1992], *Flavobacterium odoratum* [Gambel, A., 1992] y eucariotas [Okorokov, L., et al., 1993; Osses, L., Godoy, C., 2006], así como medidas electrofisiológicas con vesículas nativas adheridas a bicapas lipídicas artificiales para la caracterización de Ca²⁺- y Na⁺/K⁺-

ATPasas tipo P de eucariotas [Tadini-Buoninsegni, F., et al., 2006; Hartung, K., et al., 1997; Seifert, K., et al., 1993; Bartolommei, G., et al., 2009].

Al realizar ensayos funcionales en vesículas de membrana es necesario tener en cuenta que a partir de los procedimientos de lisis celular y centrifugación diferencial se puede obtener una mezcla de dos tipos de poblaciones de vesículas de acuerdo a la orientación de los lados intra y extracelular: *inside-out* (ISO) en el caso de que el lado citoplasmático (intracelular) quede hacia fuera de la vesícula (Fig. 6-28A) y *right-side-out* (RSO) si queda dentro de la vesícula (Fig 6-28B).

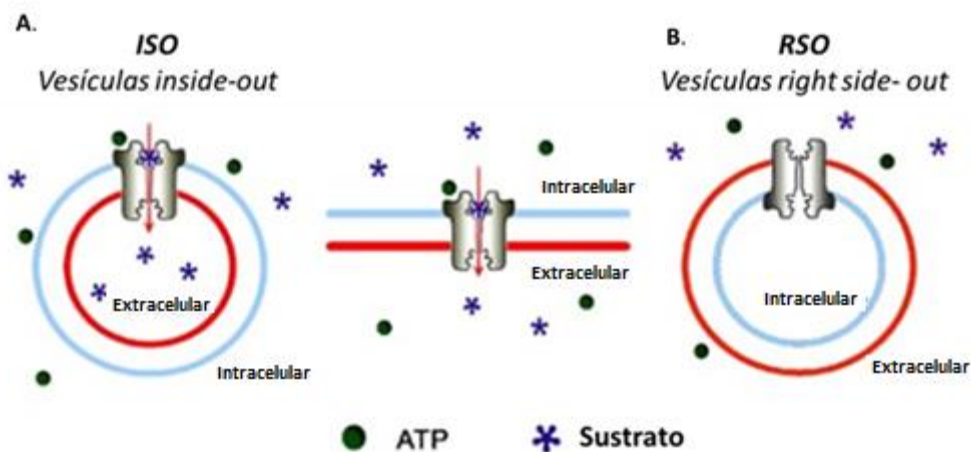


Figura 6-28. Orientación de las vesículas de membrana obtenidas después de la lisis celular y la centrifugación diferencial de las células de *E. coli* sometidas a inducción de la expresión de la proteína CtpH. La orientación *inside-out* (ISO) representa el caso en el que el lado intracelular (citoplasmático) queda fuera de la vesícula, mientras que la orientación *right-side-out* representa el caso en el que el lado citoplasmático queda dentro, de la misma manera que en la célula. En las vesículas ISO el dominio de unión a ATP (círculos verdes) de la ATPasa tipo P queda hacia afuera de la vesícula, permitiendo su unión y la activación del transporte del sustrato (asteriscos). Las ATPasas ubicadas en vesículas RSO no serán activadas [Modificado de Glavinas, H., et al., 2008].

Como se observa en la Figura 6-28, solo las vesículas ISO tienen la ATPasa tipo P orientada de tal manera que el sitio de unión al ATP está disponible fuera de la vesícula; esto significa que la actividad ATPasa y la corriente generada por el transporte de carga solo podrán ser determinados en este tipo de vesículas. En las vesículas RSO no habrá transporte de iones mediado por ATPasas tipo P, ya que el ATP no puede atravesar la membrana citoplasmática [Lauger, P., 1991]. Estudios anteriores basados en microscopía electrónica han permitido determinar que la distribución de las dos poblaciones de vesículas, obtenidas a partir de métodos mecánicos de lisis de *E. coli*, es asimétrica: 60-80% de las vesículas están en la orientación ISO [Altendorf, K., Staehelin, L., 1974].

Teniendo en cuenta lo anterior se evaluó la estimulación de la actividad ATPasa de las vesículas de membrana de *E. coli* conteniendo la proteína CtpH, frente a concentraciones

fisiológicas de diferentes cationes y se comparó tal actividad con las membranas de la misma cepa de *E. coli* que no fue sometida a expresión (control). Ambas cepas son muy semejantes ya que están transformadas con el mismo recombinante de expresión, la única diferencia será debida a la inducción de la expresión de la proteína CtpH con L-arabinosa. Además se midieron las corrientes generadas por el transporte de iones, activado por un salto en la concentración de ATP en el montaje SSM.

6.4.1 Estimulación de la actividad ATPasa en vesículas de membrana que contienen la proteína CtpH.

En el ensayo de actividad ATPasa se cuantifica el fosfato (PO_4^{3-} ó P_i) liberado durante el ciclo catalítico de la ATPasa tipo P. De acuerdo al mecanismo explicado en la sección 2.7.2, la autofosforilación del residuo de ácido aspártico conservado solo ocurre si el ion específico de la ATPasa tipo P se une a su sitio de unión dentro del dominio transmembranal. El residuo de ácido aspártico permanece fosforilado hasta que el ion es liberado al otro lado de la membrana; después de este paso, se hidroliza del enlace aspartil-fosfato, dando lugar al cambio conformacional de la ATPasa hacia su estado inicial y a la liberación del fosfato. De esta manera, se puede decir que solo se libera fosfato cuando la ATPasa tipo P ha logrado transportar iones a través de la membrana, lo cual permite asociar la actividad ATPasa con el transporte específico de iones. Por lo anterior, una manera indirecta de determinar la especificidad de la ATPasa expresada en membranas de *E. coli* es evaluando frente a cuales iones se estimula en mayor proporción la actividad ATPasa, es decir, se produce mayor cantidad de P_i .

El fosfato liberado se cuantificó siguiendo la metodología modificada de Lanzetta et al., (1979), en el que el fosfato reacciona con el molibdato en medio ácido para generar ácido fosfomolibdico el cual forma un complejo estable con el verde malaquita que puede ser leído entre 600 y 700 nm, siendo 640 – 660 nm los valores mas comúnmente utilizados [Zuck, P., et al., 2005] (Figura 6-29).

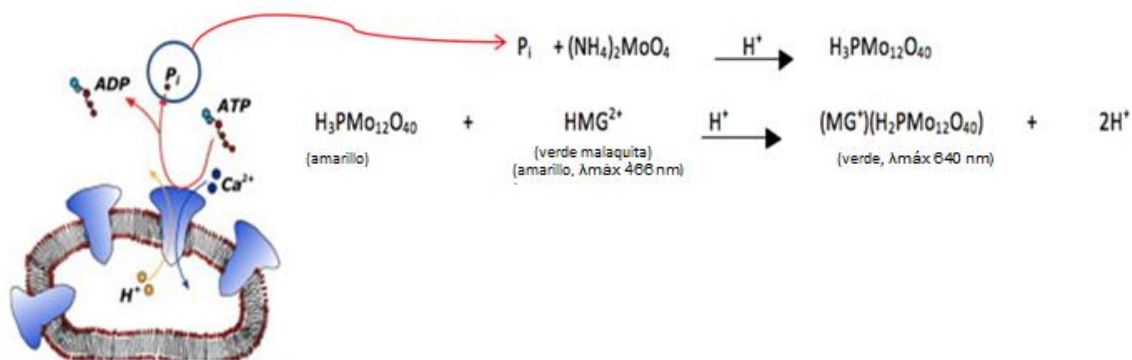


Figura 6-29. Fundamento de la determinación de la actividad ATPasa mediante la cuantificación del fosfato liberado durante el ciclo catalítico de la ATPasa tipo P en el transporte de $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^+$. El

fosfato liberado (Pi) se cuantifica mediante el método modificado de Lanzetta., et al (1970) en el que el ácido fosfomolibdico ($H_3PMo_{12}O_{40}$), formado por la reacción entre el molibdato de amonio ($(NH_4)_2MoO_4$) y el fosfato liberado, forma un complejo soluble estable con el verde malaquita (HMG^{2+}) que puede ser leído espectrofotométricamente a 640nm [Modificado de <http://bitesizebio.com/articles/ask-a-chemist-how-colorimetric-assays-work/> Fecha de consulta: 12/11/2013]

La estimulación de la actividad ATPasa específica de cada ion probado se llevó a cabo sobre vesículas de membrana plasmática de *E. coli* Rosetta2 que contenían la proteína CtpH expresada (vesículas de membrana CtpH) y tal actividad se comparó con la actividad obtenida para las vesículas de membrana de la misma bacteria que no fue sometida a inducción de la expresión con L-arabinosa (control). Los iones utilizados para la estimulación de la actividad ATPasa específica fueron cationes metálicos pertenecientes al grupo de los metales alcalinos y alcalinotérreos en concentraciones fisiológicas, ya que los estudios previos indicaban que CtpH presentaba especificidad hacia este tipo de iones [Novoa, L., et al., 2012]. La Figura 6-30 muestra los resultados de los ensayos de actividad ATPasa.

La actividad basal indica la estimulación debida a la presencia de Mg^{2+} el cual es un cofactor de las ATPasas tipo P y que, por tanto, debe estar presente en todos los ensayos. En las membranas de *E. coli* se espera la estimulación de esta actividad debido a la presencia de una Mg^{2+} ATPasa tipo P (MgtA) en su membrana [TransportDB http://www.membranetransport.org/other_family.php?fFID=P-ATPase&oOID=ecol1].

Como se esperaba, esta actividad basal es similar tanto para las vesículas de membrana CtpH como para las vesículas control, lo que indica que el ion Mg^{2+} no es un sustrato para la proteína CtpH.

Como se observa en la Figura 6-30 la estimulación de las vesículas control (barras verdes) con concentraciones fisiológicas de diferentes iones mostró actividades ATPasa específicas de una magnitud muy similar a la actividad ATPasa basal. Para el caso del tratamiento con K^+ y Na^+/K^+ se presentó una estimulación ligeramente mayor con respecto a la actividad basal debida posiblemente a la presencia de una ATPasa tipo P multimerica transportadora de K^+ en *E. coli* (KdpB), sin embargo esta diferencia es poco significativa.

Entre las vesículas de membrana CtpH y las vesículas control se presentaron diferencias significativas para el caso de las actividades específicas estimuladas por K^+ (40 mM) y Ca^{2+} (30 μ M) ($0,48\pm 0,14$ y $0,33\pm 0,11$ μ mol Pi/mg proteína*min, respectivamente), mientras que se obtuvo una diferencia altamente significativa ($0,99\pm 0,08$ μ mol Pi/mg proteína*min) para el caso de estimulación con Na^+ (130 mM) y K^+ (40 mM) simultáneamente en el mismo ensayo. Estos valores de actividad ATPasa están en el mismo orden de magnitud que los reportados en estudios anteriores para Ca^{2+} ATPasas tipo P de la bacteria *Flavobacterium odoratum* (0,35-0,50 μ mol Pi/mg proteína*min para 20 μ M de Ca^{2+}) [Gambel, A., et al., 1992], y para $Na^+ K^+$ ATPasas tipo P de eucariotas (0,40 – 0,60 μ mol Pi/mg proteína*min) [Kent, M., et al., 2004].

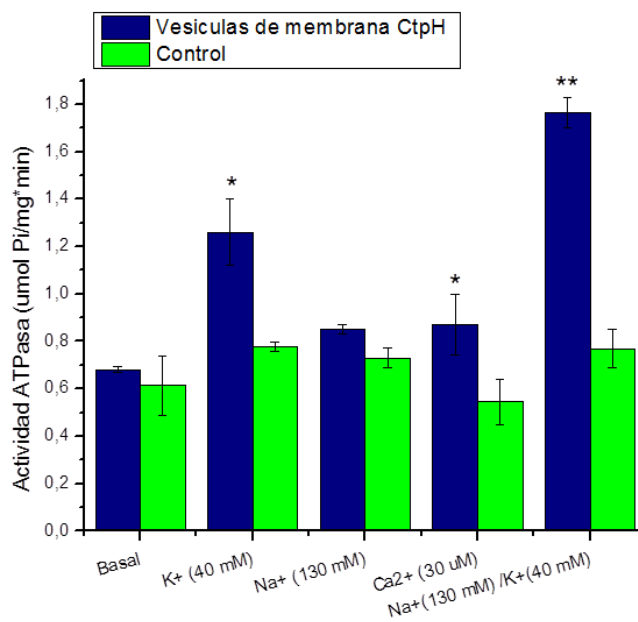


Figura 6-30. Estimulación de la actividad ATPasa con concentraciones fisiológicas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 que expresaron la proteína CtpH (barras azules). Como control se utilizaron las vesículas de membrana de la misma cepa no sometida a expresión (barras verdes). La determinación de la actividad ATPasa específica se llevó a cabo mediante el método de verde malaquita (modificado de Lanzetta, 1979) probando concentraciones fisiológicas de cationes K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Na^+/K^+ en ensayos individuales. Las medidas se realizaron por triplicado. La actividad ATPasa se expresó como $\mu\text{mol de Pi/mg proteína}\cdot\text{min}$. Se evaluó la significancia de la diferencia entre los valores mediante la prueba T de student. Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como un indicativo de una diferencia estadísticamente significativa (*) y $p < 0,01$ constituyó una diferencia altamente significativa (**).

