UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

Determinación de características funcionales de CtpF, una Ca^{2+}-ATPasa tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*

Cristian Rosales Hernández

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

2019

Determinación de características funcionales de CtpF, una Ca^{2+}-ATPasa tipo P de *Mycobacterium tuberculosis*

Cristian Rosales Hernández

Tesis presentada como requisito parcial para optar al título de:

Magister en Ciencias-Bioquímica

Director:

Carlos Yesid Soto Ospina, Químico, Msc, PhD

Profesor titular

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Hospedero-Patógeno

Grupo de Investigación:

Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias, Departamento de Química

Bogotá, Colombia

2019

Whereof one cannot speak, thereof one must be silent.

Ludwig Wittgenstein.

Agradecimientos

Quiero expresar mi más sincera gratitud al profesor **Carlos Yesid Soto** por haberme dado la oportunidad de pertenecer a su grupo de investigación y por haberme guiado y asesorado durante el progreso de mi carrera científica en estos últimos seis años.

Agradezco a la **Universidad Nacional de Colombia** y al **Departamento de Química** por su excelente formación profesional y por brindarme herramientas para desarrollar este trabajo de investigación, incluyendo financiamiento para mi sostenimiento, a través de la **Dirección académica**, y para la divulgación de los resultados obtenidos en un congreso internacional, a través de la **Facultad de Ciencias** y la **Dirección de Bienestar**.

Agradezco a la **Dirección de investigación de la sede Bogotá** (**DIB**) por financiar el proyecto de investigación titulado “Determinación de Características Funcionales de CtpF, una Ca^{2+}-ATPasa de *Mycobacterium tuberculosis* – Código 40816” y su apoyo económico a través de la Convocatoria Nacional para el Apoyo a la Movilidad Internacional de la Universidad Nacional de Colombia 2017-2018.

Agradezco a **Colciencias** por su financiación para la participación en un evento internacional por medio del proyecto “Transporte iónico mediado por ATPasas tipo P en la membrana plasmática de *Mycobacterium tuberculosis* fase 2: Blancos de atenuación y viabilidad”.

Quiero agradecer a la profesora **Elianna Castillo Serna** por su instrucción y asesoría en la determinación de calcio y sodio a través de la técnica de espectroscopía de absorción atómica.

Agradezco a al profesor **Pedro Filipe de Brito Brandão** y a los miembros de su grupo de investigación por su colaboración y amistad.

Agradezco a los profesores **Mauricio Urquiza**, **Martha Nancy Calderón** y **Harold Ardila** por su evaluación, comentarios y recomendaciones durante las asignaturas Seminario de

Investigación I y II, pues tales sugerencias dieron forma a buena parte del resultado final de este trabajo.

Agradezco al profesor **Marco Fidel Suárez** por ser un gran docente y un modelo para seguir.

Agradezco a mis compañeros del grupo de investigación **Bioquímica y Biología Molecular de las Micobacterias** por su compañía durante todo este tiempo. Agradezco especialmente a **Lorena Novoa** y a **Andrés León** por todas sus enseñanzas y consejos a nivel científico y personal, a **Laudy** y **Paola** por su apoyo, a **Marcela** por su actitud, a **Jessica** por su ternura, a **Mile** por su sincera amistad y a mis compañeras de maestría **Biviana**, **Tere** (Claudia) y **Vanessa** por su compañía y sus historias.

Agradezco a todas mis amigas y amigos por escucharme, aconsejarme y turnarse cada viernes para acompañarme a discutir sobre posibles soluciones para muchos de los inconvenientes que surgieron durante este proceso de aprendizaje. A **La Familia**, especialmente gracias por todos los momentos que hemos compartido juntos.

Agradezco a **mi familia** por ser una fuente de inspiración y motivación para nunca detenerme y seguir siempre adelante.

Agradezco a **Dennisse** por todo su amor y comprensión.

Y al **Universo** por sus infinitas posibilidades.

Resumen

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), una enfermedad infecciosa que causó 1,3 millones de muertes en el año 2017 (de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud, WHO), de las que 0,3 millones correspondieron a pacientes coinfectados con VIH. Diversos compuestos quimioterapéuticos y la vacuna BCG son utilizados para el tratamiento de esta enfermedad, pero el surgimiento de cepas multirresistentes y extra-resistentes a los medicamentos además de la eficacia variable de la vacuna han dificultado su control, haciendo a la TB una de las 9 causas de muerte más frecuentes a nivel mundial.

La respuesta del sistema inmune a la infección con *Mtb* comprende su confinamiento en macrófagos al interior de los que el bacilo es sometido a distintas condiciones de estrés como el aumento en la concentración de iones metálicos, reducción de la tensión de oxígeno y la presencia de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno. De manera interesante, el comportamiento transcripcional de los 12 genes de ATPasas tipo P codificados en el genoma de *Mtb* se ve afectado por una o varias de estas condiciones. CtpF, el homologo micobacteriano de la SERCA Ca^{2+}-ATPasa de eucariotas superiores, es la ATPasa que responde a un mayor número de condiciones de estrés, especialmente condiciones de hipoxia; además *ctpF* es uno de los genes regulados por DosR, regulador global en la adaptación del bacilo tuberculoso al ambiente anaeróbico del macrófago y la entrada al estado de latencia.

A través de análisis bioinformáticos y estudios i*n vitro* se ha logrado asociar la actividad ATPasa de CtpF con el transporte de calcio. La evidencia muestra que la hidrólisis de ATP es estimulada por el Ca^{2+} y, de manera indirecta, se ha observado que contribuye a la tolerar la intoxicación con el metal. No obstante, hasta el momento no ha sido posible verificar la especificidad iónica de CtpF, dado que los experimentos también permiten postular a Na^{+} y a K^{+}, además de Ca^{2+}, como posibles cationes transportados. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue comprobar la especificidad iónica de CtpF, a través

del estudio de la acumulación de calcio en células completas y vesículas de membrana de *M. smegmatis* expresando CtpF de *M. tuberculosis* de forma heteróloga. Como vector de expresión se utilizó pMV261, un vector lanzadera de micobacterias basado en el promotor de choque térmico de *Mycobacterium bovis* Hsp60. También se analizó el comportamiento de la ATPasa Pma1, homólogo de CtpF en *Mycobacterium smegmatis*, con el fin de comparar su respuesta en los ensayos de acumulación y así inferir si sus funciones son equivalentes.

Los resultados muestran que las células de *M. smegmatis* wt y de un mutante defectivo en el gen *pma1*, transformadas con recombinantes de CtpF y Pma1, acumulan menos calcio que las cepas silvestres o mutante transformadas con el vector pMV261, sugiriendo que las ATPasas están involucradas en el eflujo de este ion desde la cara citoplasmática de la membrana. La intoxicación con Na^+ y Na^+/K^+ de estas células no muestra una acumulación significativa de estos iones en las cepas recombinantes, lo que da soporte a este hallazgo. La acumulación en vesículas de membrana confirmó la dirección del transporte, toda vez que esta ha sido mayor en las vesículas sobre expresando el transportador. Durante la preparación de las vesículas se favorece una configuración *inside-out* que expone los dominios citoplasmáticos al exterior de estas. Esta evidencia experimental corrobora que CtpF es una ATPasa calcio-dependiente que está involucrada en la homeostasis de calcio al transportarlo desde el interior hacia el exterior celular.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas tipo P2A, CtpF, Absorción Atómica, Acumulación.

Abstract

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) is the etiologic agent of tuberculosis (TB), an infectious disease that caused 1,3 million deaths during 2016 among which 0.4 million were from patients coinfected with VIH. Different strategies that include chemotherapy and the BCG vaccine are currently employed to treat and limit the spread of the disease. Unfortunately, the evolution of multidrug resistant and extra resistant *Mtb* strains plus the wide variability of the vaccine's efficiency and poor effectivity against pulmonary TB have affected its control, making it the ninth human death cause worldwide.

Immune system's response to the *Mtb* infection includes its engulfing by macrophages which in turn put it in an environment with severe stress conditions like a high load of heavy metal ions, a reduced oxygen tension and different ROS and NOS. Interestingly, the transcriptional behaviour of 12 putative ATPase genes coded in the bacillus genome is affected due to those unfavourable conditions. CtpF, the closest mycobacterial homologue to the eukaryotic ATPases, specifically the SERCA Ca^{2+}-ATPase, is shown to respond to more stress conditions than any of the other ATPases, especially hypoxic conditions. In addition, the *ctpF* gene is part of the DosR regulon, involved in the adaptation of the bacteria to the anaerobic conditions inside the macrophage and its transition to the latency state.

Using bioinformatic tools and *in vitro* assays, it has been possible to associate the ATPase activity of CtpF to calcium transport. Experimental evidence suggests that ATP hydrolysis is calcium-dependent and its role in calcium homeostasis has been indirectly observed as it provides cells with tolerance against this metal. However, the ionic specificity of this transporter has not been fully stablished yet because it has also shown to be stimulated by K^+ and Na^+. Consequently, the main goal of this work was to confirm the ion specificity of CtpF through metal accumulation assays on whole cells and membrane vesicles from *M. smegmatis*, enriched with CtpF expressed under the control of the Hsp60 heat-shock promoter of the mycobacterial shuttle vector pMV261. Pma1, the *Mycobacterium smegmatis* homologue of CtpF was included in these assays to compare its response and thus infer whether their functions are equivalent or not.

The results show that *M. smegmatis* and *M. smegmatis* ΔPma1 recombinant cells expressing CtpF accumulate less calcium than the respective wild-type strain and mutant strain, suggesting that CtpF is involved in the Ca^{2+} efflux from the cytoplasmic side of the membrane. Na^{+} and Na^{+}/K^{+} intoxication showed no preferential accumulation in the recombinant or wild-type cells, which supports this affirmation. Calcium accumulation in membrane vesicles is also in agreement with those results as CtpF-enriched, *inside-out* vesicles accumulate more calcium than their wild-type and mutant counterparts. This experimental evidence allows the association of CtpF with calcium homeostasis in the mycobacterial cell.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, P2A ATPases, CtpF, Atomic Absorption, Accumulation.

Contenido

Pág.

1. Marco teórico 5
1.1 La tuberculosis 5
1.1.1 Envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis* 10
1.1.2 Supervivencia de *Mtb* en el fagosoma 13
1.1.3 Regulador DosR y estado de latencia 16
1.2 Transporte a través de la membrana plasmática 17
1.2.1 Canales 20
1.2.2 Transportadores 21
1.3 ATPasas tipo P 24
1.3.1 Dominios estructurales 25
1.3.2 Ciclo catalítico 26
1.3.3 Clasificación de las ATPasas tipo P 28
1.3.4 SERCA Ca^{2+}-ATPasa 31
1.4 Transporte de calcio en bacterias 36
1.4.1 Transporte pasivo 37
1.4.2 Transportadores activos 39
1.4.3 Proteínas de unión a calcio 41
1.5 CtpF es una Ca^{2+}-ATPasa de *M. tuberculosis* 43

2. Hipótesis Experimental 47

3. Objetivos 49
3.1 Objetivo General 49
3.2 Objetivos específicos 49

4. Materiales y métodos 51
4.1 Comparación *in silico* de CtpF y Pma1 51
4.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo 51
4.3 Oligonucleótidos y amplificación por PCR 52
4.4 Construcción del recombinante CtpF en pMV261 55
4.4.1 Clonación del gen *ctpF* en el vector pGEMT-Easy 55
4.4.2 Clonación del gen *ctpF* + His tag en el vector pMV261 57
4.4.3 Expresión heteróloga de CtpF en *Mycobacterium smegmatis* 58
4.5 Ensayos de acumulación en células completas 60
4.5.1 Ensayo de acumulación de Ca^{2+} 60
4.5.2 Ensayo de acumulación de Na^{+} y Na^{+}/K^{+} 61
4.6 Ensayos de acumulación en vesículas de membrana 62
4.6.1 Obtención de vesículas de membrana 62

4.6.2 Actividad ATPasa de las vesículas de membrana 62
4.6.3 Acumulación de Ca^{2+} en vesículas de membrana 63

5. Resultados y discusión 65
5.1 Comparación *in silico* de las proteínas CtpF y Pma1 65
5.1.1 Alineamiento múltiple 65
5.1.2 Árbol filogenético 67
5.1.3 Sitios de unión a calcio 69
5.2 Expresión heteróloga de CtpF en *Mycobacterium smegmatis* 72
5.2.1 Clonación de *ctpF* en el vector pGEMT-Easy 72
5.2.2 Clonación de *ctpF* en el vector de expresión de micobacterias pMV261 76
5.2.3 Transformación de *M. smegmatis* mc^2155 wt y Δ3926 79
5.2.4 Expresión de CtpF desde el recombinante pLNA29 en *M. smegmatis* 80
5.3 Efecto de CtpF sobre la acumulación de calcio en células completas de *Mycobacterium smegmatis* 84
5.3.1 Acumulación de Ca^{2+} 84
5.3.2 Acumulación de Na^{+} 86
5.4 Efecto de CtpF sobre la acumulación de calcio en vesículas de membrana de *Mycobacterium smegmatis* 88
5.4.1 Acumulación de calcio en vesículas de membrana 89
5.4.2 Sensibilidad a vanadato de sodio 91
5.5 Comparación *in vitro* del efecto de Pma1 y CtpF sobre la acumulación de calcio en *M. smegmatis Δ3926* 93
5.5.1 Acumulación en células completas 93
5.5.2 Acumulación en vesículas de membrana 96

6. Conclusiones y perspectivas 99
6.1 Conclusiones 99
6.2 Perspectivas 100

Lista de figuras

Pág.
Figura 1-1. Ciclo infección por *Mtb* (8). 6
Figura 1-2. Sitios y mecanismos de acción de algunos agentes anti micobacterianos (14). 8
Figura 1-3. Representación esquemática de la envoltura celular de *Mtb* (20). 11
Figura 1-4. Permeabilidad de una bicapa lipídica pura a distintos solutos (45). 18
Figura 1-5. Tipos de transportadores de la membrana plasmática. Los transportadores pueden ser divididos en dos grandes clases: Transportadores pasivos o transportadores activos. Dentro de los transportadores pasivos se encuentran los *carriers* y canales, en los cuales el proceso de transporte es sólo una difusión facilitada. Por otra parte, los transportadores activos pueden ser de dos tipos principales: primarios, en los que se utiliza energía para transportar el soluto (luz o ATP) o secundarios, en los que se usa el gradiente electroquímico de otro soluto para energizar el transporte (46). 19
Figura 1-6. Esquema de la alternancia entre estados en un transportador de tipo *uniporte* (46). A diferencia de los canales, estas proteínas sufren cambios conformacionales durante el evento de transporte en los que existe diferente afinidad por los solutos transportados. 22
Figura 1-7. Tipos de ATPasas (45). 24
Figura 1-8. Dominios estructurales de las ATPasas tipo P (54). 26
Figura 1-9. Esquema del ciclo catalítico de las ATPasas tipo P (59). 27
Figura 1-10. Estructura de la SERCA-ATPasa y sitios de unión a Ca^{2+} (79). 32
Figura 1-11. Comparación de las isoformas de SERCA2, 1a y 1b (86). 34
Figura 1-12. Comparación de estructuras de la sarcolipina y el fosfolambano (85). 36
Figura 1-13. Canal PHB (88). 39
Figura 1-14. Clasificación de las ATPasas tipo P de *Mtb* (118). 44
Figura 1-15. Esquema del comportamiento transcripcional del gen *ctpF* de *Mtb* en respuesta a condiciones de estrés (4). 45
Figura 1-16. Superposición de los residuos que constituyen los sitios de unión a Ca^{2+}en SERCA y CtpF (123). 46
Figura 5-1. Alineamiento múltiple de 12 ATPasas tipo P2 construido con MUSCLE (127) y visualizado en Jalview (125). Se utiliza una escala de colores azules para presentar el grado de conservación de los residuos en todas las secuencias. Se compararon el (A) motivo de defosforilación, TGES, y (B) el motivo de fosforilación DKTGTLT. 66
Figura 5-2. Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple de 12 ATPasas P2 seleccionadas construido bajo una estimación de máxima verosimilitud y un modelo tipo Whelan and Goldman. Los valores Bootstrap evidencian el número de veces que cada

una de las ramas apareció durante las 100 reconstrucciones del árbol. La longitud de las ramas se mide en número de sustituciones por sitio. 67
Figura 5-3. Comparación de los residuos involucrados en la coordinación de los iones Ca^{2+} en las ATPasas P2 seleccionadas. (A) Aminoácidos pertenecientes a los dos sitios de unión a calcio del transportador SERCA. Los residuos Asn768, Glu771, Thr799, y Glu908 conforman el denominado sitio I, ubicado más cerca a la cara citoplasmática que el sitio II, conformado a su vez por Val304, Ala305, Ile307, Glu309 y Asn796. El residuo Asp800 participa en la coordinación de los dos cationes. Tomado de (79). (B). Alineamiento múltiple de las 12 ATPasas tipo P2 seleccionadas en el que se demarcan los dominios transmembranales TM4, TM5, TM6 y TM8, los que contienen los residuos involucrados en la unión a calcio (flechas negras, la numeración corresponde a SERCA), basado en el alineamiento preparado por Faxén y colaboradores (105). 70
Figura 5-4. Esquema de amplificación del gen *ctpF* desde DNA genómico de *Mtb* Ra, con detalle del diseño de los iniciadores para contemplar la inclusión de sitios de corte con enzimas de restricción y una etiqueta de 6 histidinas. 72
Figura 5-5. Optimización de la concentración de iniciadores y DMSO para la amplificación del gen *ctpF* desde DNA genómico de *M. tuberculosis* Ra. 72
Figura 5-6. Mapa de los dos posibles productos de ligación en pGEMT-Easy del fragmento de extremos romos de *ctpF*. 73
Figura 5-7. Comprobación de colonias positivas seleccionadas tras la transformación con los productos de la ligación de *ctpF* en pGEMT-Easy. Las colonias fueron obtenidas a partir de la relación 1:3, única para la que se obtuvieron colonias blancas. 74
Figura 5-8. Mapeo con enzimas de restricción del plásmido pLNA24a obtenido de las colonias 1 y 6, comparado con una predicción *in silico* construida en el programa ApE.. 76
Figura 5-9. Esquema de la purificación desde un gel de agarosa al 2% del fragmento que contiene al gen *ctpF*, obtenido tras la digestión de pLNA24 con *Bam*HI y *Hind*III. 77
Figura 5-10. Mapa del recombinante pLNA29 donde se señala la región de anillamiento de los iniciadores pMVComp Up y F-RT-Rev y el resultado de la PCR de comprobación sobre las colonias seleccionadas. Se observa que sólo las colonias C1 y C2 presentan una amplificación del producto esperado, de manera similar al control positivo. 78
Figura 5-11. Mapeo de restricción del recombinante pLNA29 extraído de las colonias 1 y 2, comparado con el obtenido utilizando el programa ApE. 78
Figura 5-12. Comprobación de la transformación con el recombinante pLNA29 de colonias seleccionadas de *M. smegmatis* mc^2155 wt utilizando dos parejas de iniciadores. 79
Figura 5-13. A. PCR de comprobación para verificar la ausencia del gen *pma1* en el genoma de la cepa Δ3926. B. PCR de comprobación para verificar la presencia del recombinante pLNA29 o el vector vacío pMV261 en colonias obtenidas a partir de la cepa mutante. 80
Figura 5-14. Expresión por choque térmico a 45°C de CtpF desde el recombinante pLNA29, analizado por SDS-PAGE (A) y Western-Blot (B). 81
Figura 5-15. A. Expresión relativa del gen *ctpF* desde el vector de expresión pLNA29 en *M. smegmatis* wt y *M. smegmatis* Δ3926 en función del tiempo de inducción por choque térmico a 45 °C, respecto a la expresión del gen *RNA 16S*. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un triplicado técnico. B. Arriba, DotBlot de

vesículas de membrana (50 µg) de las cepas control y recombinantes, comparadas con 50 µg de un control positivo de CtpA recombinante marcada con una etiqueta de seis histidinas; abajo, DotBlot de vesículas de membrana control para verificar que inespecificidad detectada no varía de manera proporcional a la concentración de proteína. El DotBlot se llevó a cabo usando un anticuerpo primario dirigido contra la etiqueta de histidinas (6x-His Epitope Tag Antibody Rabbit, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate, Thermo Fisher Scientific). 82

Figura 5-16. A. Modelo planteado para el funcionamiento de CtpF: La ATPasa se encarga de regular la concentración intracelular de calcio utilizando la energía del ATP para movilizarlo en contra de su gradiente de concentración. B. Acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación t student, P<0,05. 85

Figura 5-17. Acumulación de sodio en ausencia y presencia de potasio en células completas de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias. 87

Figura 5-18. A. Modelo planteado para la orientación de CtpF en las vesículas de membrana: Los dominios citoplasmáticos quedan expuestos hacia el exterior de la vesícula y, adicionalmente, se invierte la dirección de transporte del cation. B. Actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana utilizadas en el ensayo de acumulación. C. Acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. En ambas gráficas, las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un duplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación t student, P<0,05. 90

Figura 5-19. Porcentaje de acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis* Δ3926 transformada con pMV261 o el recombinante de CtpF. Se definió como 100% la cantidad de calcio acumulada por las vesículas control (pMV261) en ausencia de vanadato de sodio y los demás valores fueron normalizados respecto a esta. Los puntos representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un triplicado técnico para cada valor de concentración de Na_3VO_4. 92

Figura 5-20. A. Acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05. **B.** Acumulación de sodio en ausencia y presencia de potasio en células completas de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. No hay diferencia

estadísticamente significativa entre las medias. Una comparación de la cantidad de calcio absoluta acumulada por cada cepa silvestre y mutante se presenta en la Figura C-1 (anexo C)....95
Figura 5-21. A. Actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana utilizadas en el ensayo de acumulación. **B.** Acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. En ambas gráficas, las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un duplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05. 96

Lista de tablas

Pág.
Tabla 1-1. Mecanismos de transporte a través de la membrana (45). 19
Tabla 4-1. Cepas bacterianas utilizadas en el desarrollo de este trabajo. 52
Tabla 4-2. Listado de oligonucleótidos utilizados en las PCR llevadas a cabo durante este trabajo. La región complementaria a *ctpF* de los iniciadores Fcm2 Dir y Fpmv Rev se muestra en minúscula. 52
Tabla 4-3. Programas de PCR utilizados para las comprobaciones, la amplificación del gen *ctpF* y los ensayos de RT-qPCR llevados a cabo en este estudio. 54
Tabla 5-1. Listado de 12 ATPasas tipo P2 seleccionadas para el alineamiento múltiple. 65

Lista de abreviaturas[1]

ABREVIATURA	TÉRMINO
ABC*	Casete de unión a ATP (*ATP binding cassette*)
ADP	Adenosín difosfato
AG	Arabinogalactano
ATP	Adenosín trifosfato
BCG	Bacilo Calmette-Guerin
CL	Cardiolipina
DAT	Diaciltrehalosa
Dec-P	Decaprenil fosfato
DMSO	Dimetil sulfóxido
dNTP's*	Desoxirribonucleótidos (A, C, T o G)
HR-CS GF AAS*	Espectroscopía de absorción atómica con horno de grafito y fuente continua de alta resolución.
IPTG	Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido
LM	Lipomanano
ManLAM*	Lipoarabinomanano
MDR*	Multi-farmaco resistente (*Multi-drug resistant*)
MM	Micomembrana
Msm	*Mycobacterium smegmatis*
Mtb	*Mycobacterium tuberculosis*
NOS*	Especies reactivas de nitrógeno (*Reactive nitrogen species*)

[1] Las abreviaturas marcadas con asterisco (*) provienen del inglés.

ORF*	Marco abierto de lectura
PCR*	Reacción en cadena de la polimerasa
PE*	Fosfatidiletanolamina
PG	Peptidoglicano
PHB	Polímero lipídico poli-3-hidroxibutirato
PILAM*	Fosfatidilinositol lipoarabinomanano
PIM*	Fosfatidilinositol manósido
PMCA*	Bomba ATPasa de la membrana plasmática
ROS*	Especies reactivas de oxigeno (*Reactive oxygen species*)
SDS-PAGE*	Electroforesis en gel de poliacrilamida/dodecilsulfato de sodio
SERCA*	Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarcoendoplasmático (*Sarcoendoplasmic reticulum* Ca^{2+}*-ATPase*)
SLs	Sulfolípidos
SPCA	Bomba ATPasa de la via secretoria (*Secretory pathway* Ca^{2+}*-ATPase*)
TAE	Buffer Tris/Acetato/EDTA
TB	Tuberculosis
TBE	Buffer Tris/Borato/EDTA
TDM*	Dimicolatos de trehalosa
TE	Buffer Tris/EDTA
Tm*	Temperatura de fusión o de *melting*
TMM*	Monomicolatos de trehalosa
TMS*	Segmento transmembranal
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
WHO*	Organización mundial de la salud (*World health organization*)
XDR*	Extra-farmaco resistente (*Extra-drug resistant*)
X-GAL	5-bromo-4-cloro-3-indolil- β-D-galactopiranosido

Introducción

Mycobacterium tuberculosis (*Mtb*) es el agente etiológico de la tuberculosis (TB), una enfermedad infecciosa que de acuerdo con la Organización Mundial de la Salud (WHO) causó 1,3 millones de muertes en el año 2017, y de las cuales 0,3 millones correspondieron a pacientes coinfectados con el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH) (1). En la actualidad, la TB es una de las causas más frecuentes de muerte a nivel mundial y tiene una alta incidencia en regiones como el sureste asiático y el sur de África, donde el contexto socioeconómico dificulta el acceso y adherencia al tratamiento. A pesar de que existen varios tratamientos para la TB, su control se ha dificultado debido a la aparición de cepas multirresistentes (MDR) y extra-resistentes (XDR) a los fármacos antituberculosos, la eficiencia variable de la vacuna BCG (bacilo Calmette-Guerin), la coinfección con VIH y el hecho de que la mayoría de los tratamientos están dirigidos contra el bacilo en su estado activo, pero no funcionan durante la etapa de latencia donde no se presentan manifestaciones clínicas de la enfermedad. La mortalidad de la TB ha venido disminuyendo a una tasa del 3% anual pero aún es necesario sumar esfuerzos para cumplir con la primera de las metas de la estrategia para el fin de la TB (1) por lo que la investigación y desarrollo de nuevas vacunas y medicamentos antituberculosos cobra especial importancia. Una forma de contribuir a la búsqueda de soluciones para esta problemática es a través del estudio de marcadores biológicos relacionados con la virulencia, latencia y viabilidad del bacilo tuberculoso.