Lo anterior indica que la proteína CtpH expresada en *E. coli* Rosetta2 probablemente transporta iones Na^+ y K^+ tal como lo haría una Na^+/K^+ ATPasa tipo P. Sin embargo, podría aparentemente transportar iones K^+ y Ca^{2+} en una proporción menor. El reemplazo de iones K^+ por cualquier otro ion monovalente en Na^+/K^+ ATPasas tipo P ha sido reportado, pero no existen estudios que indiquen el transporte de solo iones K^+ por parte de esta clase de bombas [Toyoshima, C., et al., 2011]. Contrariamente, el transporte de iones Ca^{2+} por parte de Na^+/K^+ ATPasas o viceversa ha sido bien documentado, gracias a una alta conservación de los sitios de unión al ión en el dominio transmembranal.

Por otra parte se realizaron ensayos de actividad ATPasa en presencia de iones vanadato (VO_4^{3-}), los cuales son inhibidores de las ATPasas tipo P. Se ha estudiado poco acerca del mecanismo de inhibición por parte de este anión, sin embargo debido a que su estructura es muy similar a la del anión fosfato (Figura 6-31), se ha planteado que puede ocupar el sitio de fosforilación impidiendo la hidrólisis del ATP y, por tanto, el transporte de iones mediado por la ATPasa tipo P. Se ha sugerido que el vanadato unido a la enzima asume una estructura bipiramidal trigonal análoga al estado de transición que

se forma durante la hidrólisis de la fosfoenzima y estabiliza la conformación E2 de la enzima [Lauger, P., 1991].

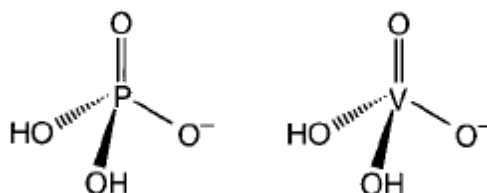


Figura 6-31. Comparación de las estructuras adoptadas por los iones fosfato y vanadato. En el estado de oxidación +5 el vanadato adopta una estructura tetrahedrica similar a la del fosfato [Tomado de Huyer, G., et al., 1997]

Estos ensayos de inhibición se llevaron a cabo con las vesículas de membrana CtpH con una concentración de vanadato de 50 μM como se ha reportado anteriormente ya que las ATPasas son inhibidas por cantidades micromolares de este anión [Gambel A. et.al 1992] y los resultados se muestran en la Figura 6-32.

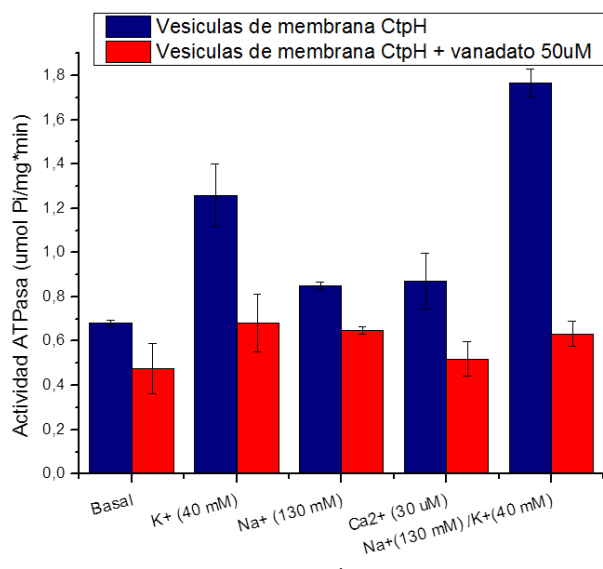


Figura 6-32. Estimulación de la actividad ATPasa con concentraciones fisiológicas de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} en vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 que expresaron la proteína CtpH en ausencia (barras azules) y en presencia de $(\text{NH}_4)_3\text{VO}_4$ 50 μM (barras rojas). La determinación de la actividad ATPasa específica se llevó a cabo mediante el método de verde malaquita (modificado de Lanzetta, 1979) probando concentraciones fisiológicas de cationes K^+ , Na^+ , Ca^{2+} y Na^+/K^+ en ensayos individuales. Las medidas se realizaron por triplicado. La actividad ATPasa se expresó como μmol de Pi/mg proteína*min.

La disminución de la actividad ATPasa en presencia de vanadato llevó a valores muy similares entre si para los diferentes ensayos con iones (barras rojas), y a su vez, similares a los de la actividad ATPasa basal ($0,68 \pm 0,02 \mu\text{mol Pi}/\text{mg} \cdot \text{min}$). Se presentó

una inhibición de la actividad ATPasa basal de aproximadamente $0,20 \pm 0,08 \mu\text{mol Pi/mg} \cdot \text{min}$, correspondiendo este valor a la actividad debida a la ATPasa tipo P transportadora de Mg^{2+} (MgtA) de *E. coli* (Kuhlbrandt, W., 2004). Una inhibición de la misma magnitud fue registrada para el caso de tratamiento con Na^+ (130 mM). La actividad remanente (la actividad todavía detectada) en estos casos podría ser debida a otro tipo de proteínas generadoras de fosfato y no inhibidas por vanadato presentes en la membrana de *E. coli* como ATPasas tipo ABC o algunas fosfatasas ancladas a la membrana. También se ha reportado una actividad ATPasa remanente estimulada por cationes metálicos divalentes, debida a la activación de la proteína SecA la cual transporta proteínas mediante la hidrólisis de ATP en *E. coli*; esta actividad es baja en ausencia de proteínas para transportar [Kim, J., et al., 2001].

Para el caso de los iones que estimularon significativamente la actividad ATPasa de las vesículas de membrana CtpH con respecto al control (K^+ , Ca^{2+} y Na^+/K^+) se obtuvo una disminución hasta niveles basales, confirmando que tal actividad es debida al transporte de los iones mencionados por la ATPasa tipo P (CtpH) expresada en la membrana de *E. coli* Rosetta2.

6.4.2 Medidas electrofisiológicas en SSM

Otra forma de verificar la especificidad iónica de la proteína expresada consiste en la medición del transporte iónico a través de la vesícula de membrana plasmática, lo cual es posible utilizando la técnica de membranas soportadas en sólido (SSM). En esta técnica las vesículas de membrana se adhieren a una bicapa lipídica artificial soportada en un electrodo de oro y el transporte a través de la vesícula, mediado por la ATPasa, se detecta a través del acoplamiento capacitivo, es decir mediante la capacitancia de la bicapa planar. La alteración en la capacitancia de la bicapa planar lleva a la generación de una corriente compensatoria por parte del circuito externo, la cual se puede asociar con el proceso de translocación de carga que dió lugar a la alteración de la capacitancia.

En esta técnica las medidas se realizan en condiciones de circuito corto y se emplean dos electrodos: el electrodo de oro y el electrodo de referencia de Ag/AgCl. El electrodo de oro registra los cambios en la capacitancia mientras que el electrodo de referencia genera los electrones que compensan la alteración en la capacitancia de la bicapa planar. La corriente pico es una amplitud de corriente es registrada justo cuando el sustrato alcanza el sitio de unión y se inicia el transporte, en este punto la membrana no ha construido un voltaje significativo que pueda afectar las propiedades cinéticas de la enzima activada [Schulz, P., et al., 2008].

Las señales de corriente registradas pueden dar información acerca de la orientación del transporte en la membrana. Cuando ocurre un transporte neto de carga positiva hacia el interior de la vesícula adsorbida en la SSM se registran señales positivas, mientras que cuando el transporte neto de carga positiva se da en la dirección contraria, la señal es negativa (Figura 6-33). Debido a que solo se activan las vesículas que contienen el lado

citoplasmático hacia afuera (inside-out), una señal positiva en realidad indica un proceso de transferencia de carga hacia afuera de la célula es decir hacia el interior de la vesícula.

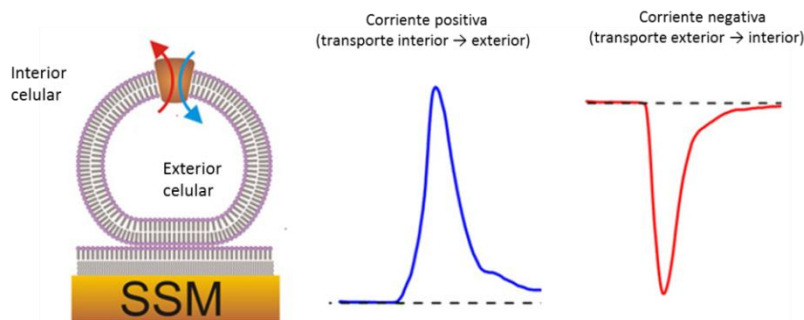


Figura 6-33. Tipos de señales registradas en SSM dependiendo de la dirección del transporte de carga neto en vesículas de membrana adsorbidas sobre la bicapa lipídica artificial. Señales de corriente positivas (azul) indican un transporte neto de carga positiva hacia el interior de la vesícula, es decir hacia el exterior celular. Señales de corriente negativas (rojo) indican un transporte neto de carga positiva hacia fuera de la vesícula, es decir hacia el interior celular (Modificado de Mager *et. al.*, 2011).

Una vez la bicapa lipídica planar se ha ensamblado sobre el soporte de oro, formando la SSM, y sin haber adicionado las vesículas de membrana, se determinan los parámetros de la bicapa (conductancia y capacitancia), con esto se busca determinar si la membrana artificial formada es adecuada, así, la capacitancia indica el espesor de la bicapa y la conductancia indicaría la presencia o no de poros que puedan causar corrientes de fuga. Luego, se miden los artefactos, los cuales son señales no correspondientes al transporte de carga, sino que surgen en algunos casos por la activación mecánica de las válvulas o por el cambio de soluciones. También se pueden presentar en el caso de que las soluciones A y NA difieran significativamente en cuanto a fuerza iónica ya que las señales obtenidas se pueden confundir con verdaderos procesos de transporte en las vesículas. Entre más similares sean las soluciones A y NA los artefactos serán más pequeños o incluso indetectables. Tales artefactos se miden a través de un protocolo de intercambio simple de soluciones, como se explica enseguida.

La Figura 6-34 muestra los resultados de la aplicación de soluciones A (Mg^{2+} 2mM + ATP) y NA (Mg^{2+} 2mM) a la SSM para la determinación de artefactos. Se observa que aparecen señales después de los primeros 500 ms, que es el tiempo durante el cual la solución NA pasa a través de la SSM. Estas señales no tienen una forma definida y permanecen hasta 550 ms. Este lapso de 50 ms es el tiempo en que se demora en llegar la solución A hasta la SSM una vez ha sido accionada la válvula de inyección de esta solución; por lo que las señales de posible transporte se observarán inmediatamente después de los 550 ms. Según esto los artefactos son mínimos indicando que las soluciones fueron adecuadamente preparadas para detectar una señal debida a un transporte de carga a través de la vesícula de membrana. En algunas ocasiones se pueden presentar artefactos después de los 550 ms que deben ser restados de las

señales posteriores cuando se mide el transporte en vesículas adsorbidas. Una vez haya fluido durante 500 ms la solución A, se retorna a la solución NA y en ese momento de nuevo aparecen artefactos debidos al cambio de soluciones (1000 ms)

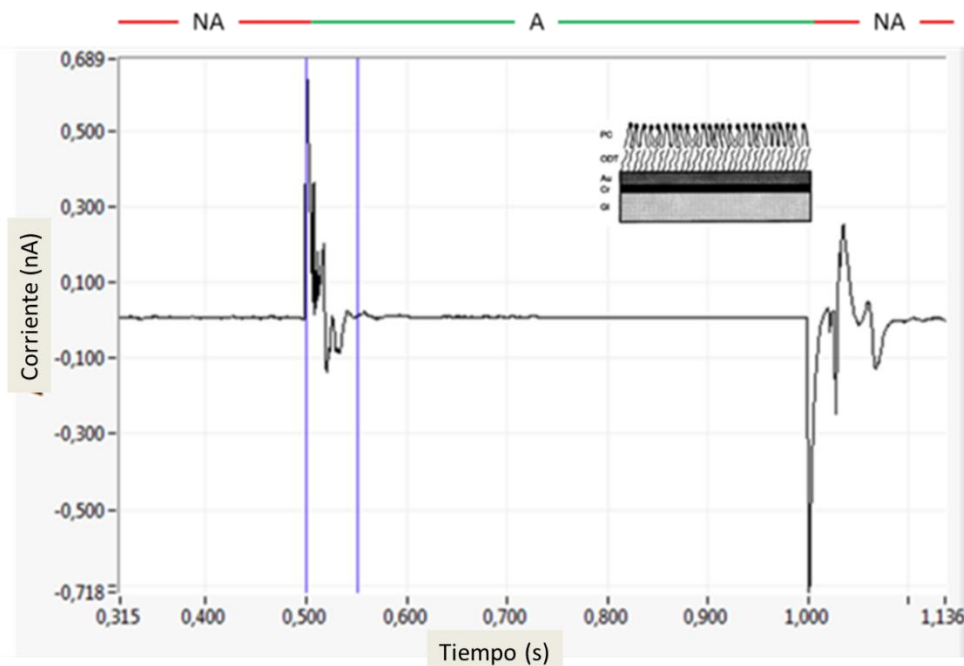


Figura 6-34. Medición de artefactos sobre la SSM con un protocolo de intercambio simple de soluciones. A: Mg^{2+} (2mM), NA: Mg^{2+} (2mM) + ATP (300 μ M). Durante los primeros 500 ms fluye solución NA a través de la SSM, entre 500 y 550 ms se tienen los artefactos producidos por el cambio de soluciones. Después de 550 ms la solución A ha alcanzado completamente la SSM. Entre 550 y 1000 ms fluye solución A a través de la SSM. En 1000 ms ocurre el cambio de solución A a solución NA. En el interior de la gráfica se presenta el esquema de la SSM sobre la cual se realizaron estas medidas de artefactos. La gráfica obtenida fue el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

Después de haber comprobado la calidad de la membrana y que no se producían artefactos considerables con todo el conjunto de soluciones A y NA para los diferentes iones a probar, se adicionaron las vesículas de membrana y se permitió su adhesión a la SSM.

Las medidas electrofisiológicas se realizaron sobre la membrana compuesta constituida por las vesículas de membrana de *E. coli* Rosetta2 que contienen expresada la proteína CtpH (vesículas CtpH) y sobre la membrana compuesta en la que se adsorbieron las vesículas de la misma cepa de *E. coli* que no fueron sometidas a inducción (control). De esta manera una señal eléctrica presente en las vesículas CtpH pero ausente en las vesículas control puede asociarse al transporte mediado por la proteína CtpH expresada.

Hay dos maneras de llevar a cabo las medidas aplicadas a la caracterización de ATPasas tipo P. (i) *Salto en la concentración del ion*, en la cual el ion presumiblemente

transportado por la ATPasa está solo presente en la solución activadora, mientras que el ATP está en la solución activadora y en la no activadora, de tal manera que la señal obtenida será debida al transporte del ion presente en la solución activadora, (ii) *Salto en la concentración de ATP*, en el cual el ATP está solo presente en la solución activadora mientras que el ion está en las dos soluciones de tal manera que la señal obtenida será debida al transporte del ion presente en las dos soluciones, pero solo aquel que ha sido desencadenado por la hidrólisis de ATP. Para el caso del estudio en vesículas de membrana nativas, la mejor opción es utilizar un protocolo de salto en la concentración de ATP debido a que solo se llevará a cabo el transporte mediado por aquellas proteínas que puedan activarse con ATP, específicamente ATPasas tipo P. Si se utilizara un salto en la concentración del ion podrían presentarse señales eléctricas debidas al transporte mediado por transportadores secundarios o canales que pueden sobrelapar las señales debidas a la ATPasa expresada.

En la Figura 6-35 se observa la comparación entre los dos métodos de medición para el caso de estimulación con K^+ . La gráfica A muestra el salto en la concentración de ATP, en donde después de 550 ms se observa una señal negativa de -250 pA indicando el transporte de carga positiva hacia afuera de la vesícula de membrana (es decir hacia el lado citoplasmático), lo cual concuerda con la función del sistema Kdp de transportar potasio hacia adentro de la célula. Sin embargo en la gráfica B el salto en la concentración de K^+ presenta una señal completamente diferente, de carácter positivo y de una magnitud de 729 pA, debida posiblemente a alguno de los sistemas de eflujo de K^+ presentes en *E. coli* [Radchenko, M., et al., 2006]. Esta última señal posiblemente contrarresta la señal generada por el transporte de K^+ mediado por el sistema Kdp haciéndola indetectable. Esto ocurre debido a que la velocidad con la que este tipo de transportadores secundarios ejerce su función es más alta que la velocidad con la que las ATPasas tipo P transportan sus sustratos. Así, es recomendable trabajar en la forma de saltos de concentración de ATP especialmente cuando se hacen medidas con membranas nativas, donde también los saltos de concentración de iones pueden generar artefactos debidos a la alteración de la capacitancia de la membrana compuesta, que pueden confundirse con señales positivas.

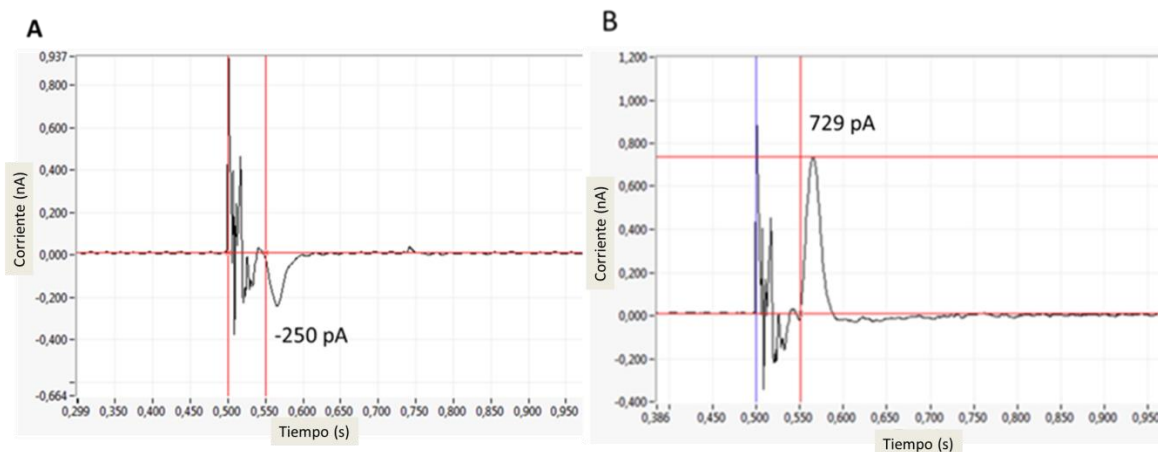


Figura 6-35. Comparación de las corrientes transitorias generadas mediante dos protocolos de intercambio de soluciones diferentes en las medidas electrofisiológicas sobre vesículas control adheridas a la SSM. **A.** Salto en la concentración de ATP. Solución A: 300 μM ATP + 50mM de KCl y 80mM de cloruro de colina, Solución NA: 50mM de KCl y 80mM de cloruro de colina. **B.** Salto la concentración de K^+ . Solución A: 300 μM ATP + 50mM de KCl y 80mM de cloruro de colina, Solución NA: 300 μM ATP + 130 mM de cloruro de colina. Las gráficas obtenida fueron el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

De la misma manera que en los ensayos de actividad ATPasa, se registra una señal debida a la estimulación de la vesícula de membrana CtpH con Mg^{2+} ya que es un cofactor cuya presencia es indispensable para el funcionamiento de la ATPasa. La Figura 6-36A muestra una señal positiva de una magnitud baja (52 pA) comparada con los valores que se han obtenido en otros estudios para el transporte mediado por ATPasas tipo P (100 – 600 pA) utilizando técnicas de bicapas lipídicas planares [Tadini-Buoninsegni, F., et al., 2008]. Esta baja magnitud de la señal se debe a que en estas medidas el Mg^{2+} es utilizado en una concentración pequeña (2 mM) y a que solo una parte de los iones es transportada por la ATPasa tipo P de Mg^{2+} (MgtA) [TransportDB http://www.membranetransport.org/other_family.php?fID=P-ATPase&oOID=ecol1]. Una señal de una magnitud similar se obtuvo para las vesículas CtpH confirmando que el Mg^{2+} no es un sustrato para esta ATPasa.

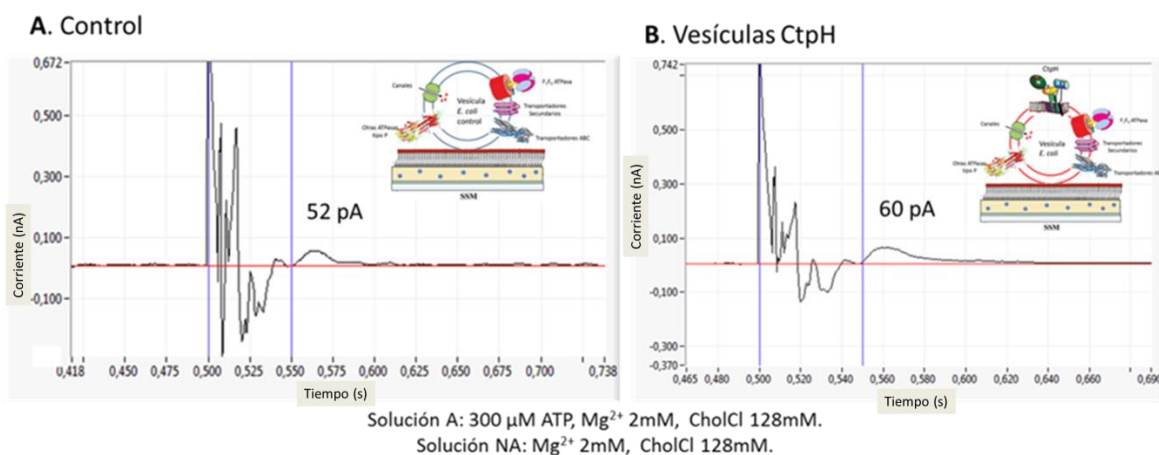


Figura 6-36. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 2 mM de MgCl_2 y 128 mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza iónica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control (**A**) y con vesículas que expresaron la proteína CtpH (**B**) adheridas a la SSM. Se aplicó un protocolo de intercambio simple de soluciones para Mg^{2+} (basal) según la tabla 5-5 (sección 5.6.2.3). Las señales debidas al transporte de carga a través de la vesícula se observan inmediatamente después de los 550 ms. Las gráficas obtenidas fueron el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

La Figura 6-37 muestra el salto en la concentración de ATP en presencia de los iones Na^+ y K^+ , tanto para las vesículas control como para las vesículas CtpH. En el caso de

las vesículas control (Fig 6-37A) se obtiene una señal similar a la registrada para el transporte de Mg^{2+} en las vesículas control y CtpH, indicando que no hay transporte simultáneo de iones Na^+ y K^+ activado por ATP en estas vesículas. Por otro lado, se produjo una señal de tipo bifásica para el caso de las vesículas CtpH (Figura 6-37B). Esta señal consta de un componente positivo rápido y un componente negativo que presenta un incremento lento. Este tipo de comportamiento se ha reportado con anterioridad para estudios con la misma técnica en Na^+/K^+ ATPasas tipo P embebidas en fragmentos de membrana [Pintschovius, J., Fendler, K., 1999].

El componente positivo presenta una magnitud más grande (153 pA) que el componente negativo (44 pA), lo que indica un transporte neto de carga positiva hacia la SSM, es decir hacia el interior de la vesícula (lado extracitoplasmático). Esto concuerda con la función y el mecanismo de una Na^+/K^+ ATPasa tipo P que transporta 3 Na^+ hacia fuera y 2 K^+ hacia dentro de la célula, constituyendo así una translocación neta de una carga positiva hacia el exterior celular. De esta manera la proteína CtpH expresada en vesículas podría presentar una especificidad hacia iones Na^+ y K^+ como lo sugirieron los ensayos de actividad ATPasa tipo P. El componente negativo de esta señal bifásica está indicando que inmediatamente después del transporte de carga positiva hacia el exterior celular, (asociado probablemente con la función de la ATPasas CtpH), ocurre una translocación de carga positiva hacia el interior celular, lo cual podría significar el acoplamiento entre el funcionamiento de CtpH y otro tipo de transportador presente en la membrana de *E. coli*. Es necesario recordar que la función principal de la Na^+/K^+ ATPasa tipo P en eucariotas es el mantenimiento de los gradientes de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana, los cuales pueden ser utilizados por otros sistemas de transporte secundarios para la translocación de otros iones o nutrientes [Bublitz, M., et al., 2011] de tal manera que los dos tipos de transporte están acoplados (Figura 6-38). Esto mismo podría estar ocurriendo en la membrana de *E. coli*, ya que se conoce que existen numerosos sistemas de transporte secundarios dependientes de los gradientes de Na^+ o K^+ . Teniendo en cuenta la composición del sistema en las medidas, posibles candidatos para este tipo de transporte podrían ser NhaA o NhaB (antiporter Na^+/H^+), Trk (simporter H^+/K^+ , encargado de la toma de iones K^+), YjcE (antiporter Na^+/H^+ encargado de la toma de iones Na^+) o el sistema simporter de transporte de colina y Na^+ hacia el interior celular, todos presentes en *E. coli* [TransportDB, <http://www.membranetransport.org/>; TCDB, <http://www.tcdb.org/superfamily.php>].