Durante la infección con *Mtb*, el bacilo se enfrenta a las condiciones hostiles del ambiente intrafagosomal tales como un pH ácido, presencia de especies reactivas de nitrógeno y oxígeno (ROS y NOS) y concentraciones tóxicas de cationes de metales pesados (2). *Mtb* debe poseer entonces un repertorio de estrategias que le permitan contrarrestar el efecto de estas condiciones de estrés y garantizar así su supervivencia durante largos periodos de latencia (3). De manera interesante, el genoma de *Mtb* codifica 12 ATPasas tipo P que según estudios de su comportamiento transcripcional, responden en diferentes proporciones a las condiciones de estrés (4). De estas 12 ATPasas, CtpF, una posible

Ca^{2+}-ATPasa, exhibe una respuesta transcripcional a un mayor número de condiciones de estrés, especialmente a condiciones de hipoxia, en comparación con las demás ATPasas tipo P. CtpF de *Mtb* es el homólogo micobacteriano más cercano a las ATPasas tipo P de eucariotas. Análisis bioinformáticos han revelado una considerable similitud estructural entre CtpF y la SERCA ATPasa de eucariotas superiores, por lo que inicialmente su actividad se asocia al transporte activo primario de Ca^{2+}. En nuestro grupo de investigación se ha trabajado en la construcción de un mutante de *Mtb* defectivo de CtpF para su caracterización. Diferentes experimentos *in* silico e *in* vitro realizados por nosotros han sugerido que CtpF es una ATPasa tipo P vanadato-sensible y calcio-dependiente, además de ser capaz de sensibilizar la célula a condiciones de estrés oxidativo cuando es delecionada del genoma de las micobacterias.

Hasta el momento no ha sido posible verificar la especificidad iónica de CtpF, dado que los experimentos también permiten postular a Na^{+} y a K^{+}, además de Ca^{2+}, como posibles cationes transportados. En este sentido, el objetivo principal de este trabajo es aportar evidencia que permita corroborar el papel de CtpF como transportador de calcio a través de la membrana plasmática. La estrategia experimental utilizada para abordar este problema se basa en la construcción de un recombinante de CtpF con el fin de lograr su expresión en *Mycobacterium smegmatis* (*Msm*), una bacteria que al ser no virulenta y tener un tiempo de generación considerablemente menor que el de *Mtb*, es un modelo más adecuado para estudiar proteínas recombinantes de micobacterias, además de ofrecer una maquinaria para su producción más similar a la de *Mtb*, comparada con la de otros organismos comúnmente utilizados para tal fin como *Escherichia coli*. Este modelo se empleará para estudiar el efecto de la sobreexpresión del transportador sobre la acumulación de calcio tanto en células completas como en vesículas de membrana. Además, se compara la respuesta de Pma1, el homólogo de CtpF en *Msm*, en los ensayos de acumulación con el fin de inferir si su función en esta micobacteria ambiental es equivalente a la de CtpF.

Este trabajo aporta una metodología para cuantificar la acumulación de metales alcalino/alcalinotérreos en células completas y vesículas de membrana basada en espectroscopía de absorción atómica, utilizada generalmente para la cuantificación de metales pesados (5). En su desarrollo se introducen cambios en la manera que se cultivan las células, se intoxican, se recolectan y se digieren, además de una prueba de viabilidad

que garantiza que éstas no mueren durante la intoxicación. Estos ensayos son complementarios a los ensayos de actividad ATPasa en tanto que permiten evidenciar si el enriquecimiento con un transportador tiene algún efecto sobre la concentración intracelular del catión hipotéticamente transportado, lo que da un indicio de su dirección de flujo.

A continuación, se presentará una revisión de los conceptos importantes involucrados en el desarrollo de este trabajo, seguida de la hipótesis experimental y el objetivo general. Posteriormente se hará una descripción detallada de la metodología experimental usada para lograr los objetivos propuestos, los resultados obtenidos y una discusión de estos a la luz de la teoría en que se basó el diseño de los experimentos. Finalmente, se presentarán las conclusiones que se siguen de la discusión y se pondrá al trabajo en perspectiva, respecto a las preguntas que surgieron al responder las que se plantearon en el desarrollo de esta tesis.

1. Marco teórico

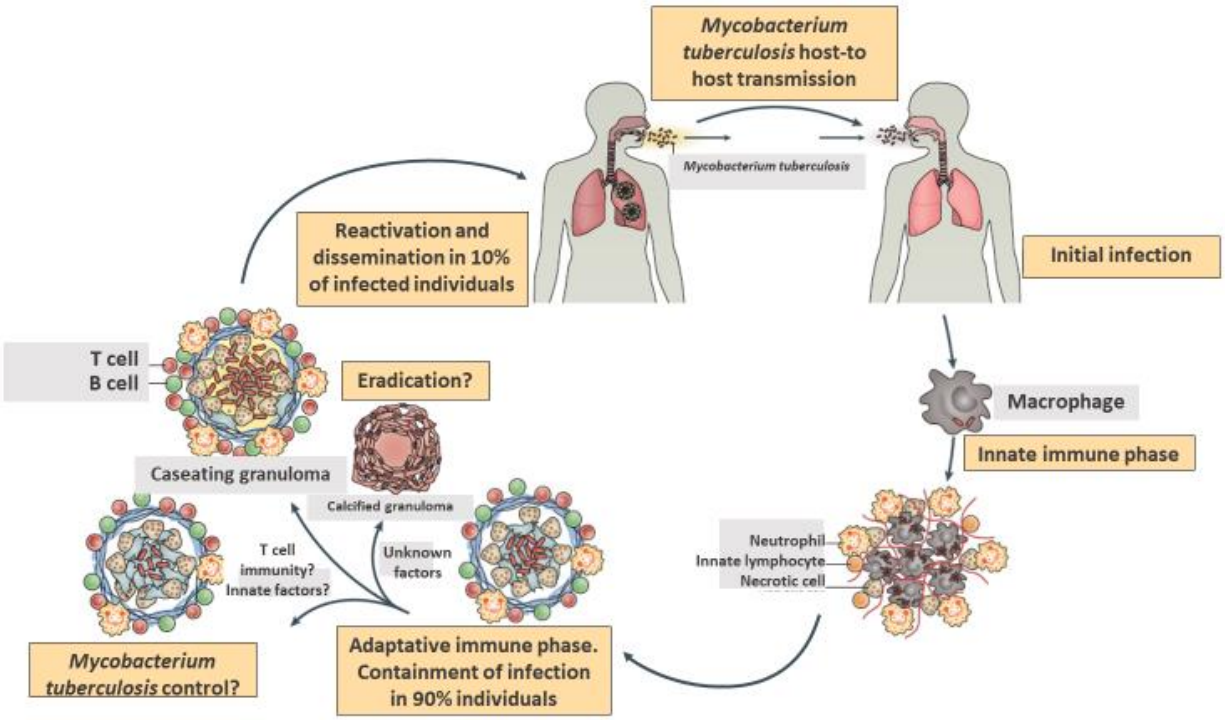
1.1 La tuberculosis

La tuberculosis (TB) es la novena causa de muerte más frecuente a nivel mundial y la principal causa de muerte por un agente infeccioso. Se estima que durante el año 2017 hubo alrededor de 1,3 millones de muertes de las cuales 0,3 millones fueron pacientes coinfectados con el virus VIH. Aproximadamente 10,0 millones de personas adquirieron la enfermedad durante el mismo año, siendo el 90% de ellos en personas adultas (≥15 años). Dos terceras partes de los casos se presentaron en la India (27%), China (9%), Indonesia (8%), Filipinas (6%), Pakistán (5%), Nigeria (4%), Bangladesh (4%) y Sudáfrica (3%). A nivel global, la proporción de enfermos que murieron de TB fue cercana al 16%, por lo cual aún sigue siendo necesario sumar esfuerzos con el fin de reducir esta tasa al 10%, de acuerdo con los objetivos de la estrategia *End TB* (1).

La enfermedad TB es causada por la bacteria patógena *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*), un bacilo ácido-alcohol resistente (resistente a la tinción de Gram), con un largo tiempo de generación (24 horas), una pared celular compleja, altamente hidrofóbica (6), con la capacidad de entrar en largos periodos de latencia y con diversos sistemas de eflujo y resistencia (enzimas tipo beta-lactamasa) que dificultan la acción de muchos medicamentos antimicrobianos (7). Este bacilo es transmitido por vía área en pequeñas gotas que al ser aspiradas se depositan los alveolos pulmonares (**Figura 1-1**). *Mtb* es una bacteria intracelular que, a pesar de poder infectar distintos tipos de célula, infecta a los macrófagos de los alveolos pulmonares de manera preferencial. Los estadios iniciales de la enfermedad se caracterizan por una respuesta inmune innata que involucra el reclutamiento de células inflamatorias en los pulmones. La inducción de una respuesta inmune adaptativa ocurre posteriormente, luego de que *Mtb* se disemina hacia los ganglios linfáticos. Allí, la presentación de antígenos bacterianos por células dendríticas da lugar a la expansión de células T antígeno-específicas, que se diferencian en células T efectoras

y migran al pulmón infectado junto a otros leucocitos que estimulan la formación de granulomas donde se confina a la bacteria. Dentro del granuloma, formado por macrófagos, linfocitos y fibroblastos, se cree que los macrófagos activados son quienes restringen la dispersión y replicación del bacilo (8).

Figura 1-1. Ciclo infección por *Mtb* (8).



La mayoría de los bacilos de *Mtb* son eliminados en los granulomas caseosos y el progreso de la enfermedad se detiene. Sin embargo, el patógeno no se erradica completamente en ciertos individuos pues el bacilo ha desarrollado estrategias que le permiten evadir el sistema inmune y sobrevivir en lo que se conoce como estado de latencia. Durante la infección activa, bacteria es capaz de resistir los mecanismos bactericidas del macrófago al prevenir la fusión del fagosoma y el lisosoma, multiplicarse en su interior y producir su necrosis. Diferencias en la respuesta inmune de distintos individuos dan lugar a lesiones granulomatosas fisiológicamente distintas; algunas son capaces de suprimir la viabilidad del bacilo mientras que otras promueven su persistencia (9). Los destinos del estado de latencia pueden ser una activación de la enfermedad en la que se observan los síntomas característicos, ocasionada cuando el sistema inmune del paciente se debilita y por ende

más probable en pacientes coinfectados con VIH, una infección asintomática que puede perdurar durante toda la vida del hospedero o la erradicación completa del bacilo (10, 11).

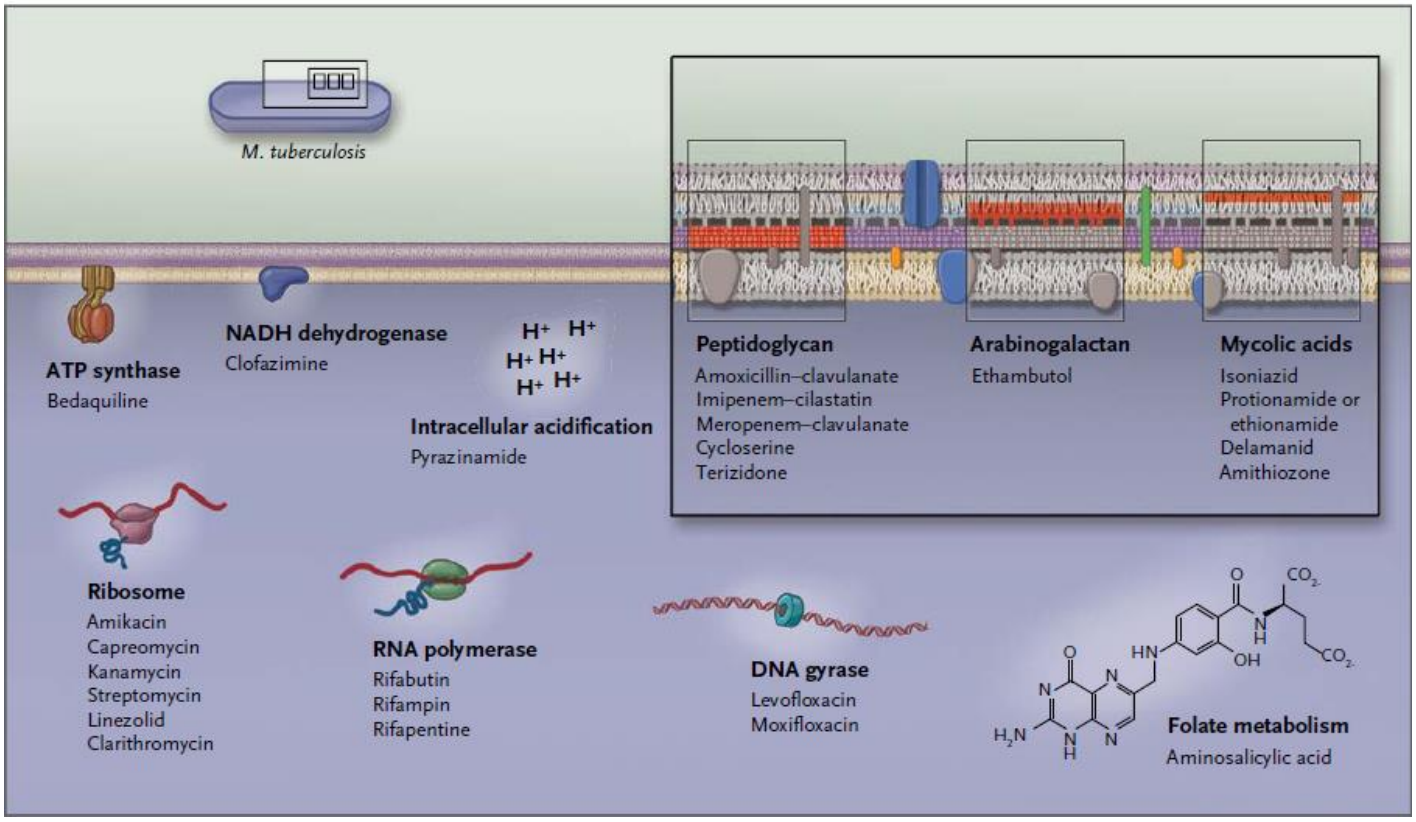
La transición del estado de latencia al estado activo de la enfermedad se ha asociado con los niveles de oxígeno a los que está expuesta la bacteria una vez ingresa al hospedero. Las infecciones con *Mtb* se presentan normalmente en los sitios más ricos en oxígeno del cuerpo, sugiriendo que la concentración de oxígeno es uno de los factores que restringe el crecimiento de la bacteria *in vivo*. Mientras que el número de bacterias es considerablemente alto en lesiones que se localizan cerca de aperturas de aire en los pulmones de pacientes infectados, las zonas que no poseen un contacto directo con el aire poseen una baja cantidad de bacilos. Otra pieza de evidencia que soporta esta idea es el hecho de que la reactivación desde latencia ocurre frecuentemente en la zona más rica en oxígeno del cuerpo, o sea, los lóbulos superiores de los pulmones. Además en algunos modelos animales las lesiones tuberculosas también predominan en zonas con alta tensión de oxígeno (12).

Dado que algunos modelos animales no poseen un verdadero estado de latencia (12), los estudios son complementados con modelos *in vitro.* Un ejemplo de estos es el modelo de hipoxia de Wayne, en el que un cultivo sellado con una proporción aire/medio definida se incuba por varios días, dando lugar al agotamiento de oxígeno con el paso del tiempo que conduce a un estado no replicativo del bacilo (3). La evidencia experimental hallada sugiere que, durante la anaerobiosis, hay un cambio hacia una actividad metabólica reducida en la que los genes que están involucrados en síntesis de proteínas, síntesis de DNA, división celular y síntesis de aminoácidos o lípidos, entre otros, son reprimidos. Parte de la resistencia de *Mtb* al tratamiento con antibióticos se ha asociado a que todos los medicamentos de primera línea están dirigidos contra bacterias aerobias y metabólicamente activas (13).

El tratamiento de la enfermedad se basa en el uso de medicamentos antituberculosos que se agrupan como medicamentos de primera y de segunda línea. El tratamiento estándar o de primera línea consiste en una fase de inducción de 2 meses con isoniazida, rifampicina y pirazinamida que puede ser complementado con etambutol si pudiera existir resistencia a alguno de los tres primeros, seguido de una fase de consolidación de 4 meses con isoniazida y rifampicina. Durante los dos primeros meses se observa una curva de muerte bifásica que indica la existencia de al menos dos subpoblaciones bacterianas que difieren

en su susceptibilidad intrínseca a los medicamentos. Esta diferencia puede ser explicada tanto por la baja susceptibilidad de los bacilos en estado no replicativo, como por la dificultad que poseen ciertos medicamentos para difundirse hasta el interior de los granulomas. A pesar de que en la mayoría de los casos 2 meses son suficientes para que dejen de aparecer bacilos en el esputo, se ha observado que la suspensión del tratamiento en ese punto puede dar lugar a recaídas dentro de los siguientes 12 meses (14).

Figura 1-2. Sitios y mecanismos de acción de algunos agentes anti micobacterianos (14).



Los medicamentos de segunda línea se hacen necesarios durante la infección con cepas que causan TB-MDR, definida como aquella en que las bacterias son resistentes tanto a rifampicina como a isoniazida. El tratamiento es complicado y debe ser planeado con base en resultados de pruebas de susceptibilidad de aislados de *Mtb* obtenidos del paciente y ensayados en cultivo o con métodos basados en DNA. La WHO recomienda que la fase de inducción se lleve a cabo con cuatro de los medicamentos a los cuales el aislado sea susceptible además de pirazinamida, durante un periodo de 6 a 8 meses. Dentro de este grupo de medicamentos se encuentran tioamidas como etionamida y protionamida, la bedaquilina, aminoglicósidos como la kanamicina, amikacina y la estreptomicina, y

fluoroquinolonas como la moxifloxacina y la levofloxacina, entre otros. En casos extremos, la TB puede ser causada por cepas extra-resistentes (XDR), resistentes a rifampicina, isoniazida, alguna fluoroquinolona y al menos uno de los medicamentos inyectables como kanamicina, capreomicina o amikacina. Para su tratamiento pueden ser efectivos medicamentos como el ácido para-aminosalicílico, la estreptomicina y la bedaquilina (15). El mecanismo de acción de varios de estos medicamentos no es compartido y tiene distintos objetivos celulares (**Figura 1-2**).

Un gran inconveniente del tratamiento con agentes micobacterianos es la baja adherencia de los pacientes al mismo. Entre el 16% y el 49% de los pacientes no termina el tratamiento debido a las reacciones adversas causadas por los medicamentos, el costo y la creencia de que la cura se logra cuando los síntomas desaparecen y no hay bacilos viables en el esputo (14). No obstante, las alternativas son limitadas. La vacuna BCG (bacilo de Calmette-Guerin) ha existido durante 80 años y es aún una de las vacunas más usadas, con más de un 80% de infantes vacunados en países donde es parte del programa de inmunización de la infancia, grupo en el que ha demostrado una buena efectividad contra la meningitis y la TB. Sin embargo, la vacuna no previene la infección primaria en adultos ni la reactivación de la TB pulmonar latente, la forma más común en la que se transmite el bacilo, por lo que su impacto en el control de la enfermedad es limitado (1).

En la actualidad existen 15 candidatos a vacuna contra la TB, de los cuales 13 se encuentran en ensayos clínicos. Estos candidatos se han desarrollado bajo estrategias diferentes: 1) una vacuna preventiva, que sea administrada antes de una primera exposición a *Mtb*; 2) una vacuna que sea aplicada en adolescentes y adultos con TB latente, luego de haber sido expuestos a BCG; o 3) una vacuna terapéutica que permita ser coadministrada con los medicamentos quimioterapéuticos (16). Dos de los candidatos en ensayos clínicos se basan en el uso de micobacterias vivas para estimular la respuesta del sistema inmune y están enfocados a ser vacunas preventivas, en reemplazo de BCG. El primero, denominado VPM1002 (fase IIb), fue construido a través de una modificación en el genoma de *M. bovis* que le permite perforar la membrana del fagolisosoma y así facilitar la liberación de antígenos micobacterianos en el citosol de los macrófagos(17) . El segundo, denominado MTBVAC (fase I), es una cepa de *Mtb* atenuada por medio de la deleción de los genes *phoP* y *fadD26*, involucrados en la regulación transcripcional de genes asociados con virulencia y lípidos de pared (18). En términos generales, se ha logrado un gran progreso en el desarrollo de vacunas contra TB, pero los candidatos

presentan ciertas limitaciones que deberán ser superadas a través de un mejor conocimiento de la patogénesis de *Mtb* y su interacción con el hospedero.

Respecto a los medicamentos antituberculosos, tres de los medicamentos más promisorios recientemente aprobados para su comercialización son la bedaquilina, un inhibidor de la enzima ATP sintasa, la delamanida, un inhibidor de la síntesis de la pared celular micobacteriana y la rifapentina, un inhibidor de la actividad DNA-dependiente de la enzima RNA polimerasa. A pesar del avance significativo en el desarrollo de este tipo de medicamentos, aun se puede innovar en nuevos tipos de compuestos que se conviertan en la base para la búsqueda de una nueva ola de antituberculosos, haciendo uso de los conocimientos adquiridos sobre la biología de *Mtb* y el surgimiento de nuevas dianas terapéuticas (19).

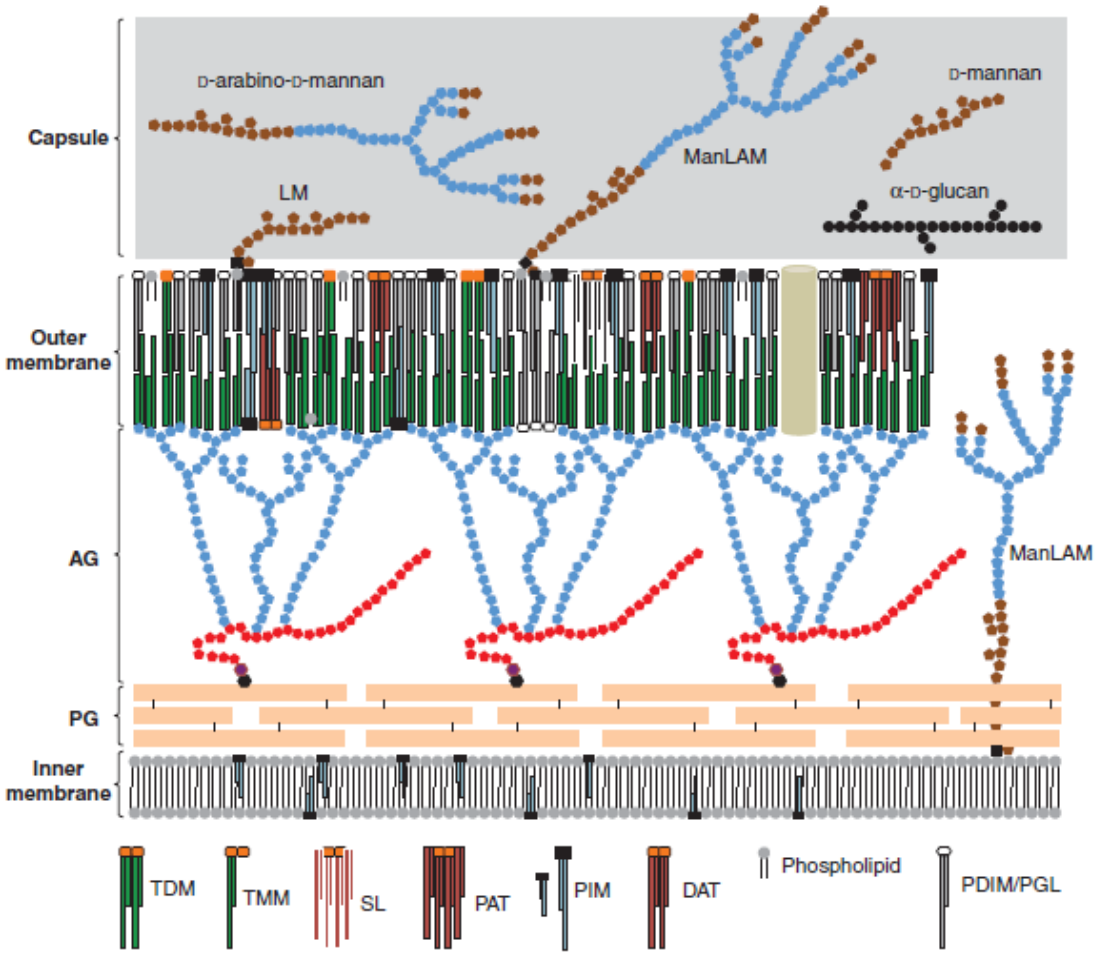
Teniendo en cuenta este panorama, la búsqueda de herramientas que permitan lograr un control más efectivo de la enfermedad cobra especial importancia, teniendo en cuenta tanto las limitaciones de los medios actuales como las metas trazadas por la estrategia *End TB* (1). Para ello es útil revisar algunas de las características principales de *Mtb* relacionadas con su resistencia a los medicamentos y su supervivencia en el hospedero, como la estructura de su envoltura celular y su comportamiento al interior del fagosoma y durante el estado de latencia.

1.1.1 Envoltura celular de *Mycobacterium tuberculosis*

La alta hidrofobicidad de la envoltura celular de las micobacterias (6), responsable por su baja permeabilidad, les confiere características únicas como su resistencia a la tinción de Gram, y la baja difusión de medicamentos hacia su interior. Adicionalmente, algunos de los componentes de la pared al parecer están involucrados con la forma en que la bacteria es fagocitada y su interferencia en la respuesta inmune del hospedero, que finalmente logra favorecer la supervivencia del bacilo durante la infección.

A través de estudios de microscopia electrónica de transmisión ha sido posible determinar que la estructura de la envoltura celular micobacteriana está organizada en capas (**Figura 1-3**) y que comparte una semejanza más cercana con la envoltura de bacterias gramnegativas, como los miembros de la división *Proteobacteria*, que con la envoltura de bacterias grampositivas como *Micrococcus.* Los componentes que se han logrado identificar son la membrana plasmática, una pared celular y una capa externa o cápsula.

Figura 1-3. Representación esquemática de la envoltura celular de *Mtb* (20).



La membrana plasmática está compuesta de lípidos con extremos hidrofílicos y compuestos de cadenas lipídicas basadas en mezclas de cadenas saturadas, insaturadas y monoetil ramificadas de menos de 20 átomos de carbono. Los mayores constituyentes de las membranas aisladas son el ácido palmítico ($C_{16:0}$), el ácido oleico ($C_{18:1}$) y el ácido 10-metiloctadecanoico. Por su parte, los principales fosfolípidos son el fosfatidilinositol manósido (PIM), el fosfatidilglicerol, la cardiolipina (CL) y la fosfatidiletanolamina (PE). Adicionalmente, contiene lipoglicanos como el lipomanano (LM) y el lipoarabinomanano (ManLAM) y una variedad de isoprenoides que tienen un rol importante en las funciones celulares como el decaprenil fosfato (Dec-P) que está involucrado en el transporte de azúcares activados para la síntesis de polímeros esenciales como el PG, AG, LM y el ManLAM o como las menaquinonas, componentes esenciales de la cadena respiratoria (20).

La pared celular consiste en un esqueleto unido covalentemente, varios tipos de lípidos asociados a la pared y algunos polipéptidos. El esqueleto se define como el material remanente luego de la remoción de todas las sustancias asociadas a la pared de manera no covalente como proteínas solubles, lípidos y glicanos. Los elementos unidos covalentemente son el peptidoglicano (PG), el arabinogalactano (AG) y los ácidos micólicos. El peptidoglicano se compone de unidades de N-acetilglucosamina y ácido N-acetil/glicolilmurámico, entrelazados por péptidos cortos. El arabinogalactano consiste en un complejo heteropolisacárido de 3 cadenas de D-arabinano que alternan uniones tipo 5- y 6-D-galactofuranosilo. En comparación con otras micobacterias, dos terceras partes de los extremos no reductores de los motivos pentaarabinosilo se encuentran formando una unión covalente tipo éster con ácidos micólicos en *Mtb* mientras que especies como *M. leprae* y *M. bovis* forman una unión tipo éter. Finalmente, los ácidos micólicos son ácidos grasos de cadena larga (hasta 90 átomos de carbono) α-ramificados y β-hidroxilados que se encuentran unidos a través de uniones tipo éster con los cuatro hidroxilos de la posición 5 en los motivos terminal y 2-D-arabinosil de los residuos pentaarabinosilo (21).

En conjunto, esta región de la envoltura suele denominarse micomembrana (MM) debido a su conformación de tipo bicapa lipídica, en la que la capa interior corresponde al esqueleto y la capa exterior a los lípidos unidos de manera no covalente, comúnmente denominados lípidos extraíbles pues pueden ser removidos fácilmente con solventes orgánicos. Dentro de este grupo se encuentran los monomicolatos de trehalosa (TMM), los dimicolatos de trehalosa (TDM), el fosfatidilinositol manósido (PIM), los sulfolípidos (SLs) y el dimicocerosato de tiocerol (PDIM) (22). Estos lípidos han intrigado a los investigadores durante décadas, en tanto que están involucrados en eventos de señalización, en la patogénesis y en la respuesta inmune. El TDM, conocido como *cord factor*, ha mostrado ser tóxico en ratones y su mecanismo de acción se basa en la estimulación de la actividad NADasa, reduciendo los niveles de NAD en el hospedero, lo cual puede llegar a disrumpir el flujo de electrones en la membrana de las mitocondrias. Los SLs por su parte son de relevancia en algunas cepas virulentas en tanto que las cepas atenuadas de *Mtb* suelen carecer de ellos, y están implicados en la inhibición de la fusión fagosoma-lisosoma (23). Asimismo, el PDIM parece ser exclusivo de las micobacterias patogénicas y aunque no es necesario para el crecimiento *in vitro* de *Mtb*, el hecho de que es está presente en todas las cepas virulentas lo hace muy relacionado con la patogenicidad. De manera interesante, cepas mutantes de *Mtb* que han perdido la capacidad de sintetizar ambos lípidos (PDIM y

SL) son negativas al test de virulencia con rojo neutro; la ausencia de uno solo de estos lípidos u otros metil ramificados no implica atenuación (20).

La región más externa de la envoltura celular micobacteriana está compuesta en su mayoría por polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos en el caso de especies patogénicas como *Mtb*, mientras que en especies no patogénicas se compone principalmente de proteínas (22). En especies patogénicas se denomina cápsula y en ella se encuentra de forma mayoritaria un glucano constituido por unidades repetidas de 5 o 6 residuos tipo (1->4)-α-D-glucosilo, sustituidos en la posición 6 con residuos mono- u oligoglucosilo. Los materiales expuestos a la superficie también incluyen al D-arabino-D-manano, el cual posee una estructura similar a la porción de tipo carbohidrato presente en LAM, con un extremo no reductor enlazado a oligomanósidos. En cuanto a los lípidos, sólo representan entre un 2% y un 3% de los materiales expuestos a la superficie, la mayoría de ellos provenientes de la parte interior de la cápsula. El componente proteínico consiste principalmente de una mezcla compleja de polipéptidos (21).

La relación que existe entre la virulencia de *Mtb* y su contenido lipídico fue establecida hace varias décadas (24). Estos estudios dieron lugar a la identificación de SL, TDM y PDIM como lípidos de potencial importancia en la patogénesis de la TB. Posteriormente, estudios realizados a nivel genómico, a través de la caracterización fenotípica de mutantes de *Mtb* deficientes en proteínas involucradas en su biosíntesis dieron soporte a esta hipótesis. Muchos aspectos del proceso de infección del bacilo están relacionados con estos lípidos. La entrada de *Mtb* al interior de los macrófagos es mediada por receptores fagocíticos especializados, que interaccionan con glucolípidos como el PIM, el TDM y el ManLAM. Una vez en su interior, los bacilos son capaces de prevenir la unión del fagosoma con el lisosoma, fenómeno que ha sido asociado con la acción de isoprenoides, ManLAM, TDM, PDIM, SL y DAT. Asimismo, en el interior de las células del hospedero, *Mtb* libera distintas cantidades de estos lípidos, lo que interfiere en los mecanismos de tráfico celular y produce un impacto sobre la secreción de citoquinas pro- y antinflamatorias, la apoptosis, la formación del granuloma, y la unión del fagosoma con el lisosoma (20).

1.1.2 Supervivencia de *Mtb* en el fagosoma

Uno de los pasos iniciales más importantes de la respuesta inmune innata es la internalización del patógeno por los macrófagos. Los patógenos fagocitados son

confinados en vacuolas y procesados a través de una serie de interacciones con vesículas endosomales tempranas y tardías, en un evento conocido como maduración del fagosoma. Durante el proceso de maduración, los fagosomas adquieren sus propiedades degradativas y microbicidas, fusionándose en última instancia con lisosomas para dar lugar al complejo conocido como fagolisosoma (25). Esta unión se caracteriza por el establecimiento de un ambiente ácido en el interior, producido por la localización de ATPasas tipo V en el fagosoma, favoreciendo la actividad de las enzimas lisosomales (26).

El éxito del bacilo tuberculoso reside en su habilidad para interferir con los procesos de tráfico intracelular de los macrófagos infectados; específicamente, *Mtb* es capaz de bloquear la biogénesis del fagolisosoma (27). Las características más notables del fagosoma conteniendo *Mtb* son una acidificación incompleta del lumen y la ausencia de hidrolasas lisosomales, consecuencia del arresto en su maduración que limita la capacidad hidrolítica de la vacuola, lo que facilita el acceso del bacilo a los nutrientes internalizados por la célula hospedero, debido a que se conserva el acceso al sistema de reciclaje endosomal, y evita la exposición del patógeno a la maquinaria de procesamiento y presentación de antígenos del macrófago (28).

Uno de los modelos que explican el bloqueo de la unión del fagosoma y el lisosoma postula que el bacilo tuberculoso es capaz de inhibir el aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico, un evento que ocurre normalmente en los macrófagos durante la opsonización de otros patógenos, partículas artificiales como esferas de látex e incluso bacilos muertos de *Mtb* (29). El efecto inhibitorio de la micobacteria ha sido atribuido al glicolípido manosilado lipoarabinomanano (LAM), el que presuntamente interfiere con la señalización de una esfingosinquinasa que media el aumento transitorio de la concentración de calcio, asociada normalmente con la fagocitosis de partículas no virulentas (27, 28). Esta habilidad para bloquear la maduración del fagosoma es compartida con otras micobacterias patogénicas como *M. avium* y *M. marinum*, las que producen ManLAM, pero sucede lo mismo con micobacterias no patogénicas, como *M. smegmatis*, la que produce fosfatidil-*myo*-inositol (PILAM) (30). Se ha demostrado que el bloqueo ocurre entre los estados mediados por las GTPasas Rab5 y Rab7, involucradas en el tráfico transmembranal y, específicamente, tiene un efecto sobre el reclutamiento de EEA1, una proteína efectora de Rab5 esencial para la incorporación de la hidrolasa Catepsina D y la subunidad V0 de la H^+-ATPasa al fagosoma. Esta observación también ha sido lograda con esferas recubiertas

de ManLAM, confirmando así la asociación de este glicolípido con el bloqueo de la maduración del fagosoma (31).

A pesar de que la micobacteria previene la unión del fagosoma con el lisosoma como estrategia de supervivencia al interior del macrófago, debe enfrentar otras condiciones hostiles como un pH ligeramente ácido, el aumento en la concentración de iones de metales pesados y la presencia de NOS y ROS (2). Estudios de la composición de iones al interior del fagosoma han permitido establecer que en las primeras horas de la internalización del bacilo ocurren ciertos cambios en la concentración de algunos iones. Durante la primera hora, hay una reducción de iones Ca^{2+} y K^{+}, seguida por su reaprovisionamiento al cabo de 24 horas. Al mismo tiempo, se da un aumento en la concentración de azufre y cloro, junto a un aumento de Zn^{2+}, 24 horas después de la fagocitosis. Otros iones como Cu^{2+} y Fe^{2+} también sufren cambios en su concentración durante este periodo y luego de la activación de la célula por citoquinas antiinflamatorias como el TNF y el INFγ (32).

El aumento en los niveles de Cu^{2+} y Zn^{2+} son relevantes tanto desde la perspectiva del macrófago como la de la micobacteria. El macrófago utiliza ATPasas tipo P con el fin de aumentar las concentraciones de estos iones a modo de estrategia microbicida. Este hecho ha sido corroborado a través de estudios del proteoma de macrófagos activados por diversas citoquinas, incluido el INFγ (33). Por otra parte, la micobacteria posee ATPasas y otras proteínas encargadas del eflujo de estos iones como CtpV (cobre) y CptC (zinc) o la porina MtcB (cobre). De manera interesante, un mutante defectivo en CtpV presenta una notable sensibilidad a iones Cu^{2+} (34). En este sentido, la micobacteria, a través de proteínas especializadas en el eflujo de metales pesados, enfrenta la estrategia del macrófago de aumentar la concentración de estos iones hasta niveles tóxicos.

La producción de NOS y ROS en el ambiente fagosomal es considerada otra de las estrategias de defensa de los macrófagos en contra de diversos patógenos, sin embargo, su relación directa con la muerte del microorganismo internalizado es discutible (2). A pesar de ello, *Mtb* posee diversas proteínas como KatG, SodA y SodC, encargadas de la detoxificación de ROS, como el peróxido de hidrógeno y radicales libres relacionados, que incluso han demostrado influir sobre su virulencia *in vitro* y en modelos animales (35, 36). Estudios del perfil transcripcional de *Mtb* han demostrado que, tras la infección del macrófago, existe una regulación positiva de la expresión de los genes bacterianos

asociados con el estrés oxidativo y nitrosativo. Un aspecto importante de esta regulación es el cambio de pH de 7,4 (condiciones normales) a 6,4 (fagosoma temprano) pues se constituye como una de las señales ambientales más relevantes en la inducción de esta respuesta transcripcional; se ha observado que la ausencia de este cambio de pH suprime cerca de un tercio del cambio en la expresión del perfil (37). Algunos de estos genes corresponden a proteínas ATPasas tipo P (4), razón por la que serán abordadas con detalle más adelante.

La escala de tiempo en que la micobacteria debe enfrentar estas condiciones corresponde a las primeras horas de la infección e inicia con la internalización del bacilo. No obstante, como se ha mencionado previamente, la micobacteria es capaz de sobrevivir en el hospedero por largos periodos de tiempo en un estado de latencia, lo que puede considerarse también como una estrategia de supervivencia. Algunos de los genes que se sobreexpresan tras la infección del macrófago están relacionados con este estado de latencia, en el que una de las principales características es el bajo nivel de oxígeno.

1.1.3 Regulador DosR y estado de latencia

Mtb es capaz de sobrevivir por varios años en los tejidos de individuos infectados en un estado no replicativo, pero con el potencial para reestablecer su crecimiento y producir TB activa. Una de las aproximaciones experimentales al estudio del estado de latencia, denominado NRP (*non replicating persistence*) (3), consiste en el uso de modelos *in vivo* que simulan una de sus principales características: un ambiente con una baja tensión de oxígeno, propio de las lesiones tuberculosas humanas y de algunos animales como los conejillos de indias y los conejos. Se ha demostrado que, para responder a estas condiciones, *Mtb* cuenta con un conjunto de por lo menos 48 genes que son inducidos por hipoxia, NO y CO, el cual ha sido denominado DosR (*Dormancy survival regulator*). El regulón DosR es controlado por un sistema de tres componentes constituido por dos histidinquinasas, DosS y DosT, capaces de detectar y unirse a los gases NO y CO, y el regulador de la respuesta, DosR (38). A pesar de que la mayoría de los 48 genes del regulón no han sido caracterizados, su inducción concertada bajo las condiciones descritas sugiere que juegan un papel importante en la adaptación del bacilo al ambiente del hospedero (39).

La importancia de DosR en la infección latente y la persistencia del bacilo tuberculoso ha sido sugerida mediante estudios donde se afirma que seres humanos contagiados con TB latente tienen una mayor probabilidad de producir células T específicas contra las proteínas codificadas por el regulón DosR, en comparación a pacientes con enfermedad activa, lo que indicaría que su expresión se da durante el estado de latencia (40). No obstante, algunos estudios con mutantes han demostrado que la inactivación genética del gen *dosR* no posee un efecto tan drástico sobre la viabilidad *in vitro* de la micobacteria en condiciones de hipoxia y que las respuestas *in vitro* dependen significativamente del modelo seleccionado (41).

DosR está relacionado con la supervivencia en el estado de latencia en tanto que es necesario para la viabilidad de la micobacteria en condiciones anaeróbicas y para la transición desde el crecimiento en ausencia de oxígeno o un estado no respiratorio inducido por NO, hacia el crecimiento en condiciones aerobias (38). No obstante, se ha llegado a proponer que su efecto sobre la habilidad que tiene la micobacteria para adaptarse a las condiciones de hipoxia en el hospedero está limitado a las etapas iniciales de esta adaptación y que, en el largo plazo, es reemplazada tanto por una respuesta más extensa y compleja (*Enduring hypoxic response, EHR*) (42), así como por otros reguladores transcripcionales (43).

Los genes comprendidos por el regulón DosR están involucrados en múltiples procesos que incluyen al metabolismo central, la generación de energía y la regulación génica (41, 44). De manera interesante, el gen *ctpF* (*Rv1997*) de *Mtb* y el gen *pma1* de *M. smegmatis*, que codifican ATPasas tipo de metales alcalino-alcalinotérreos, se encuentran dentro de los genes que son inducidos bajo condiciones de hipoxia, controlados por DosR, por lo que se podría sugerir una relación entre su función y la adaptación del bacilo a condiciones anaeróbicas (45) y por lo tanto serían objetos de estudio interesantes en el marco de la búsqueda de dianas terapéuticas para el control de la TB.

1.2 Transporte a través de la membrana plasmática

La membrana plasmática es una barrera natural que se opone al paso de solutos desde y hacia el interior de la célula. Debido a su carácter hidrofóbico, las moléculas apolares encuentran menor resistencia para atravesar la membrana que las polares y es virtualmente impermeable a los iones (**Figura 1-4**). No obstante, al estudiar el contenido

celular se observa que su composición es definida y que existe un control estricto en la concentración de distintos cationes, aniones y solutos polares. Surge el interrogante de cómo algunas de éstas logran atravesar la bicapa lipídica, teniendo en cuenta que su coeficiente de difusión es tan bajo que no podrían hacerlo en la corta escala de tiempo en la que se llevan a cabo los procesos celulares. La respuesta está en que el transporte de solutos a través de la membrana plasmática es ejecutado, en su mayoría, por proteínas especializadas embebidas en la bicapa (46).

La diferencia de concentración que existe entre el interior y el exterior celular para un soluto dado da lugar a un gradiente que posee un componente de potencial químico y, en el caso de solutos cargados, uno de potencial eléctrico. La combinación de estos dos componentes establece la dirección energéticamente favorable en la que el soluto se difundiría, dadas las condiciones para hacerlo. Dependiendo de si la proteína especializada en el transporte de un soluto lo transporta en esa dirección o en sentido contrario, su mecanismo de acción se denomina transporte pasivo o difusión facilitada (en favor del gradiente) o transporte activo (en contra del gradiente). Mientras que la difusión facilitada no requiere de energía para llevarse a cabo, el transporte activo involucra la transducción de energía almacenada en enlaces químicos, específicamente el enlace fosfoanhídrido de una molécula de ATP, la luz o en el gradiente electroquímico de otra especie. La **Tabla 1-1** presenta los requerimientos básicos para cada mecanismo de transporte.

Figura 1-4. Permeabilidad de una bicapa lipídica pura a distintos solutos (46).

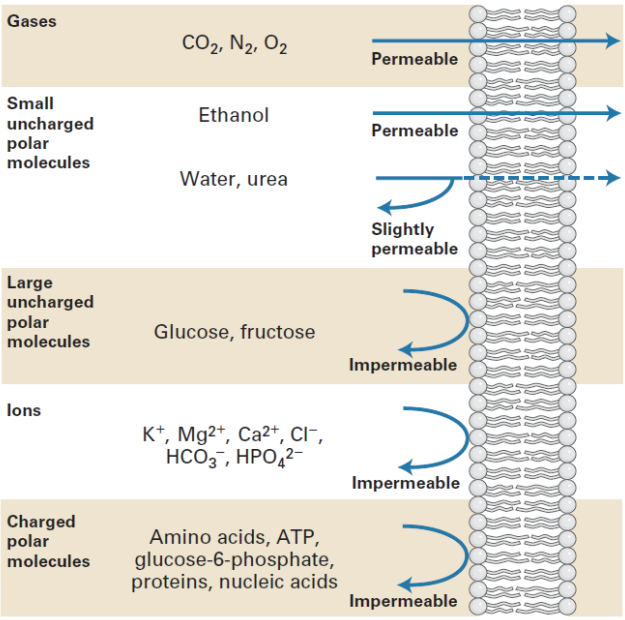
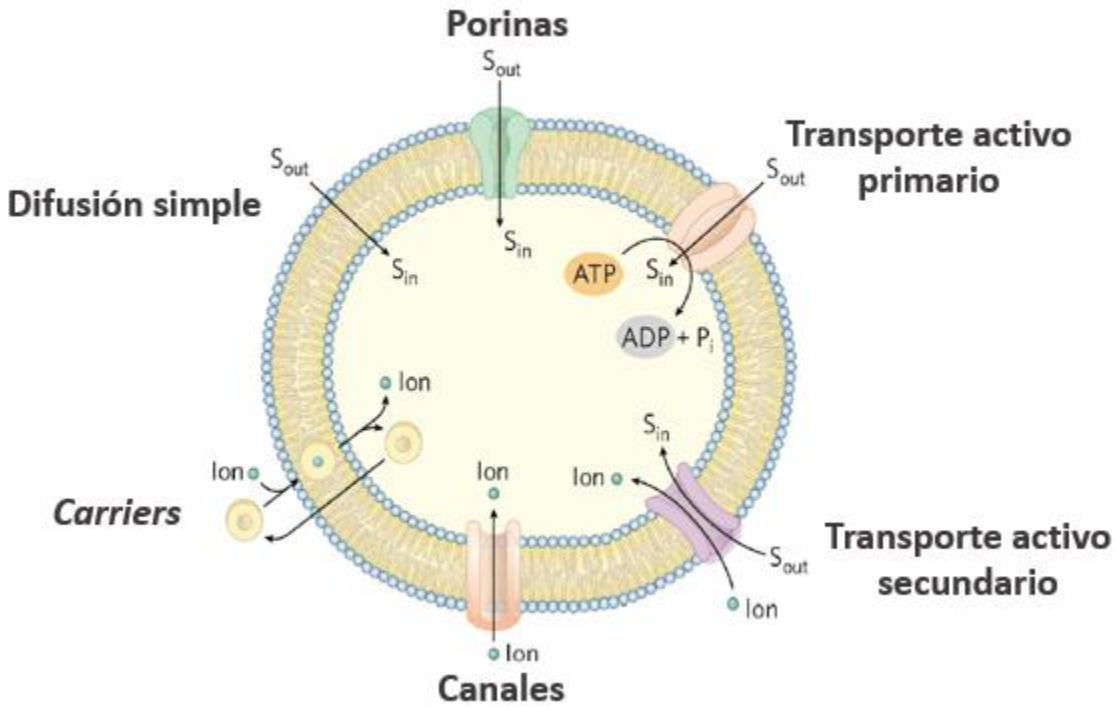


Tabla 1-1. Mecanismos de transporte a través de la membrana (46).

Mecanismos para el transporte de iones y moléculas pequeñas a través de la membrana plasmática				
Propiedad	**Difusión Simple**	**Transporte Facilitado**	**Transporte Activo Secundario**	**Transporte Activo Primario**
Requiere de una proteína específica	No	Sí	Sí	Sí
Transporte en contra del gradiente	No	No	Sí	Sí
Acoplado a la hidrólisis de ATP	No	No	No	Sí
Acoplado a un gradiente electroquímico	No	No	Sí	No
Ejemplos	O_2, CO_2, hormonas esteroideas, algunos medicamentos	Glucosa y aminoácidos (uniporte), iones y agua (canales)	Glucosa y aminoácidos (simporte); varios iones y sacarosa (antiporte)	Iones, moléculas hidrofílicas, lípidos (ATPasas)

Las proteínas involucradas en el transporte se pueden clasificar de manera amplia como transportadores y canales. Los transportadores se unen de manera específica al soluto y a través de varios cambios conformacionales exponen los sitios de unión a uno u otro lado de la membrana plasmática. Estos cambios están acompañados de una variación en la afinidad del sitio por el sustrato, siendo alta en la cara desde la que se transporta y baja en la cara hacia la cual se transporta. Por otra parte, los canales no tienen una afinidad tan alta por su soluto como los transportadores y, en lugar de poseer un sitio de unión, su estructura es similar a la de un poro que traviesa la membrana de extremo a extremo. La apertura del canal permite el paso de solutos, a una velocidad mucho mayor que la de los transportadores (47). La **Figura 1-5** resume los tipos de transportadores presentes en la membrana plasmática.

Figura 1-5. Tipos de transportadores de la membrana plasmática. Los transportadores pueden ser divididos en dos grandes clases: Transportadores pasivos o transportadores activos. Dentro de los transportadores pasivos se encuentran los *carriers* y canales, en los cuales el proceso de transporte es sólo una difusión facilitada. Por otra parte, los transportadores activos pueden ser de dos tipos principales: primarios, en los que se utiliza energía para transportar el soluto (luz o ATP) o secundarios, en los que se usa el gradiente electroquímico de otro soluto para energizar el transporte (47).



A continuación, se revisarán las principales características de los dos tipos de proteínas transportadoras.

1.2.1 Canales

Los canales transportan agua, iones específicos o moléculas hidrofílicas pequeñas a favor de su gradiente electroquímico. Su estructura terciara da forma a un canal acuoso a través del cual los solutos difunden a altas velocidades, entre 10^7 y 10^8 iones/s. La mayoría de ellos regulan el paso del soluto con una “compuerta” que se abre en respuesta a una señal biológica y que los clasifica como voltaje-dependientes, ligando-dependientes o mecano-dependientes, de acuerdo con la naturaleza de la señal (48).

Los canales voltaje-dependientes, como el de Na^+ o K^+ presentes en células nerviosas y musculares detectan cambios de voltaje a través de aminoácidos cargados. Un cambio en el potencial genera un cambio conformacional que abre la compuerta del canal y permite el flujo de los iones hasta que otra señal induce su cierre o el gradiente electroquímico se disipa. En el caso de los ligando-dependientes, es la unión de una molécula al canal la que induce el cambio conformacional que resulta en la apertura del poro. Un ejemplo clásico es el receptor acetilcolina nicotínico, que tras la unión del ligando acetilcolina permite la

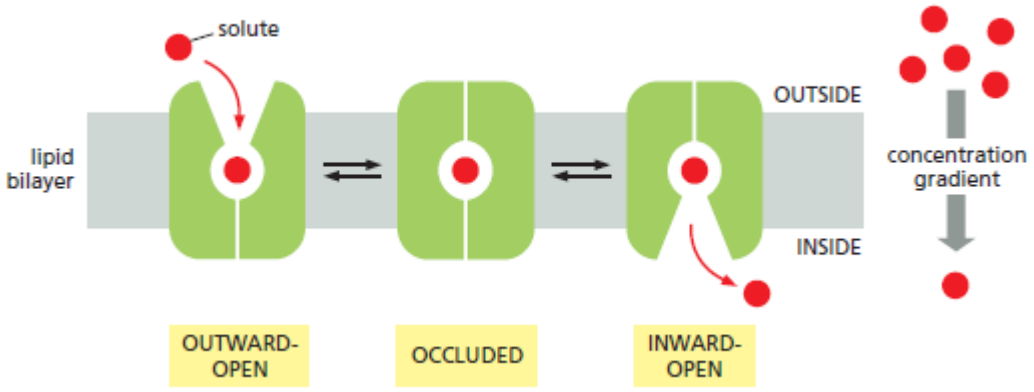
entrada de iones Na^+ y K^+ en células nerviosas. Este influjo de iones da lugar a un aumento del potencial de membrana que, a su vez, se constituye como una señal que induce la apertura de canales de sodio voltaje-dependientes. Los canales mecano-dependientes responden a distintos estímulos que deforman la membrana en que se encuentran embebidos, como tensión o cambios en el grosor y curvatura. Están presentes en todas las formas de vida y suelen regular procesos tales como la respuesta al desbalance osmótico. En bacterias, por ejemplo, la familia de canales MscL funciona como válvula de emergencia cuando la célula se expone a una solución hipotónica. La entrada de agua ocasiona un aumento en el volumen de la célula y estimula la apertura de los canales, que permiten la salida de iones y proteínas pequeñas, contrarrestando el influjo de agua y evitando así que la célula estalle (49).

1.2.2 Transportadores

Los transportadores se unen a sus sustratos con una alta estéreo-especificidad y los transportan, en consecuencia, a una velocidad considerablemente menor que la velocidad de transporte de los canales, entre 10^0 y 10^4 iones/s. Dependiendo de la fuente de energía que utilizan, se subclasifican como transportadores de tipo activo primario si hidrolizan ATP o aprovechan la energía de los fotones, y de tipo activo secundario o cotransporte si emplean la energía almacenada en el gradiente electroquímico de otra especie. De esta clasificación se excluye a los transportadores de tipo *uniporte*, que no requieren de energía para llevar a cabo su función pues transportan el soluto a favor de su gradiente y se denominan colectivamente, junto con los canales, transportadores facilitadores de la difusión.