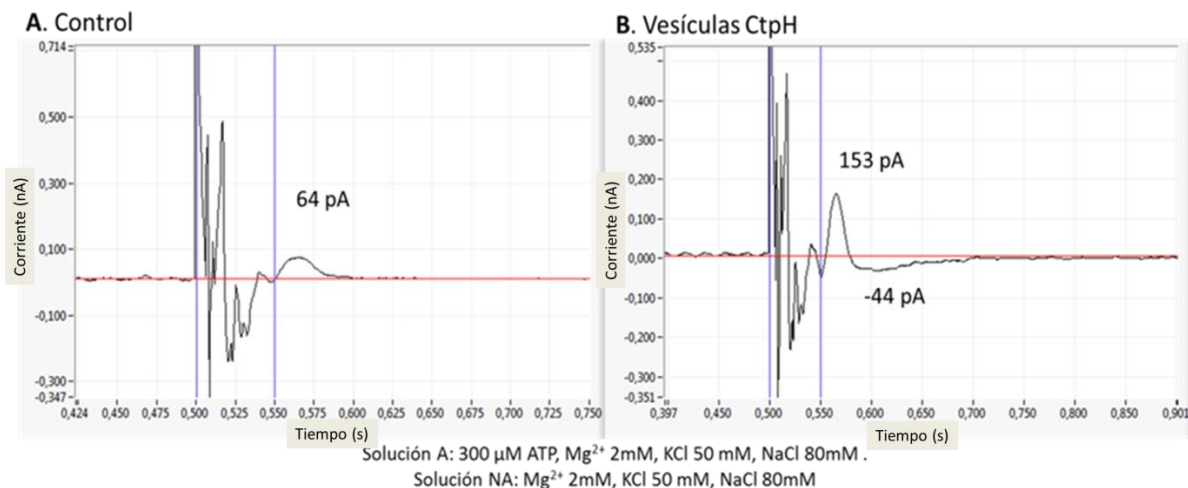


Figura 6-37. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 50 mM de KCl y 80 mM de NaCl. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control (A) y con aquellas que expresaron la proteína CtpH (B) adheridas a la SSM. Se aplicó un protocolo de intercambio simple de soluciones para Na^+/K^+ según la tabla 5-5 (sección 5.6.2.3) Las señales debidas al transporte de carga a través de la vesícula se observan inmediatamente después de los 550 ms. Las gráficas obtenidas fueron el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

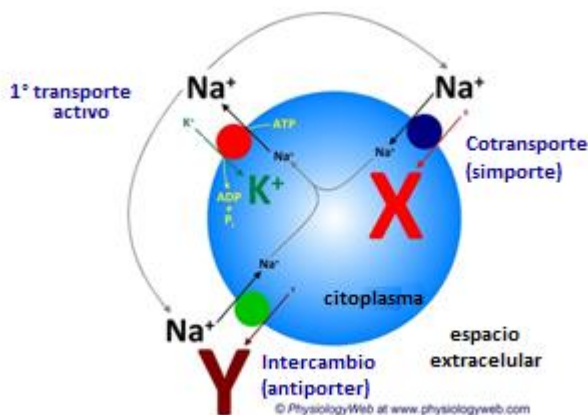


Figura 6-38. Acoplamiento entre dos tipos comunes de transporte presentes en células eucariotas: transporte activo primario y transporte activo secundario. La Na^+/K^+ ATPasa tipo P se encarga del mantenimiento de los gradientes de iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. El gradiente de iones Na^+ puede ser aprovechado por dos tipos distintos de transportadores activos secundarios (antiporter o simporte) para llevar a cabo la translocación o el eflujo de nutrientes y/o iones a través de la membrana. X y Y representan sustratos de los transportadores, como iones o nutrientes [Modificado de Physiology Web, http://www.physiologyweb.com/lecture_notes/membrane_transport/secondary_active_transport.html].

Para determinar si se podría generar una señal de corriente debida al transporte solo de iones Na^+ en ausencia de K^+ se llevó a cabo el protocolo de intercambio simple de

soluciones reemplazando los iones K^+ por cloruro de colina, para mantener la fuerza iónica constante y, así, poder comparar los datos con los generados para Na^+ y K^+ . Es evidente a partir de la Figura 6-39 que la ATPasa tipo P CtpH expresada en las membranas de *E. coli* no transporta iones Na^+ en ausencia de iones K^+ , debido a que en las vesículas expresando CtpH (Fig. 6-39B) se obtuvo una señal pequeña similar a la obtenida para el control (Fig. 6-39A) y asociada al transporte de Mg^{2+} por MgtA. Esto corrobora la no estimulación de la actividad ATPasa con iones Na^+ y confirma la posible función de CtpH como Na^+/K^+ ATPasa tipo P, ya que se ha reportado la estricta necesidad de la presencia de iones K^+ o Li^+ para su funcionamiento [Toyoshima, C., et al., 2011].

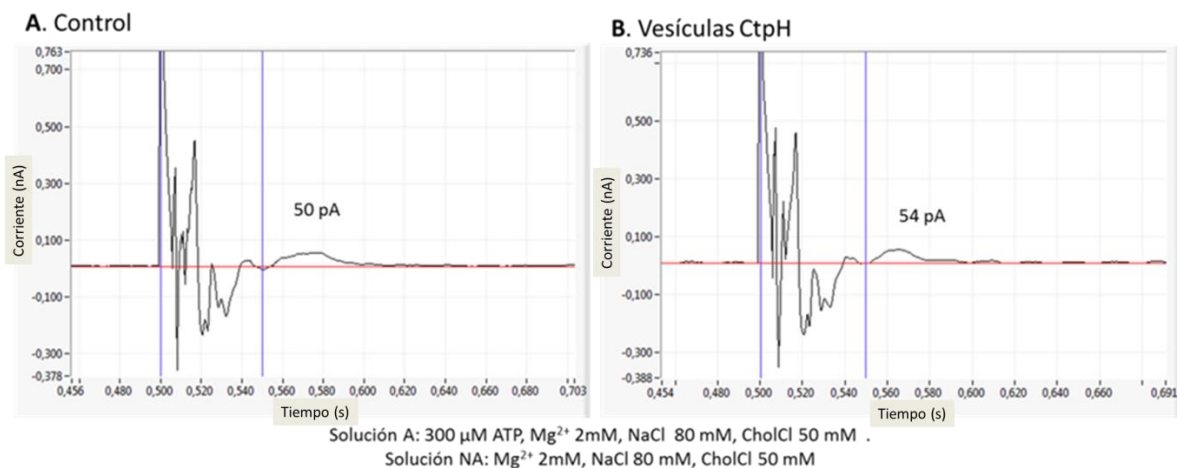


Figura 6-39. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μ M de ATP en presencia de 80 mM de NaCl y 50 mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza iónica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control (A) y con aquellas que expresaron la proteína CtpH (B) adheridas a la SSM. Se aplicó un protocolo de intercambio simple de soluciones para Na^+ según la tabla 5-5 (sección 5.6.2.3). Las señales debidas al transporte de carga a través de la vesícula se observan inmediatamente después de los 550 ms. Las gráficas obtenidas fueron el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

Por otro lado, para las medidas en las que se quería probar el transporte de Ca^{2+} en vesículas CtpH (Figura 6-40), se obtuvo una señal negativa (-325 pA) que indica la translocación de carga positiva hacia el lado citoplasmático de la vesícula cuando se pasa solución activadora con ATP en presencia de Ca^{2+} (Fig. 6-40B). Esta señal no es causada porque el intercambio de soluciones haya activado otro tipo de transporte en las vesículas CtpH, ya que en las vesículas control (Fig. 6-40A) solo se observó una señal pequeña cuya magnitud indica el transporte de Mg^{2+} por parte de MgtA según lo discutido anteriormente.

Teniendo en cuenta que el perfil hidrofóbico de la secuencia CtpH presentaba mayor similitud con el de una ATPasa tipo P transportadora de Ca^{2+} [Novoa, L., et al., 2012] y que este tipo de ATPasas se caracteriza por el transporte de 2 iones Ca^{2+} hacia fuera con

la simultánea translocación de 2 o 3 iones H^+ hacia dentro [Tadini-Buoninsegni, F., 2006], podría plantearse el mismo mecanismo pero en la dirección contraria de tal manera que habría un transporte neto de carga positiva hacia el interior celular. No obstante es conveniente recordar que los niveles intracelulares de Ca^{2+} en las bacterias son cuatro órdenes de magnitud menores que los niveles extracelulares y, por tanto, el transporte de Ca^{2+} hacia el interior celular no requeriría de una ATPasa, debido a que estaría favorecido por el gradiente de concentración.

Lo anterior no necesariamente significa que la proteína CtpH no pueda transportar iones Ca^{2+} . La señal de magnitud negativa puede haberse originado debido a que el transporte de Ca^{2+} mediado por la ATPasa CtpH pueda haber desencadenado la activación de otros transportadores endógenos de *E. coli* cuyo resultado neto sea el transporte de carga positiva hacia el exterior de la vesícula (lado citoplasmático). De hecho se ha reportado que los niveles de Ca^{2+} son estrictamente regulados por un sistema de proteínas que combinan varios tipos de transporte, ya que este ion está involucrado en procesos de señalización claves para varias funciones fisiológicas en las bacterias dentro de las cuales se encuentran la motilidad, la quimiotaxis y la patogenicidad [Norris, V., et al., 1996; Jones, H., et al., 1999; Dominguez, D., 2004]. Se han registrado varios sistemas que podrían responder incluso a cambios sutiles en las concentraciones extracelulares de Ca^{2+} en *E. coli*, dentro de los cuales se encuentran canales de calcio estimulados por voltaje no-proteicos constituidos por complejos de polihidroxibutirato y polifosfato [Jones, H., et al., 1999], o interbambiadores Ca^{2+}/H^+ como ChaA [Naseem, R., et al., 2008].

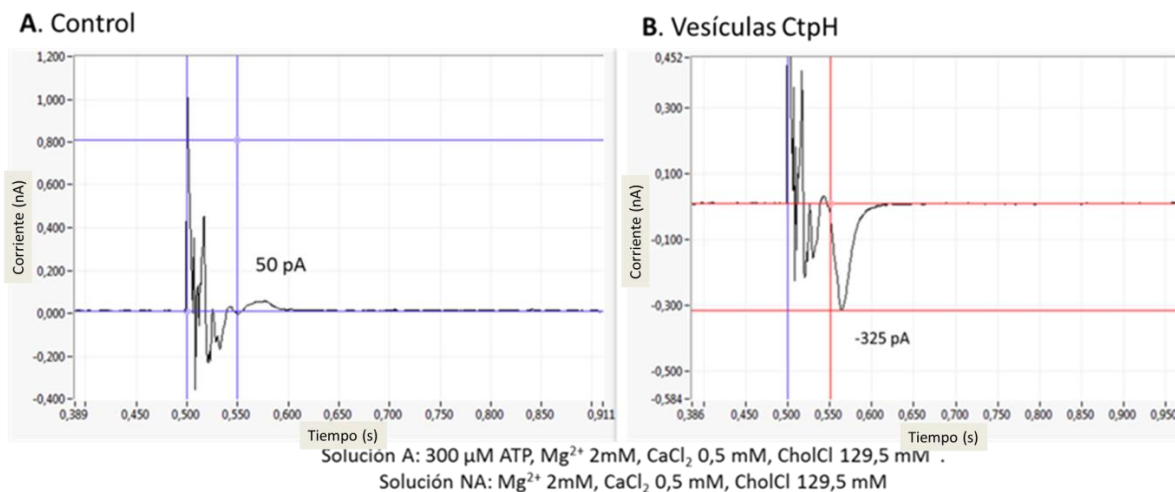


Figura 6-40. Corrientes transitorias generadas por un salto de 300 μM de ATP en presencia de 0,5 mM de $CaCl_2$ (30 μM Ca^{2+} libre) y 129,5 mM de cloruro de colina (CholCl) para mantener la fuerza iónica constante. Medidas realizadas con vesículas de membrana de *E. coli* control (A) y con aquellas que expresaron la proteína CtpH (B) adheridas a la SSM. Se aplicó un protocolo de intercambio simple de soluciones para Ca^{2+} según la tabla 5-5 (sección 5.6.2.3). Las señales debidas al transporte de carga a través de la vesícula se observan inmediatamente después de los 550 ms. Las gráficas obtenidas fueron el promedio de tres medidas y las señales fueron analizadas utilizando el software SurfE2R One v3.5.2.

6.4.3 Posible involucramiento de CtpH como ATPasa tipo P transportadora de Na⁺/K⁺ y/o Ca²⁺ en la regulación de metales alcalinos y alcalinotérreos.