El proceso de transporte se asemeja a una reacción enzimática con la diferencia de que el sustrato, en este caso la especie transportada, no sufre ninguna modificación durante el mismo. Cada tipo de transportador posee uno o más sitios de unión cuya afinidad por el sustrato cambia según el paso del proceso, siendo mayor cuando están expuestos hacia la cara donde inicia el transporte. A través de varios cambios conformacionales reversibles, el transportador alterna entre estados abiertos hacia una de las caras de la membrana y uno ocluido, en el que el soluto es inaccesible desde cualquier cara (**Figura 1-6**). Cuando el transportador se satura todos los sitios de unión están ocupados en un instante determinado y la velocidad de transporte es máxima (47).

Figura 1-6. Esquema de la alternancia entre estados en un transportador de tipo *uniporte* (47). A diferencia de los canales, estas proteínas sufren cambios conformacionales durante el evento de transporte en los que existe diferente afinidad por los solutos transportados.



Los transportadores que utilizan el gradiente electroquímico de otra especie para transportar su sustrato lo pueden hacer en la misma dirección o en dirección contraria a dicho gradiente. El primer tipo se denomina *simporte* y uno de los ejemplos más conocido es el transportador de Na^+/glucosa, presente en células renales y del intestino, el cual acopla la difusión de Na^+ hacia el interior de la célula con el influjo de glucosa. El segundo tipo se denomina *antiporte* y tiene como uno de sus representantes al intercambiador Na^+/Ca^{2+}. Esta proteína se encuentra en la membrana plasmática de las células musculares del corazón, donde el calcio es utilizado como un agente de señalización necesario para inducir la contracción muscular. Una vez el evento de señalización termina, es necesario reestablecer la concentración intracelular de calcio, lo cual se logra acoplando la salida de Ca^{2+} al influjo de Na^+ (49).

Por otra parte, los transportadores que utilizan la energía almacenada en el ATP o la luz suelen denominarse bombas. El miembro más prominente de las bombas energizadas por luz es la bacteriorodopsina, que genera y mantiene un gradiente electroquímico de H^+ a través de la membrana plasmática de las halobacterias. Fue descrita por primera vez en *Halobacterium salinarum* por Walther Stoeckenius y Dieter Oesterhelt en el año 1971, tras el aislamiento de parches de membrana color púrpura que luego mostraron poseer una única proteína asociada al cromóforo retinal, presente en el pigmento visual de humanos y otros animales conocido como rodopsina. Es justamente la unión del retinal como base de Schiff protonada a la cadena lateral de un residuo de lisina el elemento responsable por

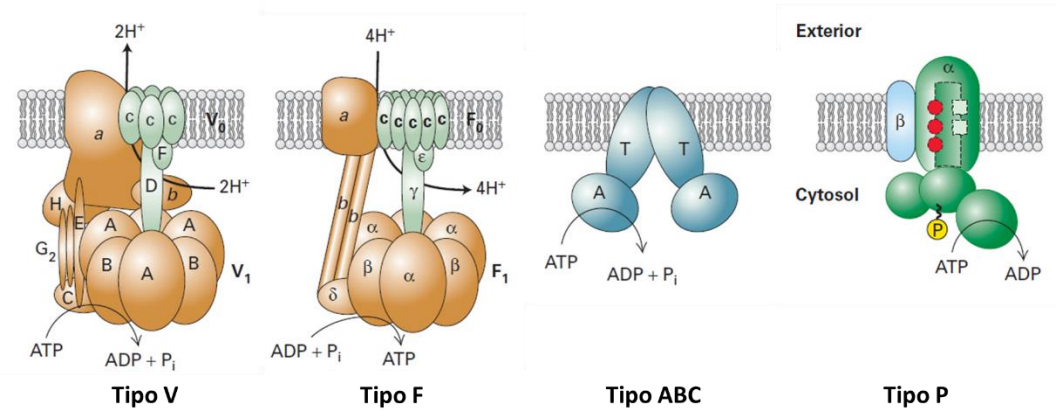
la transducción de la energía proveniente de los fotones. Estos inducen un cambio conformacional que tiene como consecuencia final el transporte de un ion H^+ desde el citoplasma hacia el exterior celular. El gradiente electroquímico generado por esta proteína es utilizado en distintos procesos celulares, siendo uno de los más importantes la síntesis de ATP, llevada a cabo por una bomba tipo ATPasa.

La primera ATPasa fue descrita en el año 1957 por Jens Skou, un investigador danés que intentaba comprender el funcionamiento de ciertos anestésicos locales y que, a través de experimentos realizados sobre extractos homogeneizados de nervios provenientes de piernas de cangrejo, encontró una relación entre el transporte de Na^+-K^+ y la hidrólisis de ATP, descubriendo así la Na^+/K^+ ATPasa (50). Desde entonces, la investigación enfocada al estudio de las ATPasas ha progresado significativamente y se han reconocido cuatro clases principales denominadas ATPasas tipo F, tipo V, tipo P y tipo ABC (

Figura 1-7), importantes no sólo por estar involucradas en muchos de los procesos que garantizan la viabilidad celular sino también porque su mutación o deleción, en el caso del ser humano, ocasiona múltiples enfermedades (51).

Las ATPasas tipo ABC constituyen la superfamilia más grande de ATPasas; su designación está basada en el hecho de que poseen un casete de unión a ATP altamente conservado (*ATP binding cassette*). Cada transportador del tipo ABC es relativamente específico para un tipo de sustrato; no obstante, los sustratos corresponden a una amplia variedad de moléculas entre las que se incluyen aminoácidos, azúcares, iones inorgánicos, polisacáridos, péptidos e incluso proteínas. Poseen diversas funciones a nivel celular dentro de las que se encuentran la toma de nutrientes, lo que influye en la habilidad para crecer y competir de las bacterias, el transporte de proteínas, como en los casos en que procariotas o eucariotas sintetizan proteínas marcadas con un péptido-señal que las direcciona hacia la membrana plasmática, o la resistencia a medicamentos y antibióticos, que se manifiesta cuando estos compuestos son bombeados hacia el exterior de la célula a través de un transportador de este tipo (52).

Figura 1-7. Tipos de ATPasas (46).



Las ATPasas tipo V, al igual que las ATPasas tipo F, están compuestas por más de 10 subunidades ensambladas de tal forma que permiten diferenciar un sector encargado de la transducción energética y un sector asociado al transporte del H^+ a través de la bicapa lipídica. En las células eucariotas, están asociadas con las rutas de secreción y su actividad, en contraste con la actividad ATP-sintasa de la ATPasa tipo F, está relacionada con el transporte de H^+. Poseen un rol muy importante en procesos fisiológicos necesarios para la viabilidad de las células y se ha demostrado que mientras varias células animales pueden sobrevivir sin ATPasas tipo F, la ATPasa tipo V es esencial para su supervivencia (54).

1.3 ATPasas tipo P

Las ATPasas tipo P constituyen una superfamilia de proteínas presentes en todos los dominios de la vida, involucradas en distintos procesos vitales como el crecimiento y la proliferación celular, la transducción de señales, la desintoxicación de iones de metales pesados y el establecimiento de la asimetría de la bicapa lipídica. Una de sus funciones principales es generar y mantener gradientes electroquímicos utilizados por las células para energizar otros procesos. No obstante, sus sustratos no se limitan a iones de metales alcalino/alcalinotérreos y pesados, e incluyen también protones y fosfolípidos (55). Los miembros de la superfamilia se organizan en cinco clases que a su vez se dividen en varias subclases, de acuerdo al sustrato que transportan y en una estrecha relación filogenética;

las ATPasas de una misma clase suelen ser más similares entre miembros de la misma clase, a pesar de que éstos provengan de organismos distantemente relacionados, que a otras ATPasas en un mismo organismo (56). A pesar de la gran variedad de funciones que pueden tener estas enzimas, cabe resaltar que toda la superfamilia comparte un mecanismo, del cual recibe su nombre, y los rasgos generales de su estructura.

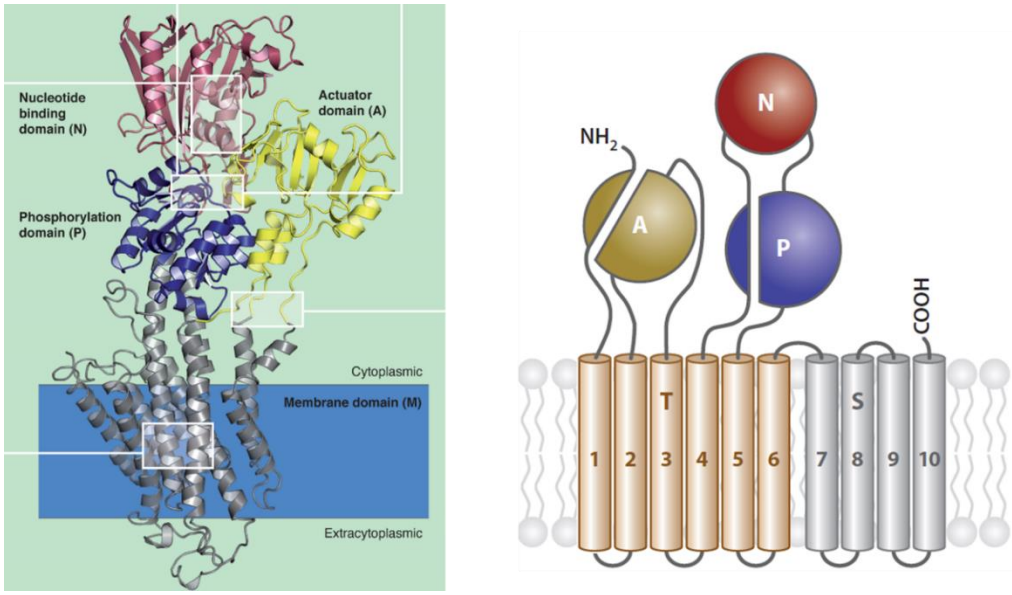
1.3.1 Dominios estructurales

Las ATPasas tipo P se componen de cuatro dominios estructurales (**Figura 1-8**), tres distribuidos en la región citoplasmática de la proteína y el dominio restante embebido en la bicapa lipídica. Los tres dominios citoplasmáticos se denominan dominio N o de unión a nucleótido, dominio P o de fosforilación y dominio A o actuador. El dominio N reconoce el grupo γ-fosforilo del ATP, que sufre el ataque nucleofílico, mientras que un residuo conservado de aspartato presente en el dominio P acepta el grupo fosforilo, dando lugar a un intermediario aspartato-fosforilo de alta energía. Un residuo de glutamato del dominio actuador posiciona una molécula de agua para su subsecuente hidrólisis, lo que resulta en la liberación del grupo fosfato. Estos dominios se encuentran unidos al dominio T o transmembranal que está conformado por entre 6 y 12 hélices (varían de acuerdo a la subclase, siendo de 6 a 8 en P1, 10 en P2, P3 y P4, y 12 en P5; ver **sección 1.3.3**) conservadas a nivel topológico y donde reside la especificidad por el soluto transportado, además de motivos característicos de subclase. Ciertos elementos estructurales pueden estar presentes en forma de hélices adicionales (domino de soporte), dominios solubles o proteínas que donan o aceptan al sustrato (57).

Mientras los dominios A y N no tienen una homología estructural considerable con otras proteínas, el dominio P es similar a las fosfatasas de la familia haloácido-deshalogenasa (HAD) (58). El dominio A posee actividad fosfatasa, mientras que el dominio N actividad quinasa. De los tres, el más variable es el dominio N y el más conservado el dominio P. Los motivos característicos de las ATPasas se presentan en el dominio A, como TGE, en el dominio P, como **D**KTG que contienen al residuo de aspartato conservado y al TGDN y GDGXND, involucrados en la coordinación de Mg^{2+} asociado con la unión del ATP en el sitio de fosforilación. El dominio T presenta una alta variabilidad entre las distintas ATPasas salvo por la región donde se encuentran los aminoácidos responsables de la coordinación del sustrato. Se encuentra unido directamente al núcleo del dominio P a través de las hélices 4 y 5, y es lo suficientemente flexible como para sufrir cambios en su conformación

durante el progreso del ciclo catalítico. Estos cambios conformacionales le permiten tomar, ocluir y exponer al sustrato, con el resultado neto de su transporte a través de la membrana (59).

Figura 1-8. Dominios estructurales de las ATPasas tipo P (55).



1.3.2 Ciclo catalítico

Para lograr el transporte activo de sustratos en contra de su gradiente electroquímico, el transportador debe prevenir la formación de un conducto abierto a través de toda la membrana en tanto que esta situación daría lugar a la disipación del gradiente. En este sentido, el ciclo catalítico de las ATPasas tipo P se basa en un mecanismo de acceso alternante en el que los caminos de acceso a ambas caras de la membrana se encuentran cerrados transitoriamente antes de abrirse hacia cualquier lado de forma alternante. La traslocación del ion se logra en últimas a través de cambios conformacionales significativos, energizados por medio de la hidrólisis del ATP (55).

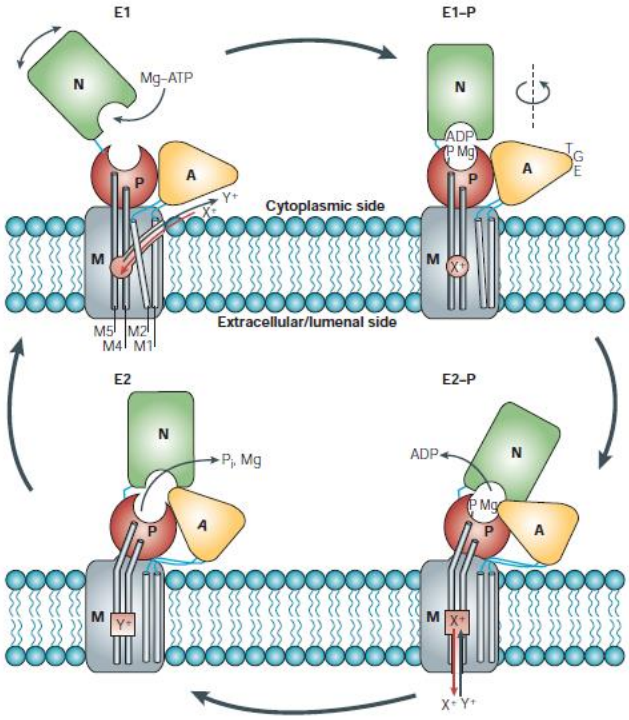
Al inicio del ciclo (**Figura 1-9**), el ion a ser transportado establece una interacción con el sitio de unión de alta afinidad en el estado conformacional E1, a través de un canal de acceso que se extiende desde la cara citoplasmática y, en este proceso, desplaza un contraión diferente al ion transportado, que presumiblemente abandona el sitio por el mismo canal. La unión de ATP coordinado por un catión Mg^{2+} al dominio N causa un cambio conformacional en las hojas β, que favorece el acercamiento al dominio P. Es la

coordinación del ATP la que permite que su γ-fosfato, cargado negativamente, se acerque al residuo de Asp que seguidamente es fosforilado durante la transición hacia el estado E1-P, superando la repulsión electrostática. Este hecho es significativo teniendo en cuenta que la interacción del catión Mg^{2+} con el dominio P sólo ocurre cuando los sitios de unión transmembranales se encuentran ocupados con el ion a transportar (60).

La fosforilación del dominio P causa el debilitamiento de la interacción mediada por la molécula de ATP con el dominio N, ocasionando su movimiento de tal manera que el puente entre el segmento M3 y el domino A se estira. Esto crea tensión en la estructura de la bomba, considerada la fuerza motriz para la reacción de desfosforilación que marca la transición del estado E1-P al estado E2-P. El domino A rota en paralelo al plano de la membrana, acercando al loop que contiene el motivo TGE al sitio de fosforilación, lo que da lugar a que las cadenas con grupos carbonilo e hidroxilo del motivo desplacen al Asp fosforilado de la esfera de coordinación del Mg^{2+}. De manera concurrente, los sitios de alta afinidad por el ion transportado se debilitan y se abre un canal de salida hacia la cara extra citoplasmática de la membrana; a través de este canal el contraión ingresa al interior del dominio transmembranal e induce su cierre. La unión del contraión y su oclusión están ligadas al movimiento del loop y la reorganización de la esfera de coordinación del Mg^{2+} cuya consecuencia final es favorecer el ataque nucleofílico de una molécula de agua sobre el residuo Asp fosforilado. Esta transición es el paso limitante del mecanismo (59).

En el estado defosforilado de la enzima, E2, el contraión se encuentra en el centro del dominio de transporte. Como consecuencia de la salida del grupo fosfato, el dominio A se aleja del dominio P, lo que permite que la enzima regrese a su conformación relajada en el estado E1. Este movimiento ocasiona el cambio conformacional de las hélices en el dominio T, lo que destruye el sitio de alta afinidad por el contraión y abre un canal hacia la cara citoplasmática de la membrana. Durante esta apertura, el ion a transportar puede ingresar y el ciclo catalítico inicia nuevamente (60).

Figura 1-9. Esquema del ciclo catalítico de las ATPasas tipo P (60).



1.3.3 Clasificación de las ATPasas tipo P

A pesar de que comparten el ciclo catalítico, las ATPasas tipo P pueden subdividirse en cinco clases (P1 a P5) cuyas características difieren notablemente, en especial respecto al sustrato que transportan. Esta clasificación fue introducida por Axelsen y Palmgren en 1998 (61) y está basada en el análisis filogenético de 159 miembros de la superfamilia provenientes de diferentes especies.

La clase P1 está conformada por las que se cree son las bombas más antiguas de la superfamilia y comprende dos subclases. La subclase P1A es representada por la bomba KdpB de *E. coli*, la ATPasa más pequeña conocida con una masa de apenas 72 kDa y sólo 6 hélices transmembranales. A pesar de poseer los dominios funcionales característicos de la superfamilia, la evidencia experimental sugiere que no transporta por sí sola ningún catión y que en su lugar hace parte de un complejo de varias subunidades, KdpFABC, en el que la subunidad KdpA, que se asemeja al canal bacteriano KscA, es la encargada de transportar iones K^+, la subunidad KdpC quien media la actividad de hidrólisis de ATP de la subunidad KdpB y el transporte en KdpA y finalmente la subunidad KdpF, encargada de dar estabilidad al complejo (62). Por otra parte, las bombas que pertenecen a la subclase

P1B están involucradas en el transporte de iones de metales pesados como Cu^{+}, Zn^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+}, Pb^{2+} y Co^{2+} con el fin de llevar a cabo funciones de desintoxicación o metalación de proteínas, esenciales para la viabilidad celular (57, 63–65). Se componen de 8 segmentos transmembranales de los cuales 2, ubicados en el extremo amino terminal, corresponden a dominios MA y MB, que junto a un dominio de unión a metal HMBD, presente en algunas enzimas, se asocian con la detección y transporte del ion (59). Mutaciones en los genes que codifican estas proteínas están relacionadas con patologías en los seres humanos como la enfermedad de Menkes (66) y la enfermedad de Wilson (67)

La clase P2 incluye a las ATPasas transportadoras de metales alcalino/alcalinotérreos y se considera el grupo más diverso. Se divide en 3 subclases: P2A, P2B y P2C. El representante más importante de la subclase P2A es la Ca^{2+}-ATPasa del retículo sarcoendoplasmático de células musculares en animales, SERCA, que será descrita con más detalle en la siguiente sección. Otros miembros incluyen a las proteínas involucradas en las rutas de secreción, conocidas como SPCAs (*secretory-pathway ATPases*). Específicamente, se encargan de favorecer la acumulación de calcio en el aparato de Golgi, donde además de servir como activador de diversos procesos citosólicos, es esencial para la traslocación, plegamiento y procesamiento de proteínas; el Ca^{2+} luminal del aparato de Golgi es empleado para mediar el transporte en el interior del organelo, el transporte hacia el retículo endoplasmático y la fusión de endosomas. Una característica importante de estas ATPasas es su capacidad de transportar iones Mn^{2+}, la cual no es compartida por otras Ca^{2+}-ATPasas (68)

En la subclase P2B se encuentra clasificada la PMCA (*Plasma membrane Ca^{2+}-ATPase*), bomba encargada de reestablecer el gradiente de concentración de iones Ca^{2+} luego de eventos de señalización en que un aumento abrupto de la concentración citosólica de este ion es usado como mensaje (59). Este trabajo es llevado a cabo en conjunto con un intercambiador de Na^{+}/Ca^{2+}, el que tiene una baja afinidad por el calcio, pero es capaz de transportarlo rápidamente; en contraste, a pesar de que la bomba no transporta el ion a una velocidad tan alta como la del intercambiador, tiene una alta afinidad por él (69). PMCA presenta una topología esencialmente igual a la de SERCA, aunque en comparación con ella sólo posee un sitio de unión a Ca^{2+} y no dos. Adicionalmente, unas de sus características únicas es que posee una región auto inhibidora en el C-terminal (animales) o el N-terminal (plantas) que previene la activación de la enzima hasta cuando a ella se

une la calmodulina, una proteína de unión a calcio involucrada en la señalización mediada por este ion (59).

La Na^+/K^+-ATPasa, la primera ATPasa en ser descrita (50), hace parte de la subclase P2C y es responsable de establecer y mantener gradientes electroquímicos de los iones Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. Este gradiente electroquímico es usado por la célula en distintas funciones como la formación del potencial de membrana, energizar procesos de transporte secundario, la señalización y la regulación del volumen celular. La bomba exporta al exterior de la célula 3 iones Na^+ e importa 2 iones K^+, generando así una carga neta negativa en la cara citoplasmática (70). Otro miembro importante de esta subclase es la H^+/K^+-ATPasa, encargada de la secreción de ácido gástrico. Esta enzima, caracterizada por ser α, β-heterodimérica, acidifica el estómago por medio de un intercambio electroneutro de iones H^+ por iones K^+, a expensas de la energía almacenada en el ATP. La subunidad catalítica α, que posee la actividad ATPasa y de transporte, se compone de diez dominios transmembranales de los cuales cuatro, TM4, TM5, TM6 y TM8 poseen los residuos que constituyen el sitio de unión al ion, conformado principalmente por un clúster de aminoácidos carboxílicos. La subunidad β posee sitios de N-glicosilación y está involucrada en el ensamblaje, maduración y localización del complejo (71).

Mientras que en las células animales el gradiente electroquímico que es utilizado para llevar a cabo procesos de transporte energéticamente desfavorables es generado por la Na^+/K^+-ATPasa, en hongos, plantas y bacterias esta enzima está ausente y el rol de generar una separación de carga a través de la membrana plasmática es asumido por las bombas H^+-ATPasas, miembros de la clase P3, subclase P3A. Esta enzima lleva a cabo un transporte electrogénico de un ion H^+ por cada ATP hidrolizado y posee una región extendida en su extremo C-terminal que funciona como un dominio de regulación auto inhibitorio. Su estructura es similar a la de las Na^+/K^+- y Ca^{2+}-ATPasas, lo que sugiere un mecanismo de transporte común, aunque el sitio de unión al catión está basado en residuos de arginina e histidina ampliamente conservados entre miembros pertenecientes a distintos organismos (72). Por otra parte, la clase P3 también se subdivide en una pequeña subclase denominada P3B donde se agrupan a Mg^{2+}-ATPasas de bacterias (60). Recientemente, se ha reportado que un miembro de esta subclase participa en la formación de complejos multiméricos de ATPasas cuyo fin es hiperacidificar el interior de vacuolas en células eucariotas (73).

La clase P4 es conocida por agrupar ATPasas que transportan fosfolípidos en lugar de iones, usualmente denominadas flipasas. Dos funciones principales se asignan a este tipo de enzimas: la formación y mantenimiento de la asimetría de la bicapa lipídica y su participación en la formación de vesículas transporte para las rutas de secreción y endocitosis (59). Algunos de sus sustratos pueden ser fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina y fosfatidilcolina, los que se transportan desde el exterior hacia el interior de la membrana plasmática. Los fosfolípidos transportados activan la desfosforilación de la enzima en el estado E2-P de manera análoga a como lo hace el ion K^+ durante el ciclo catalítico de la Na^+/K^+-ATPasa. La mayoría de las P4-ATPasas forman un complejo con proteínas de la familia CDC50, que al igual que las subunidades β de otras clases es importante para la función y maduración de la enzima. Esta subunidad posee un segmento transmembranal y un ectodominio N-glicosilado que se cree funciona como chaperona asistiendo a la subunidad α durante su salida del retículo endoplasmático, pero también tiene un efecto sobre las propiedades catalíticas del complejo (74).

Finalmente, la clase P5 corresponde a un grupo mono filogenético de ATPasas presentes en todos los genomas eucariotas estudiados hasta el momento de las que se desconoce su especificidad o sustrato transportado. No han sido encontradas en genomas procariotas, lo que indica que podrían llevar a cabo una función adquirida de manera exclusiva por las células eucariotas durante su evolución. Se subdividen en la clase P5A, caracterizada por tener un motivo cargado negativamente en los sitios de unión putativos del segmento transmembranal M4 (PP(D/E)LPxE) y dos segmentos transmembranales adicionales en el extremo N-terminal, y la subclase P5B, la que no conserva residuos cargados en M4 (PP(A/V)LPAx) y posee un único segmento transmembranal adicional en el extremo N-terminal (75). A pesar de no conocer su función exacta, se ha encontrado evidencia experimental de que las P5A-ATPasas están involucradas en la regulación de la homeostasis en el retículo endoplasmático (59) y que mutaciones de genes que codifican P5B-ATPasas causan algunos desórdenes neurológicos en seres humanos (76, 77).

1.3.4 SERCA Ca^{2+}-ATPasa

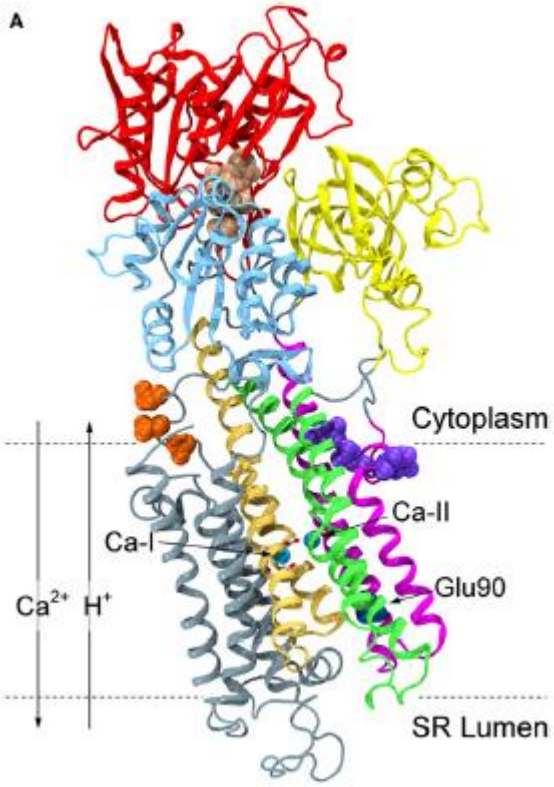
La SERCA-ATPasa es la representante mejor caracterizada de las ATPasas tipo P2A, en cuanto se ha resuelto su estructura cristalina en múltiples conformaciones. Su secuencia se encuentra altamente conservada en eucariotas superiores y también han sido halladas secuencias que comparten un alto grado de homología con ella en ciertos organismos

procariotas (78, 79). SERCA es responsable de mantener el gradiente de concentración de Ca^{2+} que existe a lo largo de la membrana plasmática de ciertos organelos y de las células.

Durante cada ciclo funcional de SERCA, una molécula de ATP se hidroliza por cada dos iones de Ca^{2+} transportados. Dependiendo del pH, dos o tres protones son cotransportados desde el lumen del retículo hacia el citoplasma. La conformación global de la enzima puede ser descrita por un estado E1 (forma unida a Ca^{2+}) o por un estado E2 (forma libre de Ca^{2+}, protonada). En el estado E1, los sitios de unión al catión están expuestos hacia la cara citoplasmática, la afinidad por el Ca^{2+} es alta y la proteína posee una actividad de tipo quinasa, actuando sobre sí misma en el residuo Asp351. En el estado E2, los sitios de unión están expuestos hacia el lumen del retículo, la afinidad por Ca^{2+} es baja y la proteína funciona como una fosfatasa (80). En cuanto a su estructura (**Figura 1-10**), SERCA posee diez hélices transmembranales, TM1 a TM10; asimismo posee dos sitios de unión a Ca^{2+}, ricos en átomos de oxígeno y con una densidad de carga predominantemente negativa, denominados Ca-I y Ca-II. El sitio Ca-I está formado a partir de residuos presentes en TM5 (Asn-768 y Glu-771), TM6 (Thr-799 y Asp-800) y TM8 (Glu-908), mientras que el sitio Ca-II se compone de residuos en TM4 (Val-304, Ala-305, Ile-307 y Glu-309) y TM6 (Asn-796 y Asp-800) (80).

En mamíferos, existen tres tipos distintos de SERCA (1-3) los cuales pueden presentarse como varias isoformas generadas a partir de splicing alternativo: tres de SERCA1 (a-c), tres de SERCA2 (a-c) y seis de SERCA3 (a-f). Este splicing da lugar a diferencias en la longitud del extremo C-terminal (**Figura 1-11**) siendo SERCA1a la ATPasa más corta, con 994 aminoácidos y SERCA3a la más larga, con 1052. A pesar de que sus diferencias a nivel funcional no están completamente establecidas, su predominancia en varios tipos de tejido sugiere que ciertos ajustes finos en su estructura les permiten llevar a cabo distintas funciones. Por ejemplo, SERCA1a predomina en el músculo esquelético mientras que las isoformas 2a y 2b predominan en el músculo cardiaco y las isoformas de SERCA3 en células no musculares, especialmente células hematopoyéticas (79).

Figura 1-10. Estructura de la SERCA-ATPasa y sitios de unión a Ca^{2+} (80).

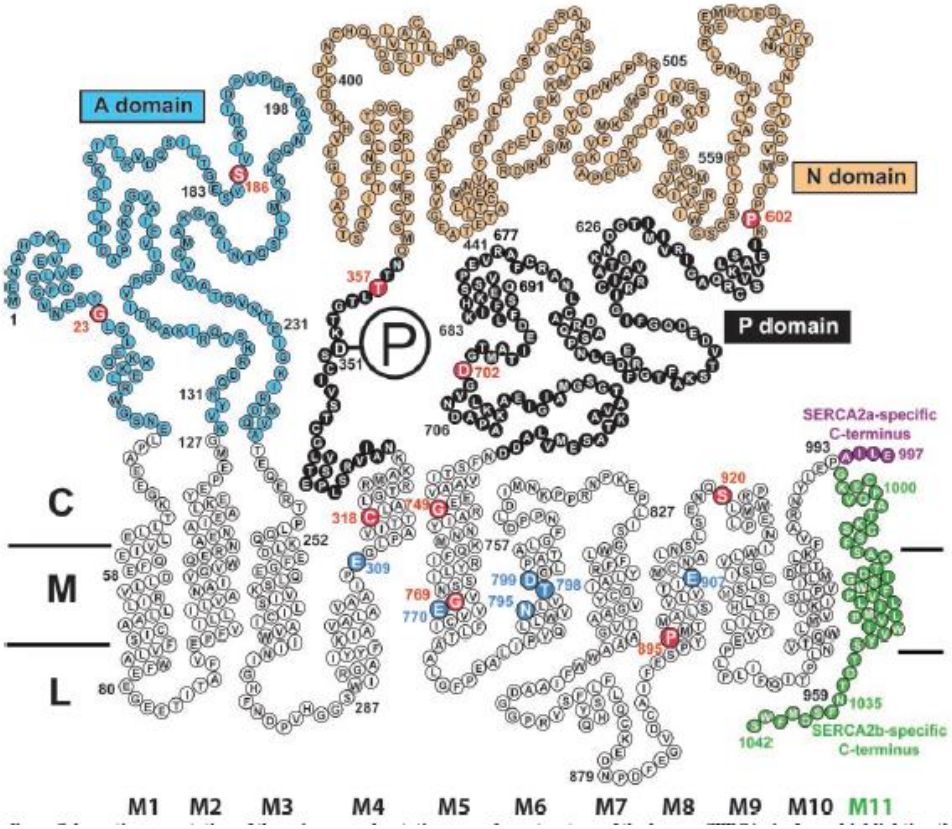


Las isoformas de SERCA1 son responsables por el reaprovisionamiento con calcio del retículo sarcoendoplasmático luego de un estímulo de contracción del músculo. De manera interesante, el músculo esquelético de los recién nacidos expresa las dos isoformas, SERCA1a y 1b, pero durante su desarrollo la última es completamente reemplazada por la isoforma 1a en el tejido. Una mutación en la isoforma 1a puede dar lugar a la patología muscular conocida como miopatía de Brody (81). Las isoformas de SERCA2, por su parte, son más ubicuas y están encargadas de mantener el calcio almacenado en organelos al interior de la célula. SERCA2a controla la cantidad de Ca^{2+} almacenada en el retículo sarcoendoplasmático de las células cardiacas, regulando así tanto su contracción como su relajación. SERCA2b se diferencia de la 2a por poseer una extensión en su extremo C-terminal de 49 aminoácidos, que le otorgan un segmento transmembranal adicional (**Figura 1-11**) y mayor afinidad por Ca^{2+}, pero con una tasa de transporte menor (82). La SERCA2 está asociada con algunas patologías en seres humanos. Una expresión reducida de SERCA2a en el músculo cardiaco está asociada con la condición de falla cardiaca (83), mientras que una expresión exacerbada de SERCA2b en el tejido cerebral se ha conectado al hallazgo de altos niveles de β-amiloide, un marcador reconocido de la enfermedad de Alzheimer (84). Finalmente, SERCA3 y sus isoformas poseen una afinidad

mucho menor por calcio que las anteriores y se encuentra principalmente en el intestino y el tejido linfático, aunque también en células sanguíneas. A diferencia de las otras, su pH óptimo se encuentra en el rango 7,2 a 7,4 y no 6,8 a 7,0 y no es inhibida por fosfolambano. A pesar de que todas las isoformas comparten un alto grado de similitud, las diferencias tanto como de tejido en que predominan como el estado de desarrollo en que se expresan, sugieren que satisfacen diferentes requerimientos homeostáticos en distintas células (85).

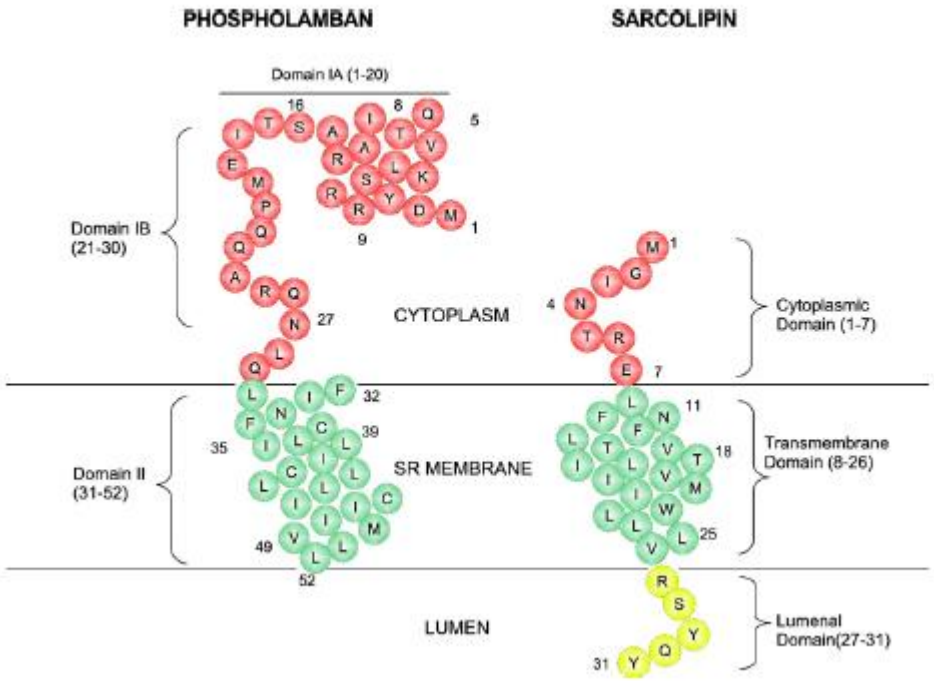
La actividad de SERCA puede ser regulada por las proteínas fosfolambano y sarcolipina. El fosfolambano (PLB) es un mediador de la respuesta β-adrenérgica, constituido por 52 aminoácidos orientados espacialmente en forma de una larga hélice hidrofóbica, embebida en la membrana plasmática, y un pequeño dominio citoplasmático. Su contraparte en el músculo esquelético es la sarcolipina, una proteína de membrana de 31 aminoácidos que comparte con él, además de un 50% de identidad en la región de la hélice transmembranal, su efecto represor sobre la actividad de transporte de Ca^{2+}. La fosforilación del fosfolambano en los residuos Ser13 y Thr17, o de la sarcolipina en el residuo Thr5 inducen su disociación de la bomba y bloquean su efecto represor. No obstante, se considera que el mecanismo de regulación debe ser distinto debido al dominio luminal que presenta la sarcolipina (**Figura 1-12**), además de otras observaciones, como el hecho de que mientras una alta concentración de calcio citosólico puede remover la restricción del fosfolambano, no tiene efecto alguno sobre la sarcolipina. Esto puede deberse a la diferencia en la manera en que interactúan ambas proteínas con SERCA. La sarcolipina retiene a SERCA en un estado conformacional E1, previniendo su transición hacia E2, entre las hélices M2, M6 y M9, mientras que el fosfolambano la bloquea en el estado E2, entre las hélices M4, M5, M6 y M8, disrumpiendo los dos sitios de unión a Ca^{2+} y evitando su transición hacia E1 (79, 86).

Figura 1-11. Comparación de las isoformas de SERCA2, 1a y 1b (87).



Además de los reguladores ya descritos, la actividad de SERCA puede ser inhibida por moléculas que poseen diversas estructuras que sólo comparten en muchos casos su habilidad para inhibir el transporte de Ca^{2+} en el rango de concentraciones de nano a micromolar. Dentro de los inhibidores más comunes se encuentran a la tapsigargina (TG), el ácido ciclopiazónico (CPA) y la 2,5-di(t-butil) hidroquinona (BHQ), además del vanadato, inhibidor común a todas las ATPasas tipo P. Los tres primeros bloquean a SERCA en el estado conformacional E2 y de ellos, TG ha sido el más utilizado no sólo para evaluar la actividad *in vitro* de diversas enzimas tipo SERCA sino también para obtener cristales de estas en dicho estado conformacional. TG es SERCA-específico y no tiene un efecto inhibitorio apreciable sobre la Na^{+}/K+-ATPasa, las PMCA o las SPCA. Asimismo, tiene un poder inhibitorio diferencial entre las distintas isoformas de SERCA, siendo alrededor de 60 veces más potente en SERCA1 que en SERCA3.

Figura 1-12. Comparación de estructuras de la sarcolipina y el fosfolambano (86).



En el estado conformacional E2 se crea un surco hidrofóbico entre las hélices M1, M2, M3 y M4 al cual pueden acceder los inhibidores BHQ y CPA. Los aminoácidos importantes en este sitio de inhibición son el Gln56, Asp59 y Asn101, que interactúan con los grupos hidroxilos presentes en las moléculas de los inhibidores. La importancia de entender el modo en que estos inhibidores interactúan con la estructura terciaria de SERCA radica en que esta información puede usarse para el diseño racional de fármacos dirigidos contra ATPasas tipo SERCA de patógenos o incluso de las SERCA presentes en las células humanas (79, 88).

1.4 Transporte de calcio en bacterias

A pesar de que las células bacterianas no necesitan ejecutar una cantidad de procesos celulares tan variada como la de las células eucariotas, existe evidencia experimental de que un buen número de estos eventos es regulado por cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre (89), como el crecimiento (90), la motilidad (91), el quórum sensing (92), la esporulación (93) y el desarrollo de diferentes estructuras bacterianas (94), entre otros.

Medidas realizadas a través del uso de indicadores fluorescentes (95) o de foto-proteínas (96) han permitido establecer que la concentración intracelular de calcio es regulada de manera estricta y mantenida en niveles muy bajos, comparados con las concentraciones usuales en distintos ambientes extracelulares. Esto indica que las bacterias invierten energía en mantener un gradiente de concentración de Ca^{2+} a través de su membrana celular y que por ende deben poseer mecanismos especializados para regular su influjo y eflujo. No obstante, el propósito por el que las bacterias mantienen este gradiente no es aún del todo claro (97).

La regulación de la concentración intracelular de calcio parece ser una característica adquirida por todas las formas de vida de manera temprana en la evolución, luego de que la composición de los océanos aumentara progresivamente en su contenido de calcio (98). Se cree estos cambios ambientales dieron origen a la maquinaria homeostática de este ion, que comprende transportadores activos y pasivos, así como otros no proteínicos. Además de estos sistemas, las bacterias deben poseer proteínas objetivo sobre las que los cambios en la concentración citosólica de Ca^{2+} libre tienen algún efecto. Una característica común a este tipo de proteínas es la presencia de motivos de unión a calcio del tipo *EF-hand* o *Greek-key*, hecho que se utiliza para realizar búsquedas genómicas e identificar así varios candidatos en diferentes bacterias (99). Es probable que estos sistemas actúen en conjunto para posibilitar aquellas funciones celulares que requieran del Ca^{2+}: desde el mecanismo de influjo que tras ser activado por un estímulo da lugar a un aumento en la concentración intracelular de calcio, seguido por la unión del ion a las proteínas objetivo y la unión a su vez de éstas a proteínas que median el evento específico, hasta la restauración de la concentración de Ca^{2+} realizada por el mecanismo de eflujo (89).

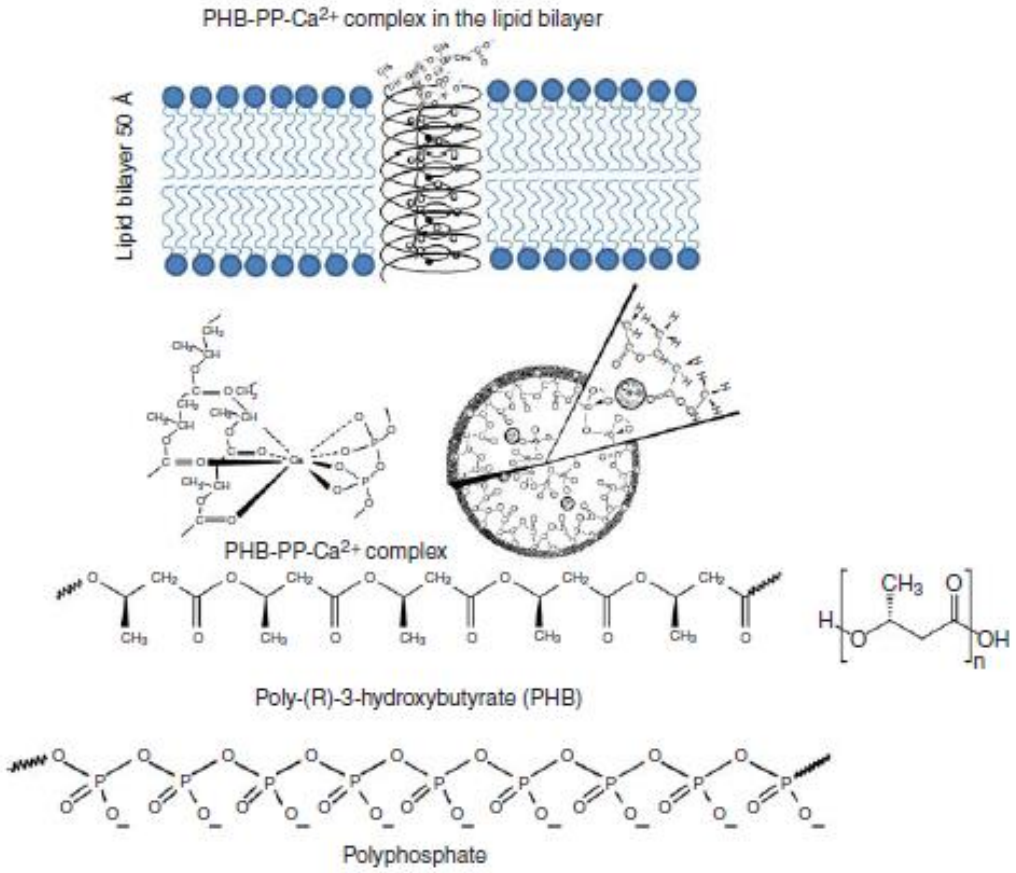
1.4.1 Transporte pasivo

El análisis de distintas secuencias codificadas en genomas bacterianos ha permitido sugerir que las bacterias poseen canales de calcio, en algunos casos susceptibles a los inhibidores de aquellos presentes en la membrana plasmática de las células eucariotas (99). Los canales de calcio pueden ser clasificados ampliamente, según el mecanismo que media su activación, como voltaje-dependientes, mecano-dependientes o ligando-dependientes (100). En bacterias, se ha reportado la existencia de un canal mecano-

dependiente (101) y de un canal voltaje-dependiente (102); adicionalmente, se ha reportado la existencia de un canal no proteínico (103).

La proteína MscL de la cianobacteria *Synechocystis* sp. PCC 6803 funciona como un canal mecano-dependiente que responde a la despolarización de la membrana plasmática dando lugar a una liberación de Ca^{2+} desde el interior celular. Adicionalmente, esta respuesta se ve inhibida de manera significativa por compuestos que bloquean la actividad de canales de calcio eucariotas, como el verapamilo y la amilorida, y células mutantes defectivas en el gen *mscL*, muestran una deficiencia en la liberación de calcio en comparación con la cepa silvestre (101). Otro ejemplo de canal de calcio bacteriano es la proteína BsYetJ de *Bacillus subtilis*, un homólogo de la proteína hBI-1 (Human Bax Inhibitor-1) y por ende miembro de la familia de proteínas TMBIM, involucradas en el eflujo de calcio y otros roles relacionados con la apoptosis. En contraste con su función en eucariotas, en *B. subtilis* el canal causa un influjo de calcio hacia el interior celular cuando es sobre expresado o reconstituido en proteoliposomas, de una manera pH-dependiente. La estructura no exhibe sitios específicos de unión al ion Ca^{2+} por lo que se concluye que el paso es permitido a través de interacciones transitorias con las cadenas laterales de los aminoácidos que recubren el poro del canal (102). Finalmente, el polímero lipídico poli-3-hidroxibutirato (PHB) ha sido reportado como un complejo presente en la membrana plasmática de *E. coli* que es capaz de funcionar como un canal de calcio (**Figura 1-13**). A través de estudios de electrofisiología se ha podido demostrar que posee varias de las características de los canales proteínicos: voltaje-dependencia, selectividad hacia cationes divalentes sobre cationes monovalentes, permeabilidad al Ca^{2+}, Sr^{2+} y Ba^{2+}, y susceptibilidad proporcional a la concentración de La^{3+}, Co^{2+}, Cd^{2+} y Mg^{2+} (103).

Figura 1-13. Canal PHB (89).



1.4.2 Transportadores activos

Los transportadores activos de calcio en procariotas comprenden ATPasas tipo P y transportadores activos de tipo secundario o energizados por un gradiente electroquímico (99). A pesar de que la mayoría de las ATPasas identificadas en bacterias son putativas y sus funciones no están del todo bien caracterizadas en modelos *in vivo*, algunos reportes presentan evidencia experimental de proteínas purificadas que exhiben actividad de transporte de Ca^{2+} o llevan a cabo una fosforilación dependiente de Ca^{2+}. Un primer ejemplo es PMA1 de *Synechocystis* sp. PCC 6803, una proteína homóloga a SERCA, que comparte con ella su sensibilidad al vanadato y a varios inhibidores específicos de las Ca^{2+}-ATPasas, además de formar un intermediario fosforilado sólo en presencia del cation (104). La proteína Cda de *Flavobacterium odoratum* (105) es el segundo ejemplo, caracterizada por comportarse como una subunidad de un complejo oligomérico, similar a las Na^+/K^+- y H^+/K^+- ATPasas que requieren de una subunidad β para su correcto ensamblaje y

actividad. De manera más reciente, la Ca^{2+}-ATPasa LMCA1 de *Listeria monocytogenes* ha sido purificada y reconstituida en liposomas, pudiéndose estudiar algunas de sus características funcionales. Entre ellas resalta su baja afinidad por Ca^{2+}, un pH óptimo alcalino, atribuido a una sustitución de uno de los aminoácidos cargados negativamente en el sitio de unión por una arginina, y una estequiometría de 1 H^+ cotransportado por cada ion Ca^{2+}, dando lugar así a un transporte electrogénico (106).

Estudios bioinformáticos han permitido identificar a otras Ca^{2+}-ATPasas tipo P como CaxP de *Streptococcus pneumoniae*, YloB de *B. subtilus*, PacL de *Synechococcus* sp. y PA2435 y PA3920 de *P. aeruginosa*. Estos hallazgos han sido corroborados en el caso de los genes *caxP*, PA2435 y PA3920 a través de su mutación y posterior evaluación del fenotipo mutante frente a la acumulación de calcio; en los tres casos se observa que las células mutantes acumulan más calcio que las células de cepas silvestres. Un rasgo común a buena parte de las Ca^{2+}-ATPasas identificadas en procariotas es que son más similares a SERCA que a PMCA (ATPasa tipo P2B) (99).

Los sistemas de transporte activo secundario de los procariotas se caracterizan por tener una baja afinidad por calcio. Dependiendo del gradiente electroquímico utilizado para transportar Ca^{2+}, se han descrito transportadores tanto para su influjo como para su eflujo. A partir de análisis filogenéticos de las secuencias de estas proteínas se han logrado agrupar de acuerdo con el ion utilizado para transportar Ca^{2+}, siendo H^+, Na^+ y PO_4^{3-}, o como miembros de la superfamilia de facilitadores de la difusión (MFs, *major facilitator superfamily*). Dentro del grupo de los intercambiadores Ca^{2+}/H^+ se encuentra YfkE de *B. subtilus*, a SynCAX de *Synechocystis* sp. y a ApCAX de *A. halophytica*; en el grupo Ca^{2+}/Na^+ se agrupa a ChaA, de *E. coli*; en el grupo Ca^{2+}/ PO_4^{3-}, se agrupa a Pit de *B. subtilus* y a PitB de *E. coli* y finalmente en el grupo MFS se encuentran los transportadores LmrP de *L. lactis* y PA2092 de *P. aeruginosa* (99). Estos ocho transportadores tienen en común que el transporte de Ca^{2+} se lleva a cabo de manera electrogénica, pero difieren en otros aspectos claves como su especificidad, y su pH óptimo. Por ejemplo, YfkE, SynCAX y ApCAX son Ca^{2+}-específicos mientras que ChaA exhibe actividad antiporte tipo Na^+/H^+ y K^+/H^+; asimismo, mientras ChaA, SynCAX y ApCAX son capaces de transportar calcio en un pH alcalino, YfkE es activo a pH 7,5 (107, 108).

En términos generales, a pesar de que tanto los sistemas de transporte activo primario como secundario han mostrado ser capaces de transportar Ca^{2+} en estudios *in vitro*, la

deleción de sus genes no ha tenido un efecto marcado sobre la homeostasis de calcio *in vivo*. Esto permite sugerir que existe una redundancia funcional de los transportadores de calcio en los genomas procariotas, hipótesis para la cual existe evidencia experimental basada en el modelo *P. aeruginosa*, cuyo genoma codifica al menos 13 transportadores de distintos tipos involucrados en la homeostasis de calcio intracelular, incluyendo dos ATPasas tipo P putativas, un canal mecano-sensitivo y un transportador de tipo MFS (109).

1.4.3 Proteínas de unión a calcio

Un aspecto complementario del estudio de la homeostasis del calcio en procariotas es la identificación y caracterización de proteínas que poseen motivos de unión a Ca^{2+} o CaBPs. Los procesos regulados a través de señales que involucran a este ion como mensajero no sólo dependen del cambio transitorio de su concentración intracelular sino también de la duración, frecuencia e intensidad de esta. Las proteínas de unión a calcio son las encargadas de reconocer y decodificar estas señales y transmitirlas por medio de eventos de fosforilación, interacciones proteína-proteína, o expresión génica.

Varios de los motivos característicos de las proteínas de unión a calcio de eucariotas, donde han sido estudiadas de manera más amplia, han sido identificados en los genomas procariotas a través de análisis de secuencia (99, 110). Uno de ellos es el motivo EFH (*EF-Hand*), que constituye la superfamilia más grande de proteínas de unión a calcio, y está conformado por un loop de unión a Ca^{2+} flanqueado por dos hélices alfa, siendo varios residuos de ácido aspártico, presente en un patrón DxDxDG, responsables por la coordinación del ion en el loop. Uno de los ejemplos más notables de proteínas que poseen un motivo de este tipo es la calmodulina, cuya actividad es importante en la regulación de varias enzimas vitales como quinasas, fosfatasas, sintetasas de NO y canales iónicos (111). En bacterias, sobresalen la caletrina de *Saccharopolyspora erythraea* (112), cuya función está relacionada con la regulación de calcio libre en el medio citosólico, y la calsimina de *Rhizobium etli* (113), que se expresa de manera exclusiva durante la invasión del hospedero. Ambas comparten una considerable similitud con la calmodulina y su actividad de unión a Ca^{2+} ha sido demostrada *in vitro*.