Las dos aproximaciones experimentales a la especificidad iónica, actividad ATPasa y medidas electrofisiológicas, concordaron en cuanto al comportamiento frente a Na⁺ y K⁺. En este caso CtpH sería la primera bomba Na⁺/K⁺ constituida por una sola subunidad en procariotas. La función principal sería, como en eucariotas, el mantenimiento del potencial de membrana, proceso clave para otros mecanismos de transporte secundario de nutrientes. En el caso del transporte de Ca²⁺ por parte de esta ATPasa no se logró llegar a un consenso claro entre las dos metodologías. Los ensayos de actividad ATPasa indicaron una estimulación de la misma cuando las vesículas se sometieron a Ca²⁺ 30 μM, sin embargo la señal de corriente obtenida por SSM para el protocolo de intercambio simple de soluciones de Ca²⁺ evidenció una dirección de transporte de carga contraria a la esperada para una ATPasa tipo P, pero explicable a partir de la activación de otros transportadores endógenos de *E. coli* dependientes de Ca²⁺.

No se descarta la posibilidad de que la proteína CtpH pueda presentar especificidad hacia Na⁺/K⁺ o Ca²⁺ dependiendo de las condiciones y necesidad a las que este sometido el bacilo tuberculoso. Esta flexibilidad en cuanto a especificidad de sustrato de reportó para la ATPasa tipo P transportadora de metal pesado CtpD de *M. smegmatis*, la cual demostró transportar iones Co²⁺ y Ni²⁺ con una afinidad similar, y Zn²⁺ con una afinidad aparentemente menor [Raimunda, D., et al., 2012].

Estudios estructurales han evidenciado pocas diferencias en las regiones transmembranales donde se ubican los sitios de unión al ion entre SERCA, Na⁺/K⁺ ATPasas y H⁺/K⁺ ATPasas [Chan, H., et al., 2010] (Figura 6-41). Según esta figura, los sitios de unión al ion de la H⁺ ATPasa (perteneciente al grupo P_{III}) están compuestos de aminoácidos significativamente diferentes a los presentes en las demás ATPasas. En SERCA, Na⁺/K⁺ ATPasas y H⁺/K⁺ ATPasas se presentan mínimo tres residuos ácidos (E771, D800, E309 en SERCA) involucrados en la unión a los iones y ubicados en la misma posición transmembranal para las tres ATPasas. En H⁺ ATPasa solo se presenta un residuo ácido involucrado en la unión al ion (D684) [Bublitz, M., et al., 2010].

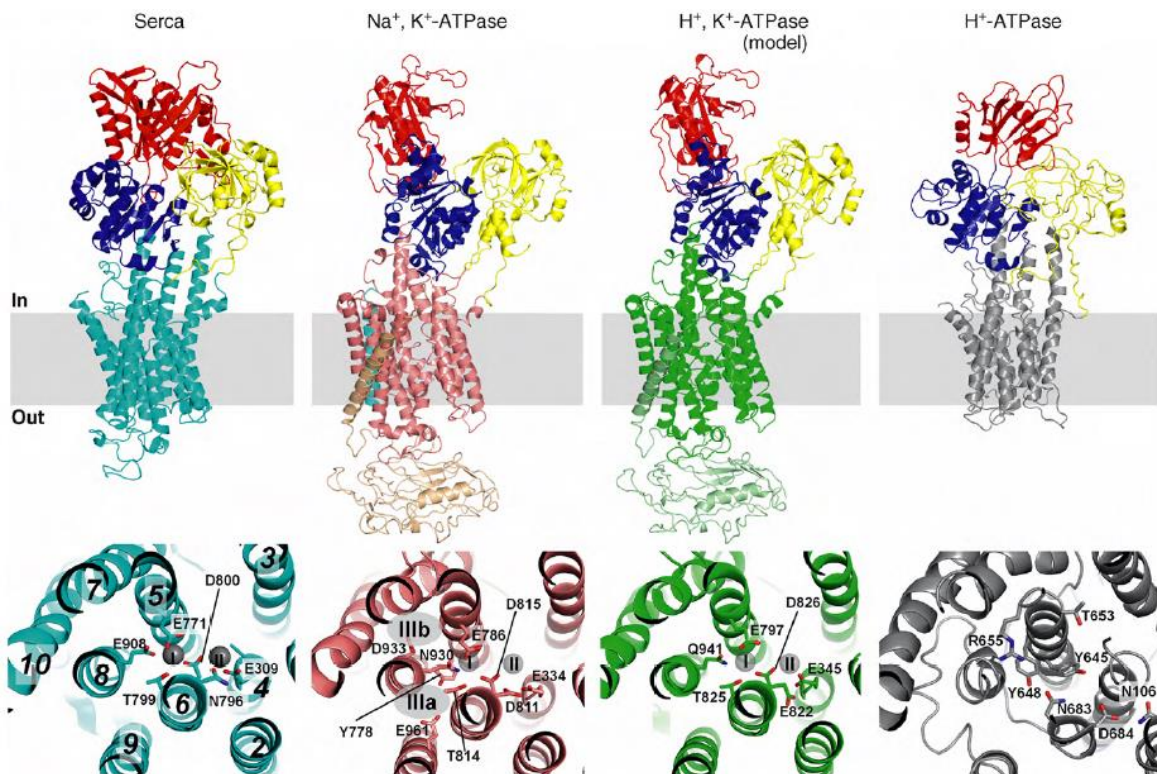


Figura 6-41. Estructuras globales y arquitecturas de los sitios de unión al ion de cuatro ATPasas tipo P distintas transportadoras de metales alcalinos/alcalinotérreos y protones. En la parte superior se representan las estructuras de una SERCA de conejo en la conformación E1 (código PDB 1T5S), una Na⁺/K⁺ ATPasa de cerdo en la conformación E2:P_i (código PDB 3KDP), un modelo por homología de la H⁺/K⁺ ATPasa gástrica humana basado en la estructura de la Na⁺/K⁺ ATPasa y una H⁺ ATPasa de plantas AHA2 en la conformación E1 (código PDB 3B8C). Los dominios N, P y A se presentan en rojo, azul y amarillo, respectivamente. En la parte inferior, los sitios de unión a ion se observan desde el lado extracitoplasmático en una vista perpendicular al plano de la membrana. De izquierda a derecha se tienen los sitios de unión al ion para SERCA, Na⁺/K⁺ ATPasa, H⁺/K⁺ ATPasa y H⁺ ATPasa. Los aminoácidos involucrados en la unión al ion se indican por su abreviación según el código de una letra seguido de la posición en la que se encuentran en la proteína. En SERCA las hélices transmembranales están identificadas por números, mientras que los iones se presentan como esferas grises I y II. En la Na⁺/K⁺ ATPasa la putativa ubicación del tercer ion transportado se representa por elipses grises [Tomado de Bublitz, M., et al., 2010].

De la misma manera en que las cadenas laterales de los aminoácidos involucrados en la unión al ion se reorientan para permitir el transporte de diferentes iones en las dos direcciones (es decir, en el caso de SERCA, Ca²⁺ en una dirección y H⁺ en la otra dirección), podrían reorientarse también para permitir la unión de otro ion diferente a los normalmente transportados [Bublitz, M., et al., 2010]. Esto significa que una Na⁺/K⁺ ATPasa tipo P podría en algún momento transportar iones Ca²⁺ y H⁺, aunque con una afinidad diferente. Lo que finalmente definiría la afinidad diferencial hacia distintos tipos de iones sería las distancias entre los iones y los grupos ligando, las cuales han

demostrado ser ligeramente diferentes. Lo anterior explica la dificultad de poder distinguir mediante estudios bioinformáticos entre ATPasas tipo P transportadoras de diferentes metales alcalinos o alcalinotérreos.

Estudios recientes han revelado la importancia de la regulación de los niveles intrafagosomales de metales alcalinos y alcalinotérreos en la patogenicidad de *M. tuberculosis*. El Ca^{2+} es un reconocido agente involucrado en la señalización tanto en eucariotas como en procariontes, que ejerce su acción activando proteínas de membrana y citoplasmáticas gracias a aumentos transitorios en su concentración. Este incremento de Ca^{2+} en el fagosoma de los macrófagos constituye una señal que tiene como último fin el reclutamiento de hidrolasas lisosomales y la acidificación del fagosoma, permitiendo así la eliminación de patógenos los fagocitados. Sin embargo, en el caso de la infección con *M. tuberculosis* se cree que la micobacteria tiene la capacidad de inhibir el aumento de Ca^{2+} intrafagosomal y así mismo los mecanismos que llevarían a la fusión fagosoma-lisosoma (Figura 6-42) [Vergne, I., et al., 2004]. No se conoce cuál es el mecanismo que utiliza la micobacteria para evitar el aumento de Ca^{2+} , pero podrían estar involucrados varios sistemas de transporte de dentro de los cuales una ATPasa tipo P se encargaría de mantener los niveles de Ca^{2+} en la bacteria.

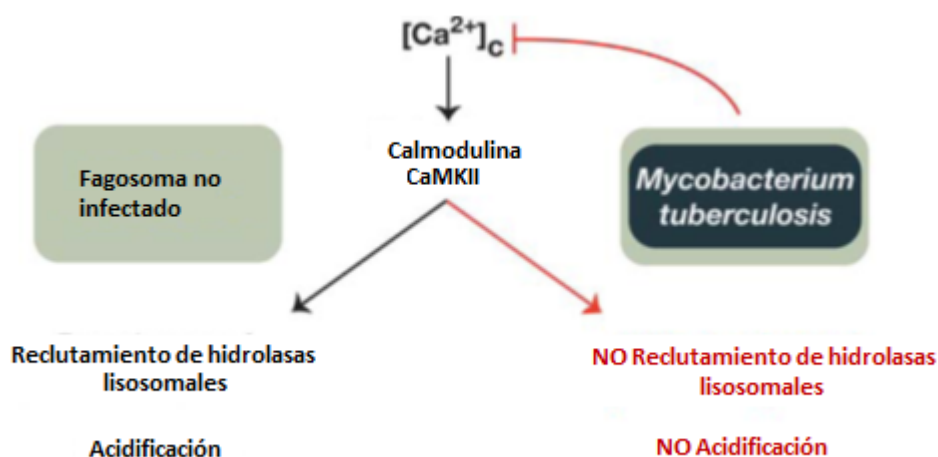


Figura 6-42. *M. tuberculosis* inhibe el aumento en la concentración citosólica de Ca^{2+} y previene el reclutamiento de hidrolasas lisosomales, facilitado por calmodulina y por la quinasa II dependiente de Ca^{2+} /calmodulina (CaMKII), hacia el fagosoma micobacteriano y, así mismo, su acidificación [Modificado de Vergne, I., et al., 2004]

Durante las diferentes etapas de la infección con *M. tuberculosis* se han registrado cambios en las concentraciones intrafagosomales de varios iones como Zn^{2+} , Ca^{2+} , K^+ , Cl^- , aparentemente causados por una manipulación de los flujos iónicos por parte de la micobacteria [Soldati, T., Neyrolles, O., 2012] en la cual estarían involucrados varios sistemas de transporte y que explicarían el alto número de ATPasas tipo P en su genoma.

Una ATPasa tipo P transportadora de Na^+/K^+ no solo ayudaría al mantenimiento del potencial de membrana y a la homeostasis intracelular especialmente en las condiciones en las que el fagosoma activa diferentes vías de transporte para lograr la acidificación intrafagosomal [Soldati, T., Neyrolles, O., 2012], sino que también estaría involucrada en el mantenimiento de los gradientes necesarios para la ingesta de nutrientes y para el eflujo de medicamentos mediados por sistemas de transporte secundarios. Tales transportadores secundarios multidrogas utilizan el gradiente electroquímico transmembranal de sodio para dirigir el transporte de medicamentos fuera de la célula e incluyen miembros de la familia principal de transportadores facilitadores (MFS), familia de resistencia multidroga (SMR), familia de *resistance nodulation división* (RND) y familia de eflujo de compuestos tóxicos y multidroga (MATE) [Gupta, A., et al., 2010; Putman, M., et al., 2000]. En *Mycobacterium* se ha reportado la presencia de estos transportadores especialmente pertenecientes a las familias MFS, SMR, y RND [Sarathy, J., et al., 2012; De Rossi, E., et al., 2006].