Otro motivo notable es el *β-roll*, presente en proteínas que no comparten una función específica. Estas proteínas poseen en su extremo C-terminal una región denominada RTX (*repeats-in-toxin*), característica que permite agruparlas en una familia de más de 1000

miembros. El dominio RTX está conformado por nonámeros de la secuencia GGXGXDXUX, donde U representa un aminoácido alifático y X cualquier aminoácido. Los primeros seis aminoácidos son responsables por la unión a Ca^{2+} mientras que los últimos tres forman una hoja β. Al igual que en el motivo EFH, el residuo de Asp, que se encuentra altamente conservado, es el responsable de la coordinación del metal y en su ausencia la estructura *β-roll* no puede formarse; asimismo, el cation es esencial para su plegamiento (99). Las proteínas de este tipo son secretadas por bacterias Gram negativas a la región extracelular y a pesar de que históricamente fueron identificadas como toxinas hemolíticas, la familia RTX también comprende varias proteasas y lipasas (114).

De manera interesante, una familia de proteínas relacionada con RTX comprende cerca de 100 genes encontrados de manera exclusiva en el genoma de *M. tuberculosis* y otras micobacterias (115). Estos genes, que representan entre un 4% y un 5% del total del genoma en micobacterias patogénicas, comparten una secuencia altamente homologa caracterizada por poseer una firma PE (Pro-Glu) en su extremo N-terminal, conectada con un dominio denominado PGRS (*polymorphic GC-rich repetitive sequence*) que al igual que los miembros de RTX presenta varios motivos de unión a Ca^{2+} del tipo GGXGXD/NXUX; estas secuencias dan a las proteínas una estructura de β-roll paralelo u hoja β paralela, característica de ciertas CaBPs. Varias de estas PG_PGRS han demostrado estar asociadas a la supervivencia del bacilo en el interior del macrófago y son importantes para su patogénesis. Se sugiere que una de sus funciones es ser una fuente de variabilidad antigénica, lo que confiere a *Mtb* la capacidad de evadir la respuesta inmune (116). La localización extracelular de estas proteínas y su actividad putativa de unión a Ca^{2+} han permitido sugerir también que poseen un rol en la interacción hospedero-patógeno mediada por calcio, al ocasionar una disminución de la concentración de Ca^{2+} citosólico, que es utilizado en el macrófago como mensajero para promover la fusión del fagosoma y el lisosoma (117).

Finalmente, otros de los motivos comunes en CaBPs, representados en procariotas, son el GK (*greek key binding domain*) y el dominio BIg (*immunoglobulin-like binding domain*). GK está presente en la familia de proteínas βγ-cristalinas y su característica principal es un motivo de llave griega doble, constituido por cuatro hojas β antiparalelas adyacentes. La coordinación de Ca^{2+} es realizada por una secuencia conservada de la forma N/D-N/D-#-I-S/T-S, en la que el residuo de la posición # provee un carbonilo que coordina directamente al ion, y el residuo apolar I contribuye al núcleo hidrofóbico del dominio (118).

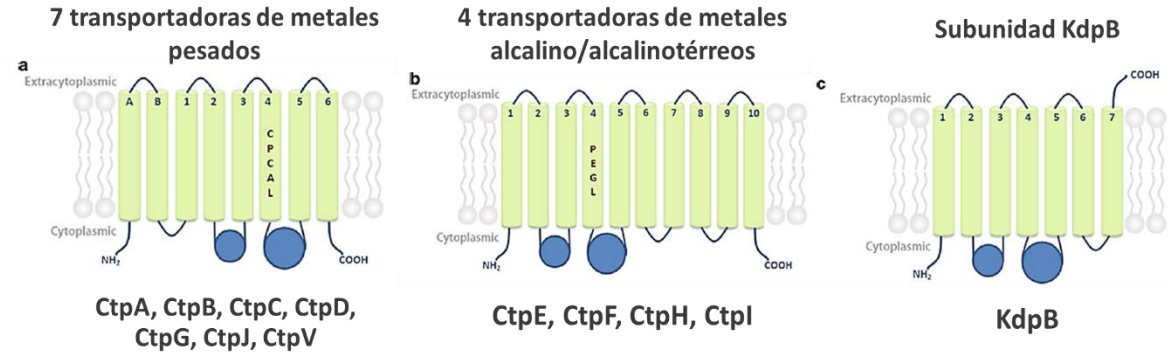
Proteínas con este motivo se han reportado en *Myxoccoccus xanthus*, *Clostridyum beijerinckii*, *Flavobacterium johnsoniae* y *Methanosarcina acetivornas*, todas compartiendo una versión bacteriana de la secuencia característica dada por N/DN/DXXT/SS, que comprende dos loops cada uno con un sitio de unión a calcio. El motivo BIg posee cierta similitud estructural con GK y está presente en una gran variedad de proteínas como enzimas, chaperonas, transportadores de moléculas y proteínas de superficie. En procariotas se ha reportado en *E. coli* y *B. circulans.* A pesar de que un rol predominante para este motivo no ha sido establecido, y que sus patrones de coordinación con Ca^{2+} no han sido determinados, se ha sugerido su participación en eventos de interacción hospedero-patógeno como la adhesión celular y la invasión (99).

1.5 CtpF es una Ca^{2+}-ATPasa de *M. tuberculosis*

Dentro del estudio de los diversos sistemas de transporte a través de la membrana y envoltura celular de *Mtb*, sobresale el hallazgo de 12 ORFs que codifican para ATPasas tipo P putativas agrupadas como transportadores de metales pesados, o miembros de la subclase P1B (CtpA, CtpB, CtpC, CtpD, CtpG, CtpJ, CtpV), transportadores de metales alcalinotérreos de la clase P2 (CtpE, CtpF, CtpH, CtpI) y un grupo conformado por un homólogo de la subunidad β del transportador de K+ procariota, KdpB, de la subclase P1A (**Figura 1-14**) (119).

Varios estudios a nivel tanto genómico como de proteína han logrado establecer que estas ATPasas comparten un rol predominante en la homeostasis de estos elementos y, en algunos casos, su deleción tiene influencia sobre cómo responde el bacilo a las condiciones del interior del macrófago, durante el proceso de infección (34, 64, 65, 120–123). De manera interesante, un metaanálisis llevado a cabo por nuestro grupo de investigación con resultados obtenidos a través de microarreglos, donde se evaluó la respuesta transcripcional de los genes de *Mtb* a varias condiciones de estrés, toxicidad y a su presencia en el interior de macrófagos humanos y murinos, permitió evidenciar que estas ATPasas se expresan en diferentes niveles frente a dichas condiciones (**Figura 1-15**) (4). Esto permite sugerir que a pesar de que en algunos casos estas bombas pueden compartir su afinidad por un ion transportado, su función no sería redundante y que incluso se expresarían de manera diferencial durante la infección.

Figura 1-14. Clasificación de las ATPasas tipo P de *Mtb* (119).



De todas las ATPasas, CtpF, el transportador activo micobacteriano más cercano a las ATPasas arquetípicas, específicamente a la SERCA-ATPasa, exhibe un comportamiento transcripcional positivo en la mayoría de condiciones consideradas en los microarreglos como la hipoxia, el estrés oxidativo y la infección de macrófagos, lo cual sugiere que la expresión de la proteína podría hacer parte de las estrategias que el bacilo utiliza durante la colonización y la alteración de las funciones de la célula hospedera. En este sentido, es importante el hecho de que el gen *ctpF* es uno de los cerca de 50 genes incluidos en el regulón DosR, relevante para la adaptación del bacilo a las condiciones de baja tensión de oxígeno y la entrada en el estado de latencia, lo que permite sugerir que al igual que en el caso de algunas ATPasas de metales pesados, aun cuando existen otras ATPasas putativas asociadas con el transporte de calcio como CtpH y CtpI, su función transportadora no sería redundante y estaría reservada casi exclusivamente para la homeóstasis durante la infección del macrófago.

A través de estudios *in silico*, como la obtención de perfiles de hidrofobicidad y la identificación de motivos conservados presentes en la estructura primaria y secundaria de CtpF, se ha logrado establecer que podría ser una Ca^{2+}-ATPasa tipo P2A y, por tanto, estar involucrada en el transporte de Ca^{2+}. CtpF comparte un 38% de identidad con la SERCA-ATPasa humana (P98194) y un 34% de identidad con la SERCA-ATPasa de conejo (P04191) y dos de sus características más notables son que posee todos los motivos típicos de las ATPasas tipo P y que conserva 10 de los 11 aminoácidos que constituyen los sitios de unión a Ca^{2+} en SERCA, presentando sólo una sustitución del residuo Asp-800 por un residuo de Ala (**Figura 1-16**) (124).

Las características funcionales de CtpF han sido evaluadas a través de distintas aproximaciones: ensayos de tolerancia, ensayos de actividad ATPasa, ensayos de inhibición, evaluación del fenotipo mutante (deleción de CtpF) y modelamiento molecular. Se ha encontrado que la expresión de CtpF desde el vector pMV261 confiere tolerancia a las micobacterias frente a concentraciones tóxicas de Ca^{2+} y Na^{+} (124). Asimismo, se ha observado que su actividad ATPasa es estimulada por iones de metales alcalinos/alcalinotérreos y es inhibida por vanadato, el inhibidor común a todas las ATPasas tipo P. En cuanto a la evaluación del fenotipo mutante, a pesar de que no se observan diferencias en cuanto a la morfología o la velocidad de crecimiento, respecto a la cepa silvestre, se observa una mayor susceptibilidad a condiciones de estrés nitrosativo como las ocasionadas por la presencia de cianuro de potasio, KCN, y nitroprusiato de sodio. Finalmente, el uso de herramientas computacionales ha permitido construir un modelo de estructura terciaria y una simulación de la dinámica molecular de la enzima en donde ha sido posible identificar las zonas atractoras de cationes, los residuos involucrados en la coordinación de Ca^{2+} y los dominios característicos de la súper-familia de las ATPasas tipo P en CtpF (124).

Figura 1-15. Esquema del comportamiento transcripcional del gen *ctpF* de *Mtb* en respuesta a condiciones de estrés (4).

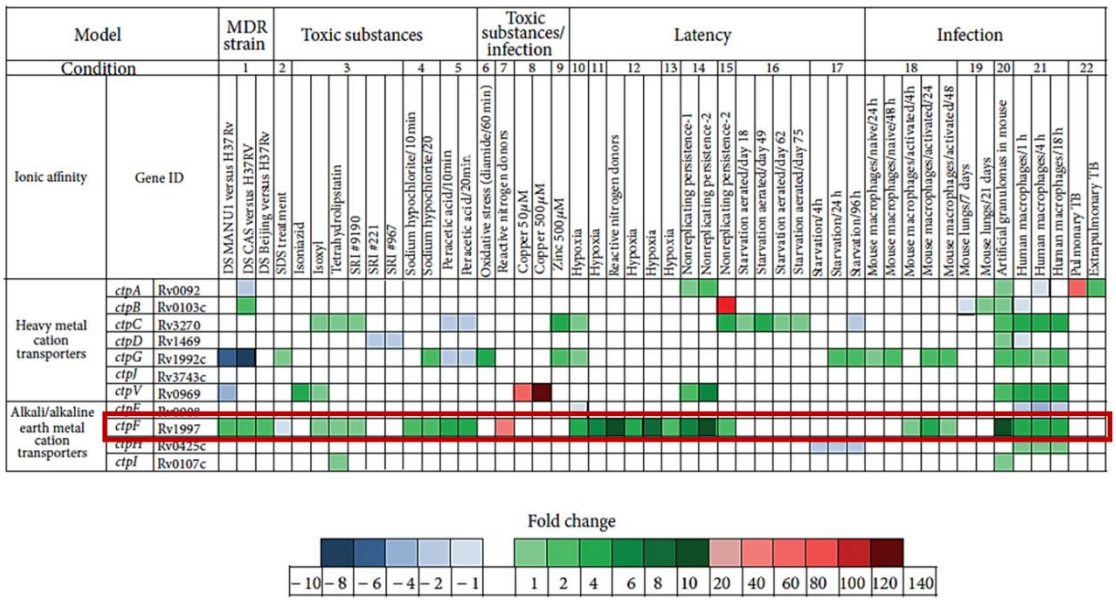
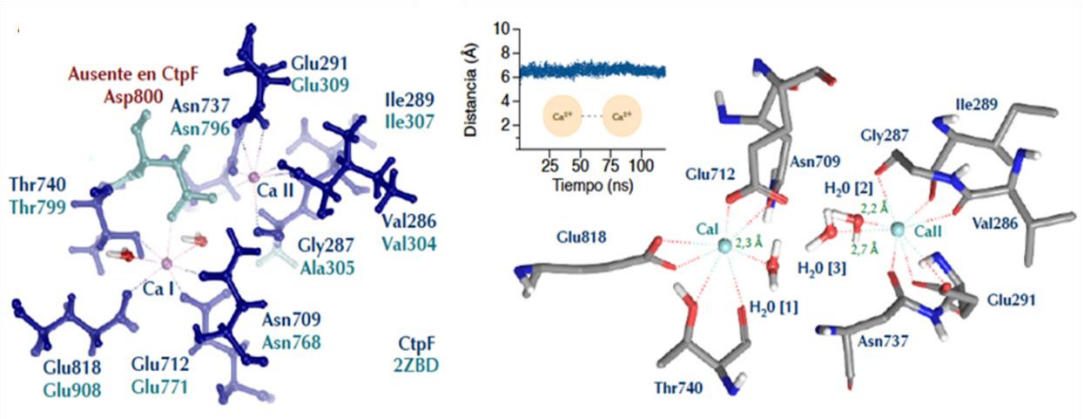


Figura 1-16. Superposición de los residuos que constituyen los sitios de unión a Ca^{2+}en SERCA y CtpF (124).



2. Hipótesis Experimental

La resistencia de *Mtb* a las condiciones adversas del ambiente intrafagosomal sugiere que la micobacteria ha desarrollado estrategias que le permiten contrarrestar o eludir la respuesta de las células inmunitarias. CtpF podría estar involucrada en tal mecanismo de defensa pues se ha observado su sobreexpresión bajo distintas condiciones de estrés que simulan el ambiente al interior del fagosoma. De manera notable, CtpF ha demostrado conferir resistencia a concentraciones tóxicas de Na^+, K^+ y Ca^{2+} además de poseer una actividad ATPasa vanadato-sensible y Ca^{2+}-dependiente, lo que coincide con los estudios *in silico* que sugieren su relación con el transporte activo de Ca^{2+}.

En este sentido, CtpF es una posible transportadora de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática y su sobreexpresión en la membrana de *M. smegmatis* permitiría el eflujo de Ca^{2+} y menor acumulación de este metal en el interior celular con una cepa silvestre. El fenómeno contrario sucedería en vesículas de membrana preparadas a partir de la cepa recombinante, las que acumularían Ca^{2+} en su interior. Esto concuerda con el hecho de que la proteína confiere resistencia a concentraciones tóxicas de Ca^{2+} y que su actividad es dependiente de ATP, estimulada por el catión e inhibida por vanadato de sodio.

Por tanto, la pregunta de investigación a resolver en este trabajo fue ¿Está CtpF involucrada en el eflujo de calcio en *Mtb*, como respuesta a un gradiente de concentración de Ca^{2+}?

3. Objetivos

3.1 Objetivo General

Confirmar el papel de la ATPasa tipo P_{IIA} CtpF de *Mycobacterium tuberculosis*, en el eflujo de iones Ca^{2+}, desde el interior de las células de micobacterias.

3.2 Objetivos específicos

1. Sobreexpresar la proteína CtpF de *Mycobacterium tuberculosis* de forma heteróloga en la membrana plasmática de *Mycobacterium smegmatis*.
2. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de CtpF en la membrana plasmática de *Mycobacterium smegmatis* sobre la acumulación de Ca^{2+} en vesículas de membrana.
3. Evaluar el efecto de la sobreexpresión de CtpF en la membrana plasmática de *Mycobacterium smegmatis* sobre la acumulación de Ca^{2+} en las células bacterianas completas.

4. Materiales y métodos

4.1 Comparación *in silico* de CtpF y Pma1

Con el fin de encontrar similitudes en las secuencias de CtpF y Pma1 respecto a otras Ca^{2+}-ATPasas de micobacterias y organismos eucariotas, que permitieran inferir que su función es similar y que se comportarían aproximadamente de la misma manera en los ensayos de acumulación, se decidió realizar un alineamiento múltiple de 12 ATPasas pertenecientes al grupo P2. Las secuencias fueron obtenidas de la base de datos UniProt (125) y todas corresponden a la clasificación “revisada”, lo que garantiza la fidelidad de la información. El software Jalview 2.10.5 (126) fue utilizado para organizar las secuencias y rotularlas y el archivo sirvió como entrada para el programa MEGA 10 (127). En él se llevó a cabo el alineamiento múltiple utilizando la herramienta MUSCLE (128) y posteriormente fue visualizado en Jalview. MEGA 10 fue utilizado posteriormente para con base en el alineamiento obtenido construir un árbol filogenético que permitiera analizar la relación evolutiva entre las ATPasas seleccionadas. El mejor modelo fue seleccionado con base en el criterio de información Bayesiano (BIC), siendo un modelo tipo Whelan y Goldman (WAG) con una función de distribución Gamma discreta (+G) y la suposición de que una fracción de los sitios es evolutivamente invariable (+I, 2,53% de los residuos). Finalmente, se obtuvo el alineamiento utilizando la estimación de máxima verosimilitud con base en el alineamiento preparado con MUSCLE y utilizando 100 réplicas Bootstrap para evaluar el peso de cada rama (129, 130).

4.2 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las cepas utilizadas en este trabajo se listan en la**Tabla 4-1**. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB) líquido con agitación constante a 80 rpm o en LB-agar, a 37 °C. Dependiendo del caso, el medio se suplementó con ampicilina (100 µg/mL) o kanamicina (25 µg/mL) y en los ensayos de selección blanco azul se empleó 5-bromo-4-

cloro-3-indolil-β-galactopiranosido (X-Gal, 80 µg/mL) e Isopropil-β-D-tiogalactopiranosido (IPTG, 0,5 mM). Las cepas de *M. smegmatis* mc^{2}155 fueron cultivadas en medio LB suplementado con Tween 80 (0,05%) o medio Sauton pH 7,4 suplementado con glucosa (0,2%) y Tween 80 (0,05%), además de kanamicina (25 µg/mL) en el caso de las cepas recombinantes.

Tabla 4-1. Cepas bacterianas utilizadas en el desarrollo de este trabajo.

Cepa	Características principales	Origen/Referencia
***E. coli* DH5α**	RecA-, endA-, permite selección "blanco/azul" sin necesidad de IPTG.	Life Technologies
***E. coli* Top10**	Amp^R, endA-, RecA-, araBADC$^-$, es capaz de transportar L-arabinosa, pero no metabolizarla.	Invitrogen
***M. smegmatis* mc^{2}155**	Micobacteria no patógena de crecimiento rápido, amp^R, chx^R, car^R.	(131)
***M. smegmatis* Δ3926**	Mutante del gen *pma1* (MSMEG_3926) a partir de la cepa silvestre *M. smegmatis* mc^{2}155.	(124), Construido en el WPI, MA, USA.
***M. smegmatis* mc^{2}155: pLNA29**	Expresión del gen *ctpF*, desde vector basado en pMV261.	Este estudio.
***M. smegmatis* Δ3926: pLNA29**	Expresión del gen *ctpF*, desde vector basado en pMV261.	Este estudio.
***M. smegmatis* Δ3926: pCAT3**	Expresión del gen *pma1*, desde vector basado en pMV261.	Este estudio.

4.3 Oligonucleótidos y amplificación por PCR

Los oligonucleótidos y los programas de PCR utilizados en este estudio se presentan en la**Tabla 4-2** y **Tabla 4-3** , respectivamente. El diseño de los iniciadores tuvo en cuenta las características deseables definidas en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (124, 132) como un %CG de entre el 50% y el 60%, un Tm en el rango de 55°C a 70°C, un único sitio de anillamiento en el molde, ausencia de auto complementariedad, dímeros y horquillas. Los iniciadores usados en la clonación de *ctpF* contienen además sitios de restricción y una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 3'. Asimismo, se diseñaron de tal forma que garantizan la inserción en marco de lectura respecto al sitio de inicio de la transcripción asociado al promotor de choque térmico *Hsp60*, presente en el plásmido lanzadera de expresión en micobacterias pMV261.

Tabla 4-2. Listado de oligonucleótidos utilizados en las PCR llevadas a cabo durante este trabajo. La región complementaria a *ctpF* de los iniciadores Fcm2 Dir y Fpmv Rev se muestra en minúscula.

Iniciador	Secuencia (5'-3')	Aplicación	Referencia
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	Comprobación direccionalidad en pGEMT-Easy	(124)
Sp6	TAGGTGACACTATAGAATACTC		
F-RT Dir	CAGTGATCTTCGGTGTGGTG	Comprobaciones del gen *ctpF* y RT-qPCR	
F-RT Rev	GATTGAGCGTGAACGAGTCA		
RT.1997 Dir	ATCACCTGGACGCTGCCCAC	Comprobaciones del gen *ctpF*.	
RT.1997 Rev	CGTCGCCTTGCCGATTCTGC		
pMVComp Up	CAGCGAGGACAACTTGAGC	Comprobaciones en pMV261.	
pMVComp Down	CGACTGCCAGGCATCAAATA		
Fcm2 Dir	TTTTGGGATCCAttgtcggcgtcagtgtctg	Adición del sitio de restricción BamHI al extremo 5' de *ctpF*.	Este estudio.
Fpmv His Rev	TTTTTAAGCTTCAATGATGATGATGATGATGtggcggttgcgcccgta	Adición de una etiqueta de 6 histidinas y el sitio de restricción HindIII al extremo 3' de *ctpF*.	
Tm903 A	CTCGTGAAGAAGGTGTTGCT	Comprobación del casete de	(132)

Tm903 B	CCGACCATCAAGCATTTTAT	resistencia a kanamicina.	
Pma1-RT-Rev1	CTCCCGCACAGGTGCTGTGG	Comprobaciones del gen *pma1* (MSMEG_3926).	
Pma1-RT-Rev2	GGTGTCGACGGACTACAGGT		
Pma1-RT-Dir2	GGCGATGATGTCACCACAC		
***M. sm* 16S RT Dir**	GTGCATGTCAAACCCAGGTAAGG	RT-qPCR	
***M. sm* 16S RT Rev**	GGGATCCGTGCCGTAGCTAAC		

Por otra parte, la amplificación por PCR del gen *ctpF* fue llevada a cabo con la enzima de alta fidelidad PFU (Thermo Scientific) para minimizar la probabilidad de inserción de nucleótidos erróneos en la secuencia, mientras que las PCR de comprobación fueron ejecutadas con la enzima Taq Polimerasa (Thermo Scientific). La temperatura de anillamiento fue escogida de acuerdo con el Tm de cada pareja de primers mientras que el tiempo de extensión se calculó con base en el tamaño esperado del producto, a razón de 1 minuto/kb. El programa de amplificación por RT-qPCR se diseñó según protocolos estandarizados en trabajos previos (124, 132).

Tabla 4-3. Programas de PCR utilizados para las comprobaciones, la amplificación del gen *ctpF* y los ensayos de RT-qPCR llevados a cabo en este estudio.

Molde	Iniciadores	Programa (Inicial-Desnaturalización-Anillamiento-Extensión-Final)	Tamaño del producto/bp
pLNA24a	T7/F-RT Rev	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] $_{\text{x 35 ciclos}}$, 72°C x 10 min.	602
pLNA24b	Sp6/F-RT Rev	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] $_{\text{x 35 ciclos}}$, 72°C x 10 min.	620

ADN *M. tuberculosis* Ra	Fcm2 Dir/Fpmv His Rev	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 62,6°C x 30 s; 72°C x 3 min] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	2757
pMV261	Tm903 A/Tm903 B	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	846
MSMEG_3926	Pma1 RT Dir2/Pma1 RT Rev1	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	1843
MSMEG_3926	Pma1 RT Dir2/Pma1 RT Rev2	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	153
pLNA29	pMVComp Up/F-RT Rev	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	655
pLNA29	pMVComp Up/RT.1997 Rev	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	2330
pLNA29	pMVComp Down/F-RT Dir	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	690
pLNA29	pMVComp Down/RT.1997 Dir	94°C x 10 min, [94°C x 30 s; 58°C x 30 s; 72°C x 45 s] x 35 ciclos, 72°C x 10 min.	2528
cADN *M. smegmatis*: pLNA29	F-RT Dir/F-RT-Rev	95°C x 5 min, [95°C x 10 s; 60°C x 10 s; 75°C x 15 s] x 49 ciclos	248
cADN *M. smegmatis*: pLNA29	*M. sm* 16S RT Dir/ *M. sm* 16S RT Rev	95°C x 5 min, [95°C x 10 s; 58°C x 10 s; 75°C x 15 s] x 49 ciclos	156

4.4 Construcción del recombinante CtpF en pMV261

4.4.1 Clonación del gen *ctpF* en el vector pGEMT-Easy

Amplificación del gen *ctpF*

Los iniciadores Fcm2Dir y FpmvHis-Rev fueron utilizados para amplificar el gen *ctpF* utilizando DNA genómico de *M. tuberculosis* H37Ra como molde, de acuerdo con las condiciones presentadas en la **Tabla 4-3**, utilizando la enzima PFU polimerasa 5U/µL (Thermo Scientific). Estas condiciones fueron seleccionadas luego de un proceso de optimización que incluyó la variación en la concentración final de DMSO, iniciadores y la temperatura de anillamiento. Estos iniciadores incorporan un sitio de restricción para la

enzima BamHI en el extremo 5' y un sitio de restricción para la enzima HindIII, además de una etiqueta de 6 histidinas en el extremo 3'. La formación del producto cuyo tamaño esperado era de 2757 bp fue verificada en un gel de agarosa al 2% y las bandas fueron cortadas y purificadas con el kit FavorPrep Gel/PCR Purification MiniKit (Favorgen).

Adición de adenina en 3' y ligación en pGEMT-Easy

Dado que la amplificación con la enzima de alta fidelidad PFU produce extremos sin adenina extra en 3', contrario a la amplificación con enzimas como la Taq Polimerasa, fue necesario añadir una adenina en 3' con el fin de mejorar la eficiencia de la reacción de ligación con el vector pGEMT-Easy (Promega). Para esto, el producto purificado fue mezclado con 5 U de Taq Polimerasa, Buffer Taq $(NH_4)_2SO_4$ 1X, 2 mM $MgCl_2$ y 0,2 mM dATP. La mezcla se incubó a 70 °C durante 30 minutos y el producto fue purificado utilizando el kit FavorPrep Gel/PCR Purification MiniKit (Favorgen). Este producto fue utilizado para llevar a cabo una reacción de ligación con 50 ng de vector pGEMT-Easy, según el protocolo del fabricante, empleando relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:3 (vector: inserto). La reacción se llevó a cabo en una etapa de 1 hora a 22 °C seguida por una de 18 horas a 4 °C. El producto generado se denominó pLNA24.