7. Conclusiones

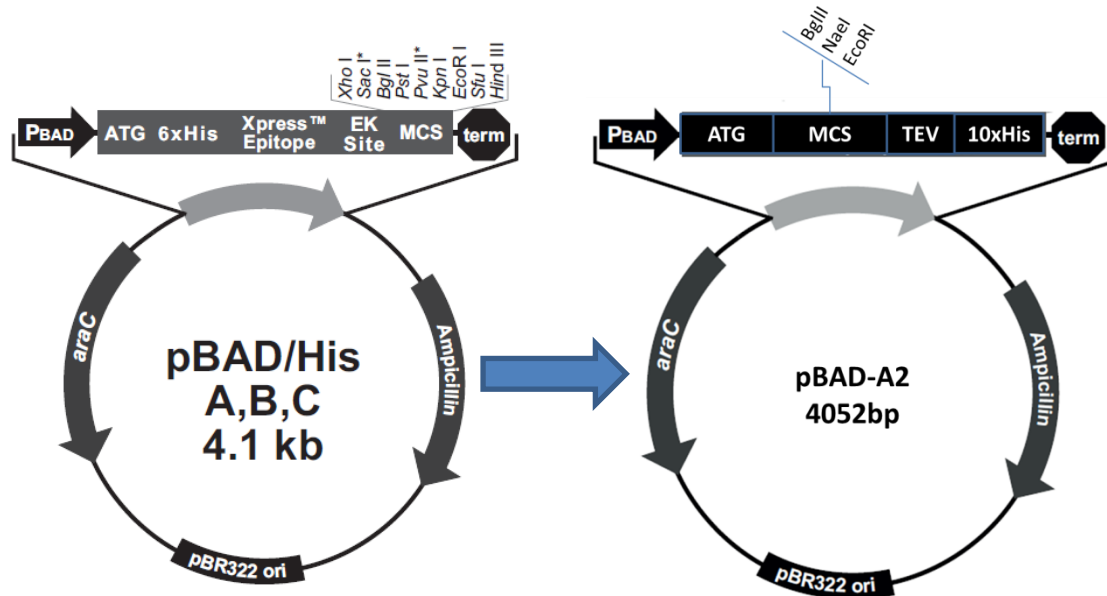
El gen *ctpH* de *M. tuberculosis*, asociado mediante estudios bioinformáticos al transporte de iones Ca^{2+} , fue amplificado, clonado en un vector de clonación y subclonado en el vector de expresión pBAD-A2 el cual presenta un promotor moderado inducido por L-arabinosa, especialmente útil para la expresión de proteínas de membrana. Dos cepas diferentes de *E. coli* se utilizaron para la transformación del recombinante H-pJET y para la expresión del gen *ctpH*: TOP10 y BL21 Rosetta2, en la primera no fue posible obtener la proteína en la membrana mientras que Rosetta2, al presentar el plásmido pRARE (Figura A-3, Anexo A) compensa el uso codónico y así permitió la expresión de la proteína CtpH en la membrana plasmática. La presencia simultánea de iones Na^+ y K^+ estimuló la actividad ATPasa de las vesículas de membrana y produjo una señal indicativa de transporte iónico mediante la técnica electrofisiológica de membranas soportadas en sólido (SSM) manejada en la forma de salto de concentración de ATP. Una señal más intensa y de características diferentes se obtuvo para el salto en la concentración de ATP en presencia de Ca^{2+} , indicando una posible flexibilidad en cuanto a los posibles iones transportados. La proteína CtpH podría comportarse como una Na^+/K^+ ATPasa tipo P o como una Ca^{2+} ATPasa; sin embargo su función debe ser comprobada mediante ensayos con la proteína pura.

8. Perspectivas

Los resultados obtenidos en esta investigación pueden ser complementados con la caracterización funcional de la proteína CtpH una vez purificada y reconstituida en proteoliposomas. Parte de esa posterior caracterización funcional puede llevarse a cabo utilizando agentes fluorescentes sensibles al cambio de potencial de membrana [Lauger, P., 1991].

A mediano plazo se espera contribuir a la comprensión de los mecanismos de regulación de la homeostasis iónica en la micobacteria y su influencia en la persistencia del bacilo dentro del macrófago.

A largo plazo los resultados de la presente propuesta en colaboración con otras disciplinas podrían contribuir al diseño racional de nuevos antituberculosos, impacto de gran importancia si tenemos presente el problema social que genera la multiresistencia de las micobacterias a los antibióticos y la dificultad que en la actualidad existe para erradicar la tuberculosis latente mediante una terapia amable con medicamentos.



```

* 10 * 20 * 30 * 40 * 50 * 60 * 70 * 80 * 90 * 100 * 110 * 120 * 130 * 140 * 150 * 160 * 170 *
1  AAGAAACCAATTGCCATATTGCATCAGACATGCCGCTACTGCGTCTTTTACTGGCTCTTCGCTAACCAACCGGTAACCCGCTTATTAAGAAGCATCTGTAACAAAGCGGACCAAAAGCCATGACAAAACCGCTAACAAAAGTGTCTATAATCCGGCAGAAAAGTCCA
176  CATTGATTAATTCACCGGCTCACACTTTGCTATGCCATAGCAITTTATCCATAAGATTAGCGGATCTACTGAGCGCTTTTATCGCACTCTCTACTGTTCTCCATACCCGTTTTTGGGCTAACAGGAGGAATTAACCTGGGGGTTCTGAGATCTGGGSAATGTC
351  GAAAGCGTACTCTTGGAGGCCCGTGGTTCCCGCTACACACAGCATCCGCTGACCATTGGCTTGGCTTTTTGGCGGATGAGAGAGATTTTCAGCTGATACAGATTAATCAGAACCGCAGAACCGGCTCTGATAAAACAGAAITGGCTGGCGCAGTASCCTGGTG
526  GTCCCACTGACCCGATGCCAATGAAAGTGAACCGGCTAGCGGATGGTAGTGGGGTCTCCCATGGCAGATGAGGACTGCCGCACTAAATAAACGAAAGGCTCAGTCGAAAGCTGGGCTTTGGTTTTATCGTTTGGTGGTGAACCGCTCTCCGAGT
701  AGGACAAATCCCGCGGAGCGATTTGAAGTTCGAAGCAGCGCCCGAGGCTGGCGGACGAGCCGCCCAAACTCCAGGCACTAAATTAAGCAGAGGCGCTCTGACGATGGCTTTTGGCTTCTCAAACTCTTTTGTATTTTCTAAATACATTCAAAT
876  ATGATCCGCTCATGAGACATAACCTCATAAATGCTTCAATAATATTGAANAAGGAGAGATAGATTAACAATTTCCGCTGGCCCTTATCCCTTTTTGGCGCAITTTGGCTCTCTGTTTTGCTCACCGCAAAAGCGCTGGTGAAGTAAAGATGCTGAAGATCAGT
1051  TGGGTGACGAGTGGTTACATCGACTGAGTCTCACAGCGGTAAGATCTTGGAGATTTTCCCGCGAGAGCTTTCCAAATGATGAGCACTTTAAAGTTCTGCTATGGCGCGGATTAATCCGTTGACCGCGGAGAGCAACTCGGTCGCGCAGTACACTATTTC
1226  TCGAATGACTTGGTTGAGTACTCACCGTACAGAAAGCACTTTACGATGGCATGACAGTAAAGAAATATGCACTGCTGCCATAACCATGAGTGAATAACTGCGCCAACTACTTCTGACACAGATCGAGGACCGAGAGGATTAACCGCTTTTTGCAACAGATGGGG
1401  GATCATGACTCCCTTGATGCTGGAGACCGGAGCTGAATGAAGCCATACCAAGCAGACGCTGACACAGATGCTGTAGCAATGGCAACAGCTTGGCGAACTAATTAAGTGGCACTACTACTGACTCCCGGCAAAATTAATGACTGGATGGAGCGGATA
1576  AAGTTGACGAGACACTTCGCGCTCGGCCCTCCCGCTGGCTGGTTTTATGCTGATAAATCTGGAGCGGTTGAGCGTGGGCTCGCGGATCATTCGACACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCGATATCGTAGTATCTACACAGCGGGAGTCAGCACTATGGATGAAG
1751  AAATGACAGATGCTGAGATAGTGGCTCATTGATTAAGCAITGGTAAGTCTGACAGCAAGTTTACTCATATACTTTAGATGATTAATAACTCATITTAATTTAAAGGATAGGTAAGATCCTTTTTGATAATCTCATGACCAAAATCCCTTAAGCTAGTTTTCG
1926  TTCCACTGAGCGTCAAGCCCGTAGAAAAGATCAAAGATCTTTTGGAGTCTTTTTTCTGCGGTAATCTGCTGCTTGCRAACAAAAACACCGCTACCAGCGTGGTTTTGTTGGCGATCAAGAGCTACCAACTTTTTCCGAAGTAACTGGCTTCAGCAGAGCGC
2101  AGATACCAAACTGCTCTTAGTGTAGCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAACTCTGTAGCAGCGCTACATACCTGCTCTGTAATCTGTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCGATAAGTGGTCTTACCAGGTTGAGCTCAAGAGATAGTACCAGGTAAGCGCA
2276  CGGTCGGGCTGAACGGGGGTTGCTGACACAGCCAGCTTGGAGCAGACGACTACACCGACTGAGATACCTACAGCTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTCCCGAAGGAGAAAGCGGACAGGATCCDCTAAGCGGACAGGTCGGAACAGGAGAGCGCAGGGAG
2451  CTTCAGGGGAAAGCCCTGGTATCTTTATAGTCTGTGGGTTTTGCGCACTCTGACTTGAAGCTGATTTTTGATGCTCGTACGGGGGCGGAGCTATGGAANAACCGCAGCAGCGGCTTTTACGGTCTGGCTTTTGTGGCTTTTGTCCACTGTTCTTTC
2626  CTGCGTTATCCCTGATTTCTGTGATAACCGTATTACCGCTTTTGGTGGCTGATACCGCTCGCGCAGCGGAAACAGCGAGCGAGTCACTGAGCGAGGAGGAGGCGCTGATGGGATTTTTCTCTTACGATCTGTGGGATTTTACACCGATATGGT
2801  CACTCTGATCAATCTGCTGATGGCAGTATTAAACGATATACACTCCGCTATCGCTACGCTGAGTGGGCTGAGTGGCGCCGACACCGCCCAACCGGCTGACGCGCTGACGGGCTGTCTGCTCCCGCATCGCTCAGACAGCTGAGCGCTCCCGGGA
2976  GCTGATGCTGAGAGTTTTCCCGTCAACCGAAACCGGAGGCGAGATCAATTCGCGCGGAAAGCGGAGCGCATGCAATGCTGCTGCTCAAAATGGACGAGCGAGGATCTGCAAACTTATGCTACTCCGTCAGCGCTCAATTTGCTGATTTGTTACCAATTA
3151  TGCAACTTACGCGTACATCAITCACTTTTTCTCACACCGGACCGAATCGCTGGCTGGCCCGGCTGCAITTTTTAAATACCCCGGAGAAATAGATGATGCTCAAAACCAACTTGGACCGGAGGCGGATAGGATCCGGGTTGGCTCAAAAAGCACTTCGCC
3326  TGGCTGATAGTGGTCTCCCGCCAGTAAAGCGTAAATCCCTAAGCTGGCGAAAGATGTGACAGCGCAGCGGACAAAGCAATGCTGTGGACCTGGCGATATCAAAATGCTGCTCCGAGTGGCTGATGATCTGACAAAGCTCCGCTACCCGATTAAT
3501  CCATCGTGGATGGAGCGACTGCTTAATCGCTCCATGGCCGCAATCAAAATGCTCAAGCAGATTTATCGCCAGACTCCGAAATAGCGGCTTCCCTTCCCGGCTTAAATGATTTGCCAAACAGGCTGCTGAAATGGGCTGGTGGCTTATCCCGGGAAGAACCC
3676  CGATTTGGCAAAATTTAGCGCCAGTTAAGCCATTCATCCAGTAGCGCGGAGCAAAATTAACCCACTGGTATACCAATTCGCGAGCTCCGAGTGAAGCAGCTAGTGAATCTCTCCGCGGGAACAGCAAAATACCCCGGTCGCAAAACAAATCTCGCTCCGTA
3851  TTTTCCACCCCGCTGACCGGAGTGGTAGATTGAGAAATAAACCTTCAATCCGAGCGGTCGGTCAATAAAAAATCGAGATAACCTTTGGCTCAATCGGCTTAAACCCCGCAGATGGGATTAACAGGATACCCGCGAGCGGAGATCTTTGGCTTCAGCCA
4026  TACTTTTACTACTCCCGCAATCAGAG
    
```

Figura A-2: Vector de expresión pBAD-A2 modificado desde el vector comercial pBAD/HisA. El vector pBAD-A2 fue obtenido desde el Instituto Max Planck de Biofísica (MPI-Biophysics). En la secuencia del vector pBAD-A2 se observa el codón de inicio (ATG) y el codón de terminación (TAA) en naranja. Los sitios de restricción presentes en el sitio de clonación multiple (MCS) son BglIII (verde), NaeI (rojo) y EcoRI (gris). El sitio de reconocimiento de la proteasa TEV (Tobacco Etch Virus) para la remoción del tag de His se muestra en lila y la secuencia codificante del tag de His se muestran en azul.