Transformación de los productos de ligación y selección de colonias recombinantes

Los productos fueron transformados por electroporación (25 µF, 2,5 kV y 200 Ω) en células electrocompetentes de *E. coli* DH5α, que luego del pulso eléctrico fueron recuperadas en LB durante 1,5 horas a 37°C. Estos cultivos fueron sembrados en placas agar-LB suplementadas con ampicilina y X-Gal en una concentración final de 100 µg/mL y 20 µg/mL, respectivamente; se incubaron a 37 °C durante 22 horas. Las colonias blancas obtenidas transcurrido este tiempo fueron repicadas en una nueva placa agar-LB-Amp-X-Gal, e incubadas otras 22 horas a la misma temperatura. Se seleccionaron colonias blancas, a las que se les verificó la inserción del recombinante mediante una PCR de colonia utilizando las parejas de iniciadores T7/F-RT-Rev (producto 602 bp) y SP6/F-RT-Rev (producto 620 bp).

Mapeo de restricción

Las colonias positivas fueron cultivadas hasta fase exponencial y se realizó una extracción de plásmido utilizando el kit FavorPrep Plasmid Extraction MiniKit (Favorgen). Se llevó a cabo un mapeo con las enzimas de restricción *Bam*HI, *Pvu*II, *Eco*RI, *Pst*I y *Sal*I.

4.4.2 Clonación del gen *ctpF* + His tag en el vector pMV261

Digestión doble de pLNA24 y pMV261

El plásmido pLNA24 fue digerido en una reacción simultánea con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, las cuales flanquean el gen fusionado a una etiqueta de 6 histidinas. La reacción fue llevada a cabo en el buffer FastDigest y los productos fueron visualizados en un gel de agarosa al 2%, para ser posteriormente cortados y purificados utilizando el kit FavorPrep Gel/PCR Purification MiniKit (Favorgen). Paralelamente, el vector pMV261 fue digerido y defosforilado con las mismas enzimas de restricción y la enzima FastAP en buffer FastDigest, se visualizó en un gel de agarosa al 2% y se purificó de manera similar al inserto. Las reacciones se realizaron durante 1 hora a 37 °C.

Ligación y transformación de los productos de ligación

El vector cortado y defosforilado se ligó con el inserto en relaciones molares (vector: inserto) 1:1, 1:2 y 2:1, utilizando 30 ng de vector, la enzima T4 DNA ligasa (Thermo Scientific) y buffer DNA ligasa 1X. La reacción se llevó a cabo en un termociclador donde se programó una rampa de temperatura de 18 °C a 22 °C, a 1 °C/hora, seguido de una incubación a 4 °C durante 16 horas. Los productos fueron precipitados con etanol absoluto, resuspendidos en agua desionizada y transformados por electroporación (25 µF, 2,5 kV y 200 Ω) en células electrocompetentes de *E. coli* Top10 que luego del pulso eléctrico fueron recuperadas en medio LB durante 1,5 horas a 37°C. Estos cultivos se sembraron en placas agar-LB suplementadas con Kanamicina en una concentración final de 25 µg/mL y estas se incubaron a 37 °C durante 22 horas. El producto generado se denomina pLNA29.

Selección de colonias positivas y mapeo de restricción

Las colonias observadas luego de 22 horas se ensayaron mediante PCR de colonia utilizando la pareja de iniciadores pMVComp Up/F-RT-Rev (producto 655 bp), con el objetivo de comprobar que efectivamente eran recombinantes. Las colonias positivas fueron inoculadas en medio LB líquido suplementado con Kanamicina 25 µg/mL, incubando 22 horas a 37 °C. Se realizó una extracción de plásmido utilizando el kit FavorPrep Plasmid Extraction MiniKit (Favorgen) que luego fue ensayado en un mapeo de restricción con las enzimas *Bsp*HI, *Nco*I, *Mfe*I y *Xho*I. Finalmente, el plásmido fue secuenciado para corroborar la integridad de su secuencia (ver **Anexo D**).

Transformación de cepas wt y Δ3926 (Δ*pma1*)

M. smegmatis mc^{2}155 wt y una cepa de la misma especie delecionada en el gen *pma1* (MSMEG_3926), homólogo de *ctpF*, provista por el laboratorio del Dr. José Argüello (124), fueron utilizadas para preparar células electrocompetentes que posteriormente se transformaron con el plásmido pLNA29. Adicionalmente, la cepa mutante (Δ3926) fue transformada con el plásmido pCAT3, un recombinante del gen *pma1* previamente construido sobre el esqueleto del vector pMV261 (132). Las colonias recombinantes fueron seleccionadas en placas agar-LB-Km (25 µg/mL) y verificadas a través de PCR en colonia.

4.4.3 Expresión heteróloga de CtpF en *Mycobacterium smegmatis*

Sobreexpresión de CtpF e inmunodetección

5 mL de medio LB + Km fueron inoculados con las respectivas cepas control y recombinantes de *M. smegmatis* y *M. smegmatis* Δ3926 y se permitió su crecimiento hasta fase exponencial. En este punto se determinó el OD a 595 nm y con base en eso se preparó una dilución de tal manera que el OD inicial fuera 0,02 en 10 mL de LB. Se incubó a 37°C durante 24 horas y en este punto los cultivos se indujeron incubando a 45°C durante 3, 6, 9, 12 y 24 horas, preservando un control no inducido. Las células se recolectaron por centrifugación a 8500 rpm durante 10 minutos y los pellets se lavaron 2 veces con buffer de lavado (MOPS 10 mM + 1 mM PMFS, pH=7,4). Los pellets se resuspendieron finalmente en 500 µL del mismo buffer y se mezclaron con 0,4 g de perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro. Se lisaron de forma mecánica mediante 8 pulsos de 1 minuto con un MiniBead Beater (BioSpec Products), incubando 1 minuto a -20°C entre cada pulso. La mezcla resultante se separó centrifugando 30 minutos a 25000 g y el sobrenadante fue analizado por SDS-PAGE. La electro-transferencia hacia la membrana de celulosa se realizó en buffer CAPS 10 mM + 10% Metanol en una cámara Mini-Trans Blot (Biorad), programando 150 mA durante 2 horas. El revelado se realizó utilizando anticuerpo primario anti-6xHis de conejo (Thermo Scientific) en una dilución 1:1000, anticuerpo secundario de cabra anti-conejo acoplado a la enzima peroxidasa de rábano (Thermo Scientific) en una dilución 1:1000.

Estimación de la sobreexpresión por RT-qPCR

Utilizando las condiciones de cultivo descritas con anterioridad, *M. smegmatis* mc^2155 y Δ3926, transformadas con pMV261 o pLNA29 fueron cultivadas en medio Sauton hasta fase exponencial y sometidas a un proceso de inducción por choque térmico a 45°C durante 30, 60 y 90 minutos, considerando un control no inducido (0 minutos). Se extrajo su ARN y se analizó el comportamiento transcripcional de *ctpF* en función del tiempo de inducción. La extracción de ARN, llevada a cabo utilizando el reactivo TRIzol (Invitrogen), está basada en una metodología denominada *single-step* (133) la cuál a través del empleo de una solución ácida de tiocianato de guanidinio, acetato de sodio, fenol y cloroformo logra separar el ARN del ADN genómico al mantenerlo en la fase acuosa, desplazando a la mayoría de las proteínas y ADN hacia la interfase y la fase orgánica. Cuando se remueve la fase acuosa, el ARN se puede precipitar de ella utilizando isopropanol.

Los pellets celulares se resuspendieron en 700 µL de reactivo TRIzol en presencia de inhibidor de RNAsas. La solución fue transferida a tubos de microcentrifuga de 1,5 mL y fue mezclada con 0,4 g de perlas de vidrio de 0,1 mm de diámetro. Las células se lisaron de forma mecánica en 3 pulsos de 2 minutos con un MiniBead Beater (BioSpec Products), incubando 1 minuto a -20°C entre cada pulso. Luego se añadieron 300 µL de cloroformo, se dejó en reposo por 10 minutos a 4°C y se centrifugó a 13000 rpm por 10 minutos a 4°C. La fase acuosa fue separada y el ARN fue precipitado desde ella tras añadir isopropanol (IPA) e incubar 18 horas a -20 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó nuevamente a 13000 rpm durante 15 min y 4 °C. Los pellets, que correspondieron al ARN precipitado, fueron secados en una cabina de extracción y resuspendidos en 25 µL de DEPC 0,1%. La integridad del RNA extraído fue corroborada en gel de agarosa al 2% en buffer TE 0.5X-DEPC. Posteriormente fue tratado con DNAsa I (Thermo Scientific), durante 30 minutos a 37°C, para eliminar ADN genómico contaminante. A partir de 2 µg de ARN se construyeron las librerías de cADN usando el kit *RevertAid First Strand cDNA Synthesis* (Thermo Scientific). El cADN se almacenó a -20°C hasta su uso.

Los niveles de transcripción de los genes *ctpF* y *ARN 16S* fueron analizados mediante PCR en tiempo real, utilizando el kit EXPRESS SYBR GreenER qPCR SuperMix (Invitrogen), en un termociclador CFX-96 (Biorad). El gen *ARN 16S* fue utilizado como normalizador y se realizó una cuantificación relativa, determinando la eficiencia de todos los cADN extraídos y haciendo un análisis por medio del método de Pfaffl (134)

4.5 Ensayos de acumulación en células completas

4.5.1 Ensayo de acumulación de Ca^{2+}

Preparación de las muestras

Las cepas recombinantes y control fueron cultivadas en medio Sauton hasta un OD_{595} aproximadamente igual a 1. Se determinó el OD_{595} exacto y este valor se utilizó para calcular la cantidad necesaria de este cultivo para inocular 10 mL de Sauton, de tal manera que su OD_{595} final fuera igual a 0,02. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C y 80 rpm, para luego ser subdivididos en porciones de 5 mL. Las porciones se denominaron positiva y negativa. La porción positiva fue suplementada con $CaCl_2$ 10 mM (anexo B) y la porción negativa con agua desionizada estéril. Ambas se cultivaron durante 1 hora a 37°C y 80 rpm para luego ser recolectadas por centrifugación a 8500 rpm. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces con buffer de lavado (10 mM MOPS, 140 mM cloruro de colina, 0,5 mM DTT, 250 mM glucosa, pH=7,4), recolectando el pellet por centrifugación en cada lavado. Se removió todo el buffer y el pellet se dejó secar aproximadamente 3 días a 37°C, hasta peso constante. El pellet seco fue digerido en 500 µL de HNO_3 65% ultra puro a 80°C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió 200 µL de H_2O_2 al 30% para detener la digestión y se completó a un volumen de 10 mL con HNO_3 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm).

Análisis del contenido de calcio de las muestras

Para la cuantificación de calcio en las muestras se preparó una curva de calibración en el rango 1,00 a 5,00 ppm, realizando diluciones gravimétricas de un patrón primario de $CaCl_2$ 1000 ppm. Como diluyente se utilizó HNO_3 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica en el equipo Perkin-Elmer AAnalyst 300, utilizando el método de atomización con una llama aire-acetileno y una lámpara Ca/Mg (20 mA) a 422.7 nm y un ancho de 0,7 nm. El contenido de calcio se calculó como la diferencia entre la muestra positiva y la muestra negativa para cada cepa y se expresó como mg de calcio/mg de pellet seco. La acumulación se normalizó respecto al contenido del metal registrado en la cepa control *M. smegmatis* mc^2155 wt o Δ3926.

4.5.2 Ensayo de acumulación de Na^+ y Na^+/K^+

Preparación de las muestras

Las cepas recombinantes y control fueron cultivadas en medio Sauton hasta un OD_{595} aproximadamente igual a 1. Se determinó el OD_{595} exacto y este valor se utilizó para calcular la cantidad necesaria de este cultivo para inocular 10 mL de Sauton, de tal manera que su OD_{595} final fuera igual a 0,02. Los cultivos se incubaron durante 24 horas a 37°C y 80 rpm, para luego ser subdivididos en porciones de 5 mL. Las porciones se denominaron positiva y negativa. La porción positiva fue suplementada con NaCl 240 mM o NaCl 240 mM/KCl 40 mM (anexo B) y la porción negativa con agua desionizada estéril. Ambas se cultivaron durante 1 hora a 37°C y 80 rpm para luego ser recolectadas por centrifugación a 8500 rpm. Se desechó el sobrenadante y el pellet fue lavado dos veces con buffer de lavado (25 mM MOPS, 25 mM $MgSO_4$, 0,5 mM DTT, 420 mM sacarosa, pH=6,8), recolectando el pellet por centrifugación en cada lavado. Se removió todo el buffer y el pellet se dejó secar aproximadamente 3 días a 37°C, hasta peso constante. El pellet seco fue digerido en 500 µL de HNO_3 65% ultra puro a 80°C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se añadió 200 µL de H_2O_2 al 30% para detener la digestión y se completó a un volumen de 10 mL con HNO_3 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm).

Análisis del contenido de sodio de las muestras

Para la cuantificación de sodio en las muestras se preparó una curva de calibración en el rango 0,30 a 2,00 ppm, realizando diluciones gravimétricas de un patrón primario de NaCl 1000 ppm. Como diluyente se utilizó HNO_3 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm) y tanto a las muestras como a los niveles de la curva se añadió CsCl en una concentración final de 0,1% p/v, como inhibidor de ionización. Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica en el equipo Perkin-Elmer AAnalyst 300, utilizando el método de atomización con una llama aire-acetileno y en el modo de emisión. El contenido de sodio se calculó como la diferencia entre la muestra positiva y la muestra negativa para cada cepa y se expresó como mg de sodio/mg de pellet seco. La acumulación se normalizó respecto al contenido del metal registrado en la cepa control *M. smegmatis* mc^2155 wt o Δ3926.

4.6 Ensayos de acumulación en vesículas de membrana

4.6.1 Obtención de vesículas de membrana

2 L de medio LB suplementado con Kanamicina (25 µg/mL) fueron inoculados con las cepas recombinantes y control e incubados a 37 °C, 80 rpm, hasta un OD_{595} igual a 1,0. Los cultivos fueron inducidos con un choque térmico a 42 °C durante 1,5 horas y los pellets fueron recolectados por centrifugación. Los pellets se lavaron con una solución de sacarosa (250 mM en 10 mM MOPS) dos veces, centrifugando en cada paso, se desechó el sobrenadante y se pesaron. Se resuspendieron en buffer de lisis (1 mM EDTA, 10 mM MOPS, 1 mM PMFS, 1mg/mL Lisozima, pH=7,4, 2 mL por cada gramo de pellet) y se incubaron a temperatura ambiente durante media hora. Estas suspensiones fueron mezcladas con 0,4 g de perlas de vidrio de 0,1 mm y fueron sometidas a 6 pulsos de 1 minuto en un MiniBead-Beater (BioSpec Products), incubando 1 minuto a -20 °C entre cada pulso. La mezcla se centrifugó a 25000 g durante 0,5 horas a 4 °C y se recuperó el sobrenadante. Este sobrenadante fue centrifugado a 100000 g durante 1 hora a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante fue resuspendido en solución de sacarosa (250 mM en 10 mM MOPS + Brij58 0,05%), su contenido de proteína cuantificado utilizando el método de Bradford (135) y el método de BCA (136) por medio del kit Pierce BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific), alicuotado y almacenado a -80 °C hasta su uso.

4.6.2 Actividad ATPasa de las vesículas de membrana

Con el fin de verificar que las vesículas de membrana poseían actividad ATPasa estimulada por Ca^{2+} se llevó a cabo un ensayo para cuantificar el fosfato inorgánico (PO_4^{3-} o Pi) liberado durante la hidrólisis de ATP producto del transporte del ion metálico mediado por la enzima ATPasa. Esta cuantificación se realiza de acuerdo con el método de Fiske-Subbarow (137), modificado por la adición de citrato de bismuto para lograr una mayor sensibilidad (138). El Pi liberado reacciona con molibdato en medio ácido dando lugar al ácido fosfomolíbdico que luego es reducido al reaccionar con ácido ascórbico generando un complejo de color azul, intensificado en presencia de bismuto, con un máximo de absorbancia alrededor de los 690 nm.

Los ensayos de actividad se realizaron sobre las membranas extraídas de las cepas recombinantes *M. smegmatis* mc^2155 wt o Δ3926 transformadas con los vectores pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), restando la actividad resultante de las membranas de las cepas

control, que sólo poseen el vector pMV261 vacío. La reacción se diseñó para llevarse a cabo en un volumen final de 50 µL, utilizando 8 µg de proteína (vesículas de membrana) y un buffer de reacción compuesto por MOPS 10 mM, $MgCl_2$ 3,00 mM, ATP 1,00 mM, Brij58 0,05%, KCl 150 mM y sacarosa 250 mM. La reacción se inició añadiendo una disolución $CaCl_2$-EGTA tal que la concentración de Ca^{2+} libre fuese 30 µM (124). Las muestras se prepararon en una placa ELISA y se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. La reacción se detuvo añadiendo 100 µL de solución de parada (3% ácido ascórbico, 0,5% molibdato de amonio, 3% SDS, 2 M HCl) y se incubaron en hielo durante 10 minutos. Se añadió luego 150 µL de solución de estabilización (3,5% citrato de bismuto, 3,5% citrato de sodio, 2 M HCl) y se incubaron 10 minutos adicionales a 37 °C. La absorbancia de cada muestra fue determinada en un lector de placas iMark Microplate Absorbance Reader (BioRad) a 690 nm. La actividad ATPasa se calculó como nmol de Pi liberado por mg de proteína por minuto de reacción (nmol Pi*mg^{-1}*min^{-1}) y fue normalizada respecto a la actividad ATPasa de las vesículas de la cepa control *M. smegmatis* $mc^2$155 wt o Δ3926.

4.6.3 Acumulación de Ca^{2+} en vesículas de membrana

Con el fin de estudiar la dirección de transporte de CtpF, las vesículas de membrana fueron utilizadas en un ensayo de acumulación en presencia de ATP y Ca^{2+}. En este ensayo se evalúa la cantidad de calcio acumulada al interior de las vesículas de membrana obtenidas a partir de los recombinantes pLNA29 o pCAT3 respecto a las cantidades acumuladas en vesículas control. La cuantificación se realiza utilizando la técnica de espectroscopía de absorción atómica bajo la metodología de atomización por llama.

Las reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 100 µL, con 10 µg de proteína y en un buffer de reacción (MOPS 100 mM, $MgCl_2$ 3 mM, ATP 3 mM, Brij-58 0,05%, KCl 150 mM, sacarosa 250 mM, pH=7,4). La mezcla se activó con un precalentamiento a 37 °C durante 1 minuto y se dio inicio a la reacción añadiendo Ca^{2+} en una concentración final de 100 µM (124). Se incubó a 37 °C durante 30 minutos y se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de 0,20 µm. El filtro fue lavado con 1 mL de buffer de lavado (MOPS 100 mM, $MgCl_2$ 3 mM, EGTA 1 mM, Brij-58 0,05%, KCl 150 mM, sacarosa 250 mM), utilizando EGTA para remover el exceso de calcio, y el filtro fue digerido en 500 µL de HNO_3 65% ultra puro a 80 °C durante 1 hora y a temperatura ambiente durante 18 horas. Se adicionó 20 µL de H_2O_2 30% y se completó a 1 mL con HNO_3 al 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm).

La cuantificación de calcio en las muestras se llevó a cabo preparando una curva de calibración en el rango 100 a 1000 ppb, realizando diluciones gravimétricas de un patrón primario de $CaCl_2$ 1000 ppm. Como diluyente se utilizó HNO_3 2% en agua ultra pura (18 mOhms*cm). Las medidas se realizaron en un espectrofotómetro de absorción atómica en el equipo ContrAA 700, utilizando el método de atomización con una llama aire-acetileno y una lámpara de xenón como fuente de radiación continua a 422.7 nm. El contenido de calcio se calculó como la diferencia entre un control negativo y la muestra para cada cepa y se expresó como nmol Ca^{2+}/mg de proteína. La acumulación se normalizó respecto al contenido del metal registrado en las vesículas de membrana de la cepa control *M. smegmatis* mc^2155 wt o Δ3926.

Acumulación de calcio en presencia de vanadato de sodio (Na_3VO_4)

Para evaluar el impacto de la inhibición por vanadato sobre la acumulación de calcio en las vesículas de membrana y de esta manera observar su dependencia en el transporte mediado por ATPasas tipo P, el ensayo de acumulación se llevó a cabo en presencia de concentraciones variables de Na_3VO_4 (10, 20 y 30 µM). Con el fin de minimizar la interferencia de Pma1 en las vesículas de membrana obtenidas a partir de *M. smegmatis* mc^2155 wt, este ensayo se llevó a cabo comparando vesículas de membrana de *M. smegmatis* mc^2155 Δ3926 transformadas con pLNA29 y normalizando respecto a la cepa transformada con el vector vacío.

5. Resultados y discusión

5.1 Comparación *in silico* de las proteínas CtpF y Pma1

5.1.1 Alineamiento múltiple

Con el fin de comparar las secuencias de CtpF y Pma1 con las Ca^{2+}-ATPasas de la clase P2 se llevó a cabo un alineamiento múltiple que permitió la identificación de los residuos conservados característicos de las ATPasas tipo P entre un grupo de ATPasas seleccionadas, que se listan en la **Tabla 5-1**.

Tabla 5-1. Listado de 12 ATPasas tipo P2 seleccionadas para el alineamiento múltiple.

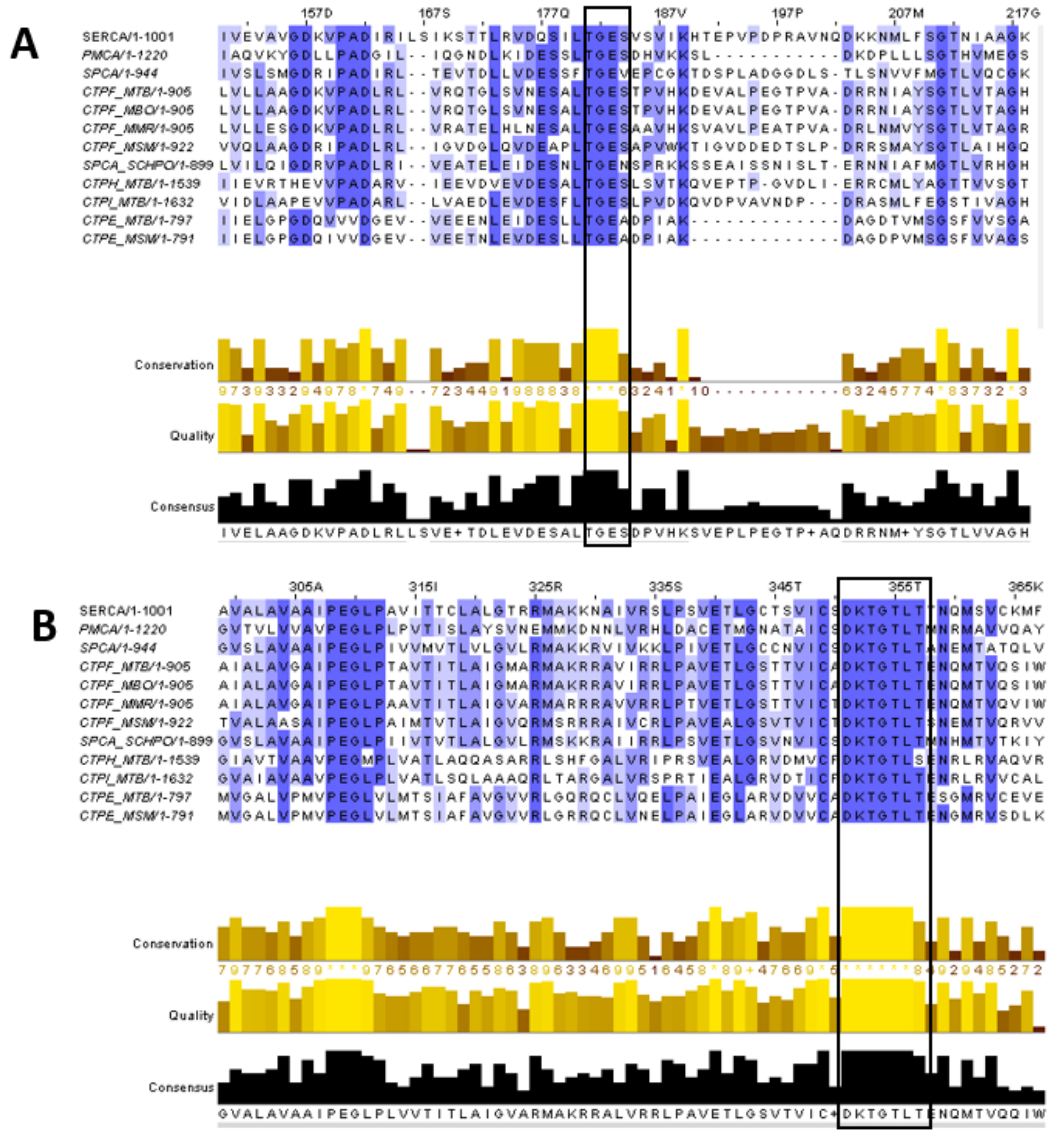
UniProt ID	Nombre	Especie	Tipo
P04191	SERCA	*Oryctolagus cuniculus*	P2A
Q00804	PMCA	*Oryctolagus cuniculus*	P2B
A7L9Z8	SPCA	*Mus musculus*	P2A
P9WPS9	CtpF	*Mycobacterium tuberculosis*	P2A
P63688	CtpF	*Mycobacterium bovis*	P2A
A0A2Z5Y9V3	CtpF	*Mycobacterium marinum*	P2A
A0QZ77	Pma1	*Mycobacterium smegmatis*	P2A
O59868	Pmr1	*Schizosaccharomyces pombe*	P2A
P96271	CtpH	*Mycobacterium tuberculosis*	P2A
P9WPS5	CtpI	*Mycobacterium tuberculosis*	P2A
P9WPT1	CtpE	*Mycobacterium tuberculosis*	P2C
A0R3Y2	CtpE	*Mycobacterium smegmatis*	P2C

Dentro de este grupo se incluyó a las ATPasa SERCA por su relación cercana con CtpF; a la ATPasa PMCA por su similitud con SERCA, excepto en que posee un único sitio de unión; también se incluyó la ATPasa SPCA pues es similar a SERCA, pero presenta la característica de ser capaz de transportar iones Mn^{2+} además de iones Ca^{2+} (68). Como representante de SPCA en organismos unicelulares se seleccionó a Pmr1, y como representantes de CtpF en micobacterias patogénicas se seleccionaron a CtpF de *M. marinum* y *M. bovis*. Finalmente, se incluyeron las otras dos Ca^{2+} ATPasas similares a

SERCA de *Mtb*, CtpH y CtpI, junto con CtpE tanto de *Mtb* y *Msm*, recientemente asociadas con el transporte de Ca^{2+} (123).