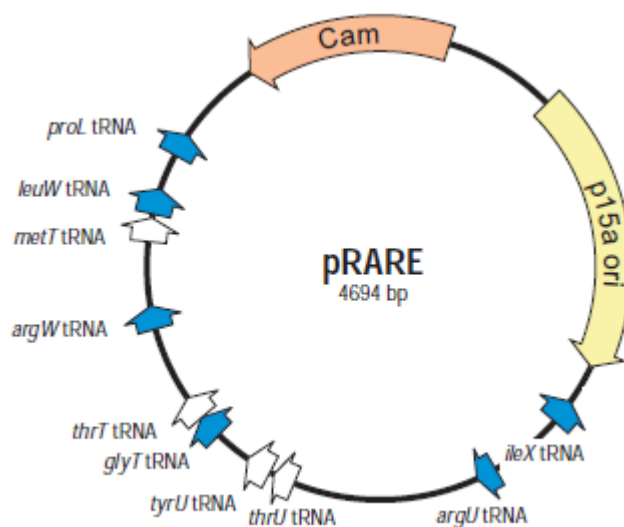


Figura A-3: Mapa del vector pRARE presente en la cepa de *E. coli* Rosetta 2 y el cual codifica tRNA poco comunes en *E. coli* (Novagen).

B. Anexo: Mapa de los recombinantes obtenidos.

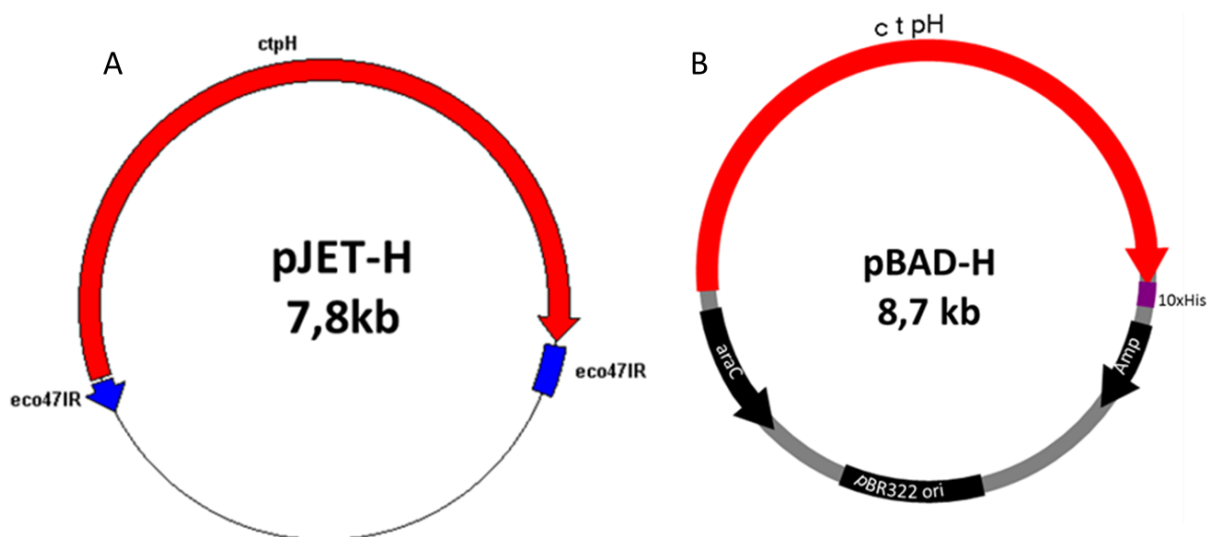


Figura B-1. Mapa de los recombinantes obtenidos en el presente trabajo. A. Recombinante H-pJET en el que el gen inserto *ctpH* se encuentra en la dirección contraria del gen *eco47IR* del vector pJET1.2/blunt. B. Recombinante H-pJET en el que el inserto *ctpH* se encuentra en marco de lectura con el promotor del vector pBAD-A2.

C. Anexo: Resultados secuenciación de los recombinantes.

pJET- H: el fragmento *ctpH* se sitúa entre las posiciones 507 – 5126 bp de la secuencia empleada como referencia (primera fila). Debajo se muestran los alineamientos con los fragmentos generados por cada uno de los primers de secuenciación (Clone Manager).

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

Fragmento 1: 462-1364 bp

Fragmento 2: 1309-2225 bp

Fragmento 3: 2123 -3058 bp

Fragmento 4: 2990-4006 bp

Fragmento 5: 3452-4397 bp

Fragmento 6: 4350-5286 bp

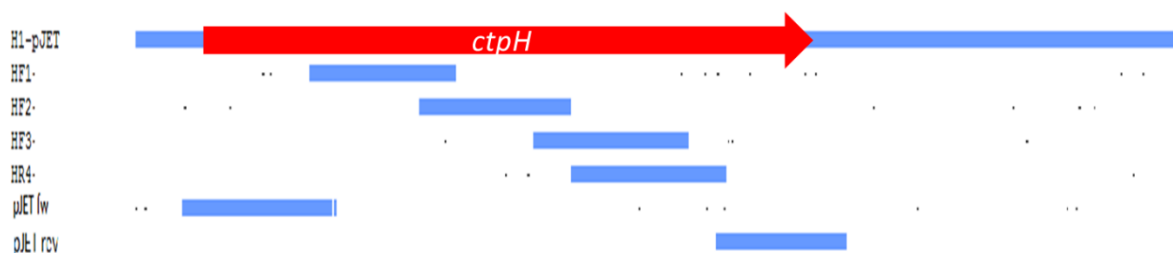


Figura C-1. Secuenciación del recombinante H-pJET.

pBAD- H: el fragmento *ctpH* se sitúa entre las posiciones 340- 4956 bp de la secuencia empleada como referencia (primera fila). Debajo se muestran los alineamientos con los fragmentos generados por cada uno de los primers de secuenciación (Clone Manager).

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

Fragmento 1: 267- 1225 bp

Fragmento 2: 1141 -2139 bp

Fragmento 3: 1952- 2981 bp

Fragmento 4: 2824- 3823 bp

Fragmento 5: 3285- 4221 bp

Fragmento 6: 4091-5000 bp

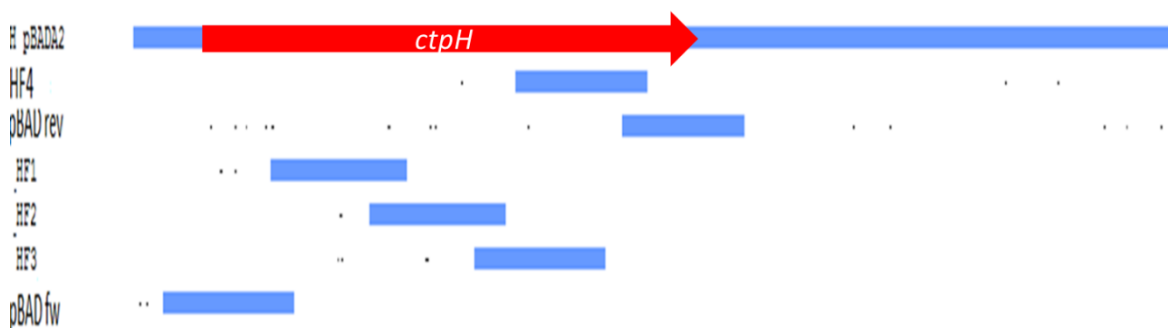


Figura C-2. Secuenciación del recombinante H-pJET

Referencias

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

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

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

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

Axelsen, K., Palmgren, M., **1998**, Evolution of Substrate Specificities in the P-Type ATPase Superfamily, *Journal of Molecular Evolution*, 46; 84-101.

Barrow, W., **1997**, Processing of mycobacterial lipids and effects on host responsiveness, *Frontiers in Bioscience*, 2, 387-400.

Bartolommei, G., Moncelli, M., Rispoli, G., Kelety, B., Tadini-Buoninsegni, F., **2009**, Electrogenic Ion Pumps Investigated on a Solid Supported Membrane: Comparison of Current and Voltage Measurements, *Langmuir*, 25; 10925-10931.

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

Beran, V., Havelkova, M., Kaustova, J., Dvorska, L., Pavlik, I., **2000**, Cell wall deficient forms of mycobacteria: a review., *Veterinarni Medicina*, 51; 365-389.

Bolt, M., Mahoney, P., **1997**, High-Efficiency Blotting of Proteins of Diverse Sizes Following Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis, *Analytical Biochemistry*, 247; 185-192.

Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., et al., **2011**, Mycobacterial P₁-Type ATPases Mediate Resistance to Zinc Poisoning in Human Macrophages, *Cell Host & Microbe*, 10;248-259.

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

Brennan, P., **2003**, Structure, function, and biogenesis of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis*, *Tuberculosis*, 83; 91-97.

Brennan, P., Nikaido, H., **1995**, The envelope of mycobacteria, *Annual Review of Biochemistry*., 64; 29-63.

Bublitz, M., Poulsen, H., Preben Morth, J., Nissen, P., **2010**, In and out of the cation pumps: P-type ATPase structure revisited, *Current Opinion in Structural Biology*, 20; 431-439.

Bublitz, M., Preben Morth, J., Nissen, P., **2011**, P type ATPases at a glance, *Journal of Cell Science*, 124; 2515-2519.

- Chan, H., Babayan, V., Blyumin, E., et al., **2010**, The P-Type ATPase Superfamily, *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 19; 5-104.
- Chen, T., Lin, Y., Zheng, J., **2009**, Electrophysiological Measurements of Membrane Proteins, en *Fundamental Concepts in Biophysics*, Humana Press, Vol 1, pag 111-145.,
- Chen, D., Texada, D., **2006**, Low-usage codons and rare codons of *Escherichia coli.*, *Gene Ther Mol Biol*, 10,1-12.
- Chung, C., Niemela, S., Miller, R., **1989**, One-step preparation of competent *Escherichia coli*: Transformation and storage of bacterial cells in the same solution, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 86; 2172 – 2175.
- Clone Manager 9,0 Professional Edition Software (2010)
- Cosma C., Sherman D., Ramakrishnan L. **2003** The Secret Lives of the Pathogenic Mycobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 57; 641-676
- Crowle, A., Dahl, R., Ross, E., May, M. **1991**, Evidence that vesicles containing living, virulent *Mycobacterium tuberculosis* or *Mycobacterium avium* in cultured human macrophages are not acidic, *Infection and Immunity*, 59, 1823-1831.
- Dafeé M. **2008** Capítulo 1: The Global Architecture of the Mycobacterial Cell Envelope. In *The Mycobacterial Cell Envelope* pag. 3-11 Ed. ASM Press Ciudad Washington DC, USA.
- De Rossi, E., Aínsa, J., Riccardi, G., **2006**, Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question, 30; 36-52.
- De Souza, G., Leversen, N., Malen, H., Wiker, H., **2011**, Bacterial proteins with cleaved or uncleaved signal peptides of the general secretory pathway, *Journal of Proteomics*, 75; 502-210.
- Dieffenbach, C., Lowe, T., Dveksler, G., **1993**, General concepts for primer design, *Genome Research*, 3: S30-S37.
- Dominguez, D., **2004**, Calcium Signalling in Bacteria, *Molecular Microbiology*, 54; 291-297.
- Frechin, M., Senger, B., Braye, M., et al., **2009**, Yeast mitochondrial Gln-tRNA^{Gln} is generated by GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS., *Genes & Dev*, 23;1119-1130.
- Flynn, J., Chan., J., **2001**, Tuberculosis: Latency and Reactivation, *Infection and Immunity*, 69, 4195-4201.
- Gambel, A., Desrosiers, M., Menick D., **1992**, Characterization of a P-type Ca²⁺-ATPase from *Flavobacterium odoratum*, *Journal of Biological Chemistry*, 267; 15923-15931.
- Garcia-Celma, J., **2009**, Electrophysiological characterization of Cation Coupled Symporters and Investigation of Physicochemical Surface Processes with a Solid-Supported Membranes, Tesis Doctoral, Frankfurt University, Frankfurt, Germany.

Glavinas, H., Méhn, D., Jani, M., Oosterhuis, B., Herédi-Szabó, K., Krajcsi, P., **2008**, Utilization of membrane vesicles preparations to study drug-ABC transporter interactions, *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, 4; 721-732.

Goren MB., **1972**, Mycobacterial Lipids: Selected Topics. *Bacteriological Reviews* 36; 33-64.

Grunenwald, H., **2003**, Optimization of Polymerase Chain Reactions, en PCR Protocols, *Methods in Molecular Biology*, 2nd Edition, Volumen 226, pages 89 – 97.

Gupta, A., Reddy, V., Lavania, M., Chauchan, D., Venkatesan, K., Sharma, V., Tyagi, A., Katoch, V., **2010**, *jefA* (Rv2459), a drug efflux gene in *Mycobacterium tuberculosis* confers resistance to isoniazid & ethambutol, *Indian J. Med. Res.*, 132; 176-188.

Guzman, L., Belin, D., Carson, M., Beckwith, J., **1995**, Tight Regulation, Modulation, and High-Level Expression by Vectors Containing the Arabinose P_{BAD} Promoter, *Journal of Bacteriology*, 177; 4121-4130.

Hartung, K., Froehlich, J., Fendler, K., **1997**, Time-Resolved Charge Translocation by Ca-ATPase from Sarcoplasmic Reticulum after an ATP Concentration Jump, *Biophysical Journal*, 72; 2503-2514.

Huyer, G., Liu, S., Kelly, J., Moffat, J., Payette, P., Kennedy, B., Tsaprailis, G., Gresser, M., Ramachandran, C., **1997**, Mechanism of inhibition of protein-tyrosine phosphatases by vanadate and pervanadate, *Journal of Biological Chemistry*, 272; 843-851.

Jones, H., Holland, I., Baker, H., Campbell, A., **1999**, Slow changes in cytosolic free Ca²⁺ in *Escherichia coli* highlight two putative influx mechanisms in response to changes in extracellular calcium, *Cell Calcium*, 25; 265-274.

Juréen, P., **2008**, Molecular characterization of Antibiotic Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, Swedish Institute for Infectious disease control.

Ken, M., Huang, B., Van Huysse, J., Leenen, F., **2004**, Brain Na⁺, K⁺-ATPase isozyme activity and protein expression in ouabain-induced hypertension, *Brain Research*, 1028; 171-180.

Kim, J., Ahn, T., Ko, J., Park, C., Kim, H., **2001**, Effect of divalent cations on the ATPase activity of *Escherichia coli* SecA., *FEBS Letters*, 493; 12-16.

Kitada, M., Horikoshi, K., **1992**, Kinetic Properties of Electrogenic Na⁺/H⁺ Antiport in Membrane Vesicles from an Alkalophilic *Bacillus* sp., *Journal of Bacteriology*, 174; 5936-5940.

Knechel, N., **2009**, Tuberculosis: pathophysiology, clinical features, and diagnosis, *Critical care nurse*, 29, 34-43.

Kolmodin, L., Birch, D., **2002**, Polymerase Chain Reaction Basic Principles and Routine Practice, en PCR Cloning Protocols, *Methods in Molecular Biology*, Humana Press, Volumen 192, 2nd Edicion, pag 8.

Kuhlbrandt, W., **2004**, Biology, structure and mechanisms of P-type ATPases, *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5; 282-295.

- Kusner, D., **2005**, Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clinical Immunology*, 114, 239-247.
- Lakey, D., Voladri, R., Edwards, K., et al., **2000**, Enhanced Production of Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* Antigen in *Escherichia coli* by Replacement of Low-Usage Codons, *Infection and Immunity*, 68;233-238.
- Lanzetta, P., Alvarez, L., Reinach, P., Candia, O., **1979**, An Improved assay for nanomole amounts of inorganic phosphate, *Analytical Biochemistry*, 1;95-97.
- Läuger, P. **1991**, *Electrogenic Ion Pumps*. 1ed. Ed. Sinauer Associates. Ciudad Sunderland, Mass, USA.
- Lee, H., Bernstein, H., **2001**, The targeting pathway of *Escherichia coli* presecretory and integral membrane proteins is specified by the hydrophobicity of the targeting signal, *PNAS*, 98; 3471 – 3476.
- Leveresen, N., de Souza, G., Malen, H., Prasad, S., Jonassen, I., Wiker, H., **2009**, Evaluation of signal peptide prediction algorithms for identification of mycobacterial signal peptides using sequence data from proteomic methods, *Microbiology*, 155; 2375-2383.
- Lewinson, O., Lee, A., Rees, D., **2008**, The Funnel Approach to the Precrystallization Production of Membrane Proteins, *J. Mol. Biol.*, 377; 62-73.
- Mager, T., Rimon, A., Padan, E., Fendler, K., **2011**, Transport Mechanism and pH Regulation of the Na⁺/H⁺ Antiporter NhaA from *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 286, 23570-23581.
- McKinney JD, Honer zu Bentrup K, Munoz-Elias EJ, Miczak A, Chen B, Chan WT, Swenson D, Sacchettini JC, Jacobs WR, Russell DG: **2000**, Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 406; 735–738.
- Monk, B, Perlin, D. **1994**, Fungal plasma membrane proton pumps as promising new antifungal targets. *Crit Rev Microbiol*. 20; 209-223.
- Moore, C., **2009**, Introduction to Western Blotting, AbD serotec, (<http://static.abdserotec.com/Lit-pdfs/Brochures1/westernblotbook.pdf>).
- Naseem, R., Holland, I., Jacq, A., Wann, K., Campbell, A., **2008**, pH and monovalent cations regulate cytosolic free Ca²⁺ in *E. coli*, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes*, 1778; 1415–1422.
- Niederweis M., **2008**, Nutrient Acquisition by Mycobacteria, *Microbiology* 154; 679-692.
- Niemman, S., Rüscher-Gerdes, S., *Mycobacteria and TB- Therapy and Drug Resistance in Mycobacteria and TB*, **2003** Ed Karger, Vol 2., pag 84-96.
- Novoa-Aponte, L., Leon-Torres, A., Patiño-Ruiz, M., Cuesta-Bernal, J., Salazar, L., Landsman, D., Mariño-Ramirez, L., Soto, C.Y. **2012**, In silico Identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the Mycobacterium tuberculosis complex, *BMC Structural Biology*, 12:25.

Norris, V., Grant, S., Freestone, P., Canvin, J., Sheikh, F., Toth, I., Trinei, M., Modha, K., Norman, R., **1996**, Calcium Signalling in Bacteria, *Journal of Bacteriology*, 178; 3677-3682.

Okrokov, L., Tanner, W., Lehle, L., **1993**, A novel primary Ca^{2+} -transport system from *Saccharomyces cerevisiae*, *Eur. J. Biochem*, 216; 573-577.

OPS, Organizacion Panamericana de la Salud, http://new.paho.org/col/index.php?option=com_content&view=article&id=1022&Itemid=469

Origin 8.1 SR3 v 8.1.34.90 Software **2010** OriginLabCorporation

Osses, L., Godoy, C., **2006**, Characterizing plasma membrane H^{+} -ATPase in two varieties of coffee leaf (*Coffea arabica* L.) and its interaction with an elicitor fraction from the orange rust fungus (*H. vastatrix* Berk and Br.) race II, *Plant Physiology and Biochemistry*, 44; 226-235.

Park, S., Bendelac, A., **2000**, CD-1 restricted T-cell responses and microbial infection, *Nature*, 406; 788-792.

Patiño Ruiz, M.F. **2010**. Caracterización de la actividad ATPasa dependiente de calcio en la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis*: hipoxia e inanición. Tesis de Grado dirigida por el Profesor Luis Ramón Osses Basaure. Departamento de Química. Universidad Nacional de Colombia

Pedersen, P., **2007**, Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 29, 349-355.

Philips, J., Ernst, J., **2012**, Tuberculosis Pathogenesis and Immunity, *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease*, 7; 353-384.

Pintschovius, J., Fendler, K., **1999**, Charge translocation by $\text{Na}^{+}/\text{K}^{+}$ -ATPase Investigated on Solid Supported Membranes: Rapid Solution Exchange with a new Technique, *Biophysical Journal*, 76; 814-826.

Palmgren, M., Nissen, P., **2011**, P-type ATPases, *Annual Review of Biophysics*, 40; 243-266.

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

Palomino, J., Leao, S., Ritacco, V., **2007**, Tuberculosis 2007. From basic science to patient care, Ed TuberculosisTextbook, 1a ed, Brasil.

Parrish, N., Dick, J. and Bisahi, R. 1998, Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.*, 6, 107-112.

Putman, M., van Veen, H., Konings, W., **2000**, Molecular Properties of Bacterial Multidrug Transporters, *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64; 672-693.

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

Radchenko, M., Tanaka, K., Waditee, R., Oshimi, S., Matsuzaki, Y., Fukuhara, M., Kobayashi, H., Takabe, T., Nakamura, T., **2006**, Potassium/Proton Antiport System of *Escherichia coli*, *Journal of Biological Chemistry*, 281: 19822 – 19829.

Raimunda, D., Long, J., Sassettt, C., Arguello, J., **2012**, Role in metal homeostasis of CtpD, a Co²⁺ transporting P_{1B4}-ATPase of *Mycobacterium smegmatis*., *Molecular Microbiology*, 84; 1139-1149.

Rattan, A., Kalia, A., Ahmad, N., **1998**, Multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Perspectives, *Emerging Infectious Diseases*, 4; 195-209.

Rodriguez, J., Ramirez, Ana-S., Suarez, M., Soto, C., **2012**, Electrochemical monitoring of the metabolic activity of mycobacteria in culture, *Antoine van Leeuwenhoek*, 102; 193-201.

Rook, G., Hernandez-Pando, R., **1996**, The pathogenesis of tuberculosis, *Annual Reviews of Microbiology*, 50, 259-284.

Rosch, J., Sublett, J., Gao, G., Wang, Y., Toumanen, E., **2008**, Calcium efflux is essential for bacterial survival in the eukaryotic host, *Molecular Microbiology*, 70; 435-444.

Rustad, T., Sherrid, A., Minch, K., Sherman, D., **2009**, Hypoxia: a window into *Mycobacterium tuberculosis* latency, *Cellular Microbiology*, 11, 1151-1159.

Samuelson, J., **2011**, Bacterial Systems, en *Production of Membrane Proteins: Strategies for expression and Isolation*, John Wiley & Sons, pages 11-35.

Sarah, W., Abomoelak, B., Hoyer, E., Steinberg, H., Talaat, A., **2010**, CtpV: a putative copper exporter required for full virulence of *Mycobacterium tuberculosis*, *Molecular Microbiology*, 77, 1096-1110.

Sarathy, J., Dartois, V., Deon Lee, E., **2012**, The Role of Transport Mechanisms in *Mycobacterium tuberculosis* Drug Resistance and Tolerance, *Pharmaceuticals*, 5; 1210-1235.

Schlesinger LS. **1993** Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors, *Journal of Immunology*, 150, 2920-2930.

Schulz, P., Garcia-Celma, J., Fendler, K., **2008**, SSM-based electrophysiology, *Methods*, 46; 97-103.

Seifert, K., Fendler, K., Bamberg, E., **1993**, Charge transport by ion translocating membrane proteins on solid supported membranes, *Biophysical Journal*, 64; 384-391.

Smith, I., **2003**, *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence, *Clin. Microbiol. Rev.*, 16; 463-496.

Soloz, M., Odermatt, A., **1995**, Copper and Silver Transport by CopB-ATPase in Membrane Vesicles of *Enterococcus hirae*, *Journal of Biological Chemistry*, 270; 9217-9221.

Soldati, T., Neyrolles, O., **2012**, Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)!, *Traffic* 2012, John Wiley & Sons.

Sorensen, H., Mortensen, K., **2005**, Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*, *Journal of Biotechnology*, 115: 113-128.

SurfE R One Control Version 3.5.2 **2004** IonGate Bioscience.

Sundaramurthy, V., Pieters, J., 2007, Interactions of pathogenic mycobacteria with host macrophages. *Microbes and Infection.*, 9, 1671-1679.

Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Moncelli, M., Fendler, K., **2008**, Charge transfer in P type ATPases investigated on planar membranes, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 476, 75 – 86.

Tadini-Buoninsegni, F., Bartolommei, G., Moncelli, M., Guigelli, R., Inesi, G., **2006**, Pre-steady State Electrogenic Events of $\text{Ca}^{2+}/\text{H}^{+}$ Exchange and Transport by the Ca^{2+} -ATPase, *Journal of Biological Chemistry*, 49; 37720-37727.

Terpe, K., **2006**, Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 72; 211-222.

Thever, M., Saier, M., **2009**, Bioinformatic Characterization of P-type ATPases Encoded Within the Fully Sequenced Genomes of 26 Eukaryotes, *J. Membrane Biol.*, 229; 115-130.

Tomashefski J., Farver C. **2008** Tuberculosis and Nontuberculous Mycobacterial Infections. *Dail and Hammar's Pulmonary Pathology*. Vol 1. Cap 9. Ed Springer, 3 ed. Ciudad New York, USA.

Tuberculist Database, Institute Pasteur, <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>

Ulrichs, T., Kaufmann, S., **2003**, Immunology and Persistence, in *Mycobacteria and TB.*, Ed Karger, Vol 2, pag 112-127.

Vergne, I., Chua, J., Singh, S., Deretic, V., **2004**, Cell biology of *Mycobacterium tuberculosis* phagosome, *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 20, 367-394.

Yatime, L., Buch-Pedersen, M., Musgaard, M., Morth, J., Winther, A., Pedersen, B., Olesen, C., Andersen, J., Vilsen, B., Schiott, B., Palmgren, M, Moller, J., Nissen, P., Fedosova, N.,**2009**, P-type ATPases as drug targets: Tools for medicine and science. *Biochimica et Biophysica Acta*,1787, 207-220.

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

Wayne, L., Hayes, L. **1996**, An In vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two stages of nonreplicating persistence. *Infect. Immun.*, 64, 2062-2069.

WHO, World Health Organization **2012**, WHO Report 2012: Global Tuberculosis Report. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ Consultado 12.11.2012.

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