Como primer paso, en este alineamiento se compararon los motivos característicos TGES (motivo de defosforilación) y DKTGT (motivo de fosforilación que contiene al residuo clave de ácido aspártico D), como se observa en la **Figura 5-1**, además de los motivos de unión a nucleótido (KGA) y de bisagra (GDGXND), que se presentan en el alineamiento completo (anexo A).

Figura 5-1. Alineamiento múltiple de 12 ATPasas tipo P2 construido con MUSCLE (128) y visualizado en Jalview (126). Se utiliza una escala de colores azules para presentar el grado de conservación de los residuos en todas las secuencias. Se compararon el (A) motivo de defosforilación, TGES, y (B) el motivo de fosforilación DKTGTLT.



La figura 5-1 permite observar que los aminoácidos TGE del motivo de desfosforilación están conservados en todas las secuencias y el aminoácido S está bien conservado (67%), siendo distinto sólo en las ATPasas SPCA (V o N) y en las ATPasas CtpE (A). Por su parte, el motivo de fosforilación DKTGT es conservado en todas las secuencias, incluyendo incluso los dos aminoácidos siguientes (LT), con la única excepción de CtpH, para la cual T es reemplazada con S, un aminoácido de polaridad muy similar. Esta figura también permite observar la alta conservación que presentan otros dominios comunes a las ATPasas como el PAD, perteneciente al loop menor, y el dominio PEGL, característico de las ATPasas tipo P2. Una vez confirmada esta similitud entre diferentes miembros de la clase P2, se decidió construir un árbol filogenético que permitiera estimar la posible relación evolutiva que existe entre estas secuencias.

5.1.2 Árbol filogenético

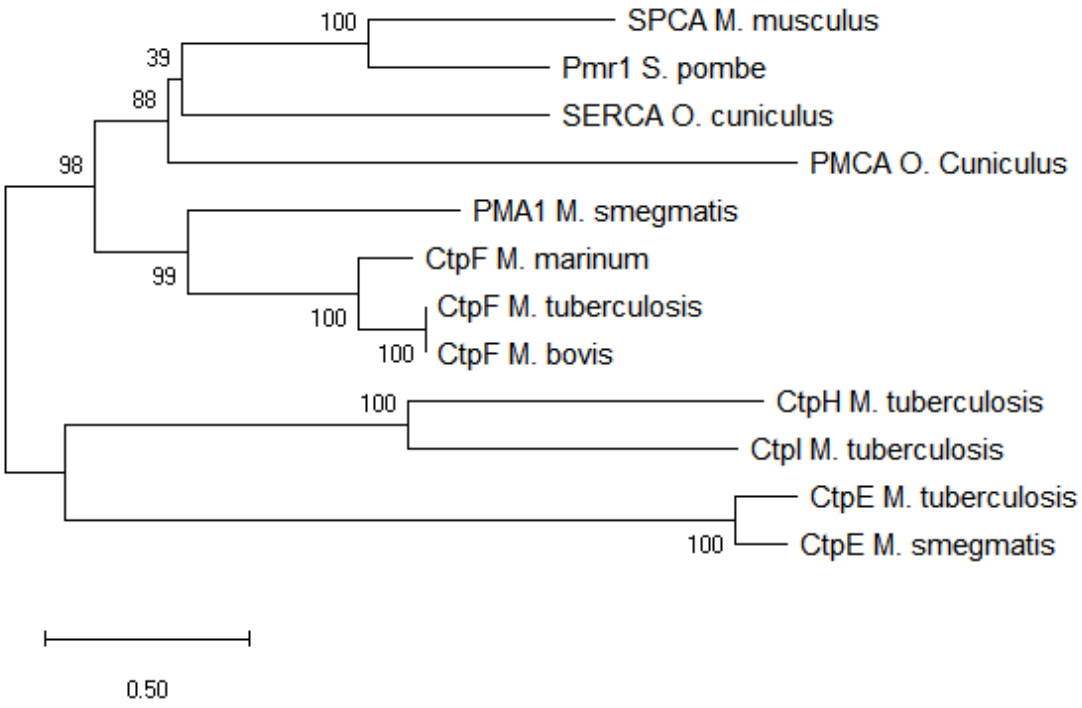
Las similitudes de las secuencias analizadas permiten asegurar que existe una relación entre ellas y suele asumirse que las diferencias encontradas son consecuencia de la divergencia evolutiva a partir de una ATPasa común a ellas. Un árbol filogenético permite analizar el alineamiento múltiple y extraer de él información evolutiva de las secuencias.

Con el fin de obtener resultados con una sólida base estadística, se decidió reconstruir el árbol filogenético desde el alineamiento usando una estimación de máxima verosimilitud que brindara valores a los parámetros para el mejor modelo de proteína, obtenido utilizando el software MEGA 10 (127), de tal manera que ellos maximizaran la probabilidad de que se obtuvieran las secuencias analizadas bajo dicho modelo. Este modelo fue seleccionado utilizando el criterio de información Bayesiano (Bayesian information criterion, BIC) más bajo y resultó ser un modelo tipo Whelan and Goldman (WAG) (129) con una distribución tipo Gamma (+G) discreta y la característica de considerar ciertos residuos de aminoácidos como invariables (+I).

El árbol fue entonces construido a partir del alineamiento preparado con MUSCLE (**Figura 5-1**, anexo A) por medio del software MEGA 10 usando el modelo WAG+G+I, con 100 replicaciones Bootstrap que permitieron estimar el peso de cada rama del árbol. La **Figura 5-2** presenta la salida del programa.

Figura 5-2. Árbol filogenético obtenido a partir del alineamiento múltiple de 12 ATPasas P2 seleccionadas construido bajo una estimación de máxima verosimilitud y un modelo

tipo Whelan and Goldman. Los valores Bootstrap evidencian el número de veces que cada una de las ramas apareció durante las 100 reconstrucciones del árbol. La longitud de las ramas se mide en número de sustituciones por sitio.



Este resultado evidencia que existe una relación evolutiva cercana entre las ATPasas CtpF seleccionadas, mientras que las ATPasas CtpE, CtpH y CtpI pertenecen a una subclasificación considerablemente distinta. Las proteínas CtpF de las bacterias patogénicas *Mtb* y *M. bovis* son virtualmente idénticas, y la de *M. marinum* es cercana a ellas, mientras que la CtpF de *M. smegmatis* está un poco alejada evolutivamente, pero hace parte de la rama originada a raíz del evento de diferenciación que separó a las Ca^{2+}-ATPasas SERCA, PMCA y SPCA de éstas.

Por otra parte, previo a ese evento de diferenciación se dio la aparición de la rama que dio origen a CtpH, CtpI y las CtpE de *Mtb* y *Msm*. Esto indica que estas ATPasas no pueden ser clasificadas como Ca^{2+}-ATPasas convencionales, como ya ha sido descrito previamente (139), y que este subconjunto de ATPasas podría tener algún tipo de función no redundante, frente a la función de CtpF, que ha favorecido su permanencia en el genoma de *Mtb*. De manera interesante, las CtpE de *Mtb* y *Msm* poseen una alta identidad y recientemente se ha asociado su función con el transporte de Ca^{2+} (123), lo cual ratifica que aun cuando su secuencia no es muy similar a las de las Ca^{2+}-ATPasas canónicas de

la clase P2 su función parece estar relacionada con la homeostasis de este ion. Por su parte, CtpH y CtpI parecen compartir un ancestro común y su característica más notable es una larga sección en el extremo N-terminal, de función desconocida unida a una mitad C-terminal que exhibe características propias de una Ca^{2+}-ATPasa. En ese sentido, existe evidencia experimental que ha permitido asociar CtpH con el transporte de Ca^{2+} (124).

Un aspecto para resaltar de este árbol filogenético es la región en la que se diferencian las ATPasas SERCA, SPCA y PMCA. El método Bootstrap permite realizar inferencias a cerca de la incertidumbre asociada a cada rama del árbol: un valor cercano a 100 permite afirmar que la rama no es resultado de un dato atípico, mientras que valores menores no pueden ofrecer la misma seguridad. Como puede observarse, mientras la distinción entre la aparición de PMCA y SERCA/SPCA posee un valor de 88, la diferenciación entre SERCA y SPCA es de apenas 38. Esto puede ser una consecuencia de que la muestra utilizada no representa de manera adecuada a la población de SERCAs y SPCAs y por tanto esta rama debe tomarse como una sola en este análisis. No obstante, estas ATPasas están relacionadas e incluso existen reportes de literatura en los que SERCA puede transportar Mn^{2+}, uno de los sustratos de las bombas SPCA (140).

En conclusión, este resultado permite sugerir que Pma1 es más cercana a CtpF que a las otras posibles Ca^{2+}-ATPasas de *Mtb*, lo que podría indicar que su función es comparable a tal ATPasa en *Msm* y que se comportaría de manera similar bajo las mismas condiciones experimentales, como lo planteado en la estrategia experimental del presente trabajo.

5.1.3 Sitios de unión a calcio

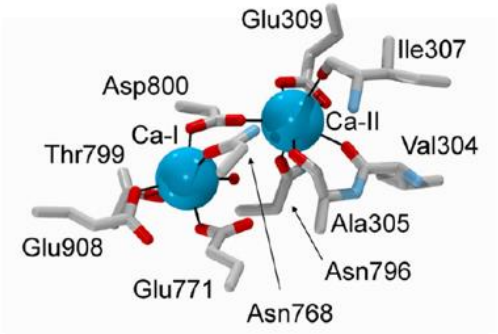
Con el fin de profundizar un poco más en la comparación de CtpF y Pma1, respecto a las Ca^{2+}-ATPasas del grupo P2 seleccionadas, se decidió analizar la conservación de los residuos involucrados en la coordinación del calcio de SERCA (80), que posee dos sitios de unión a Ca^{2+} en los que están involucrados 10 aminoácidos. La **Figura 5-3** presenta los residuos coordinando dos cationes, identificados a partir de las coordenadas atómicas de un cristal de la proteína en el estado unido a Ca^{2+}/ATP (E1).

Al observar la manera en que cada uno de los residuos que participan en la coordinación de los iones Ca^{2+} se observa que mientras unos interactúan con ellos a través de grupos electronegativos ubicados en su cadena lateral (Glu309, Glu771, Asp800, Glu908, Asn768 y Asn796), otros lo hacen a través del carbonilo del esqueleto de la proteína (Val304,

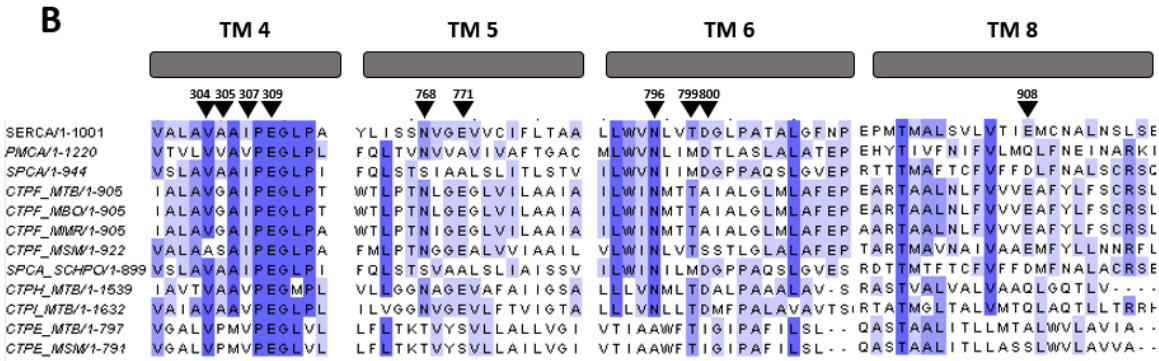
Ala305, Ile307). En este sentido, la sustitución de residuos que no interactúan a través de su cadena lateral con los cationes por residuos de polaridad y tamaño similar no deberían tener un impacto grande sobre la conformación del sitio de unión (141, 142). Por otra parte, la sustitución de los residuos ácidos o básicos por otros de polaridad invertida o apolares podría tener consecuencias sobre el sitio de unión y en últimas sobre la afinidad y la estequiometría de transporte de la ATPasa, como ya ha sido reportado (106).

Figura 5-3. Comparación de los residuos involucrados en la coordinación de los iones Ca^{2+} en las ATPasas P2 seleccionadas. (A) Aminoácidos pertenecientes a los dos sitios de unión a calcio del transportador SERCA. Los residuos Asn768, Glu771, Thr799, y Glu908 conforman el denominado sitio I, ubicado más cerca a la cara citoplasmática que el sitio II, conformado a su vez por Val304, Ala305, Ile307, Glu309 y Asn796. El residuo Asp800 participa en la coordinación de los dos cationes. Tomado de (80). (B). Alineamiento múltiple de las 12 ATPasas tipo P2 seleccionadas en el que se demarcan los dominios transmembranales TM4, TM5, TM6 y TM8, los que contienen los residuos involucrados en la unión a calcio (flechas negras, la numeración corresponde a SERCA), basado en el alineamiento preparado por Faxén y colaboradores (106).

A



B



En el alineamiento se puede observar que tanto CtpF como Pma1 comparten varios de los residuos de los sitios de unión con SERCA. Pma1 posee una alanina en lugar de Val304 y una serina en lugar de Ala305, sin embargo, esta diferencia no debería tener un impacto tan notorio sobre el sitio de unión pues dichos aminoácidos interactúan a través del grupo

carbonilo y no de la cadena lateral. Asimismo, posee una serina en lugar de Asp800, lo cual, si bien podría causar un efecto distinto frente a cambios de pH, pues el grupo hidroxilo de Ser no tiene un valor de pKa relevante en comparación a la cadena lateral ácida del aspartato, mantiene orientado un grupo aceptor de electrones hacia el catión. Este fenómeno de sustitución también ha sido descrito para CtpF, en la que el residuo de aspartato es sustituido por una Ala, pero a través de simulaciones basadas en dinámica molecular se ha logrado determinar que el lugar es ocupado por el grupo hidroxilo de una molécula de agua (124).

Respecto a CtpH y CtpI se puede apreciar que conservan casi por completo todos los residuos de SERCA. En lugar de Ile307 poseen un residuo de Val, lo cual representa una modificación mínima si se considera que las cadenas laterales de estos aminoácidos sólo difieren en un grupo metilo ($-CH_3$). Por otra parte, el Glu908 es reemplazado por un residuo de glutamina en estos transportadores. Este reemplazo no debería tener mayor efecto en el sitio de unión I, ya que ambos residuos poseen una cadena lateral del mismo tamaño (longitud en átomos de carbono) y como se observa en el caso de Asn796 y Asn768, la interacción con el catión se da por medio del grupo carbonilo. En cuanto a las bombas CtpE es difícil realizar una comparación de los sitios sustituidos respecto a SERCA pues presentan modificaciones radicales como Asn796 por un residuo de alanina o Asp800 por un residuo de isoleucina. Recientemente se ha reportado que CtpE tiene un papel en la homeostasis de calcio (123), no obstante, es difícil predecir el tipo de interacciones que existirían entre los residuos modificados y los cationes.

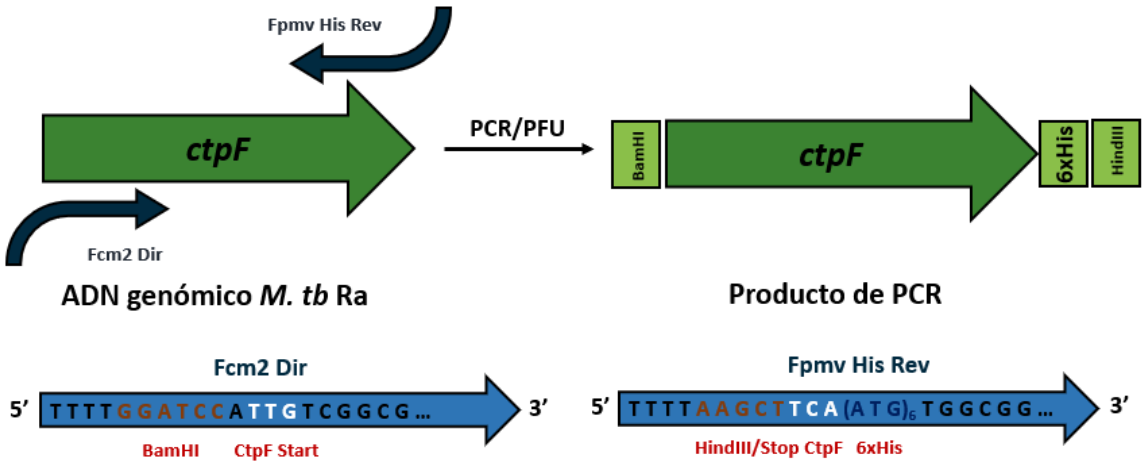
Distintas aproximaciones bioinformáticas ejecutadas en trabajos previos han permitido caracterizar ciertos aspectos estructurales de CtpF (124) y Pma1 (132) como su estructura terciaria, su topología en la región transmembranal o su posible número de sitios de unión, además de experimentos cinéticos que han dado luces sobre su afinidad por el calcio y otros metales alcalinotérreos y experimentos de sensibilidad a altas concentraciones de los cationes para evaluar su efecto sobre la resistencia de las micobacterias a dichas condiciones. Esos resultados, en conjunto con este análisis *in silico* permiten predecir que Pma1 se comportaría de una manera similar a CtpF bajo las mismas condiciones experimentales y que su función *in vitro* podría llegar a ser equivalente. En ese sentido, se decidió realizar una caracterización inicial de CtpF en la cepa silvestre de *M. smegmatis* para luego de optimizar la metodología experimental, comparar a Pma1 con CtpF en la cepa mutante de *M. smegmatis* en el gen que codifica a esta ATPasa (*MSMEG_3926*).

5.2 Expresión heteróloga de CtpF en *Mycobacterium smegmatis*

5.2.1 Clonación de *ctpF* en el vector pGEMT-Easy

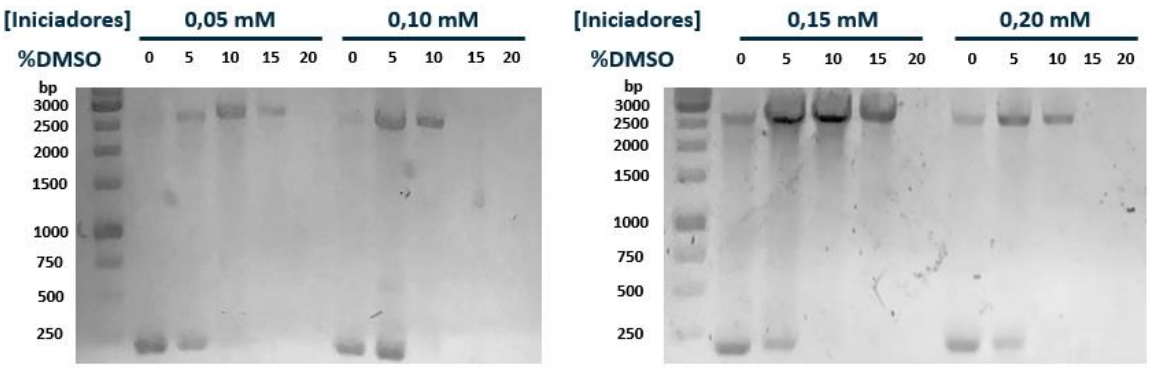
El gen *ctpF* (Rv1997) fue amplificado a partir de DNA genómico de *Mtb* Ra utilizando los iniciadores Fcm2 Dir y FpmvHis Rev, de acuerdo con el esquema experimental presentado en la **Figura 5-4**.

Figura 5-4. Esquema de amplificación del gen *ctpF* desde DNA genómico de *Mtb* Ra, con detalle del diseño de los iniciadores para contemplar la inclusión de sitios de corte con enzimas de restricción y una etiqueta de 6 histidinas.



El alto contenido de CG del genoma de *Mtb* Ra favorece la formación de estructuras secundarias, lo que dificulta en cierta medida el proceso de amplificación. Por este motivo se decidió incluir DMSO, un agente que inhibe la formación de tal tipo de estructuras, a pesar de que su uso tiene un efecto negativo sobre la actividad de las polimerasas (143). En este sentido, se decidió optimizar la concentración de DMSO e iniciadores de tal manera que se generara el menor impacto posible sobre la cantidad de fragmento generado y se evitara a su vez la formación de dímeros de iniciadores, los cuales afectan el rendimiento de la reacción. Como se observa en la **Figura 5-5**, las mejores condiciones se logran al utilizar una concentración final de DMSO e iniciadores del 10% y 0,15 mM, respectivamente.

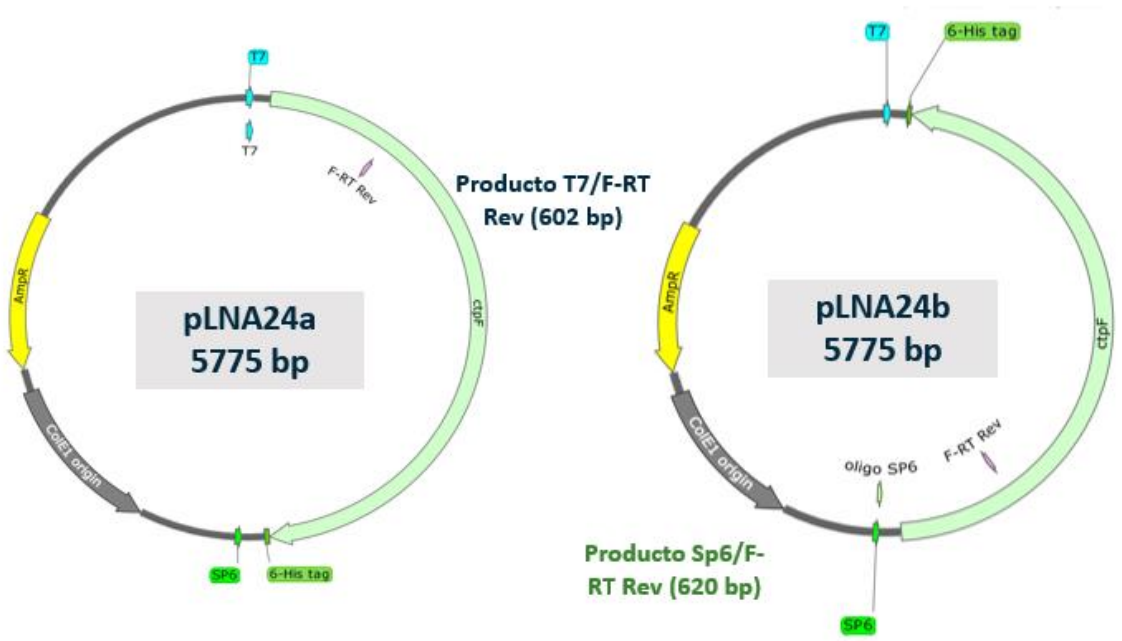
Figura 5-5. Optimización de la concentración de iniciadores y DMSO para la amplificación del gen *ctpF* desde DNA genómico de *M. tuberculosis* Ra.



El producto de 2757 bp fue cortado desde el gel y purificado. El diseño de los iniciadores incorporó además de los sitios de restricción y la etiqueta de histidinas, colas de timina (T) con el fin de dar soporte a las enzimas de restricción durante el corte. Sin embargo, las cantidades de producto obtenidas a través de esta estrategia no fueron lo suficientemente grandes como para permitir su ligación directa en el vector de expresión de micobacterias. Por este motivo se decidió llevar a cabo la sub-clonación del fragmento en el vector pGEMT-Easy, un vector de extremos romos, pero con timinas (T) en cada uno de ellos que mejoran la eficiencia de las reacciones de ligación (144). Dado que para la amplificación se usó la enzima de alta fidelidad Pfu, que posee una actividad de corrección tipo 3’->5’ exonucleasa, el fragmento purificado no posee extremo 3’ con adición de adenina (A). Por lo tanto, se decidió preparar una reacción de adición de adenina (145), utilizando la enzima Taq polimerasa convencional en presencia de dATP. El producto de esta reacción fue purificado y usado en la ligación. Cabe resaltar que la enzima Taq sólo se usa para la adición de la adenina extra en 3’, el producto amplificado no sufre ninguna modificación pues esta reacción se lleva a cabo en ausencia de iniciadores.

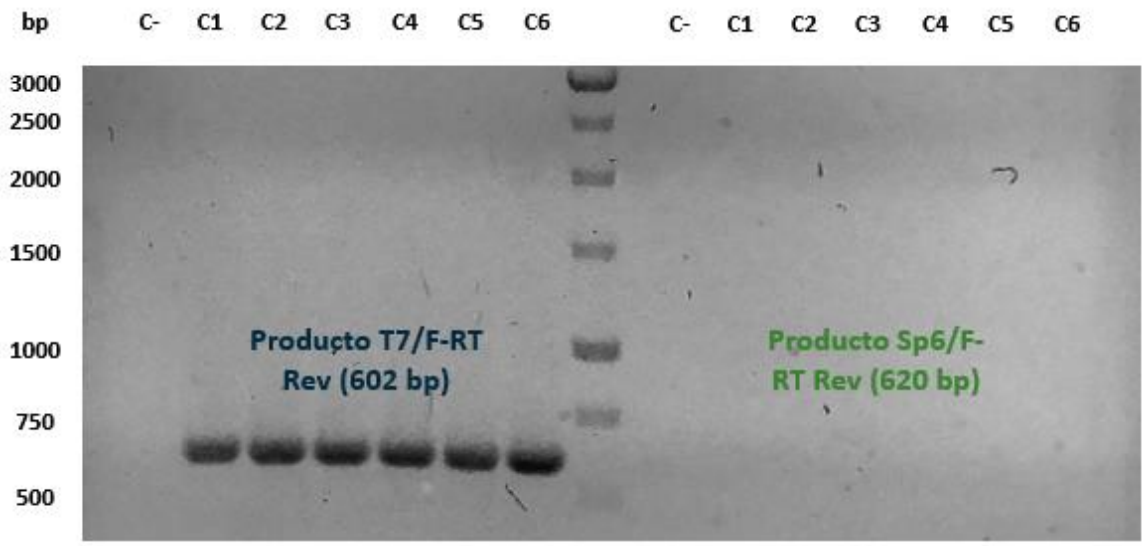
Al considerar que tanto el fragmento como el vector poseen un tamaño similar se pensó en utilizar relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:3 (vector: inserto), excluyendo relaciones en las que se usara más vector para reducir la probabilidad de eventos de re-circularización del vector vacío (146). Esta estrategia de clonación da lugar a dos productos de ligación, un vector en el que el gen es insertado en la dirección contraria al gen de ampicilina de pGEMT-Easy, denominado en este caso pLNA24a, y un producto en el que el gen está orientado en la misma dirección, denominado pLNA24b (**Figura 5-6**).

Figura 5-6. Mapa de los dos posibles productos de ligación en pGEMT-Easy del fragmento de extremos romos de *ctpF*.



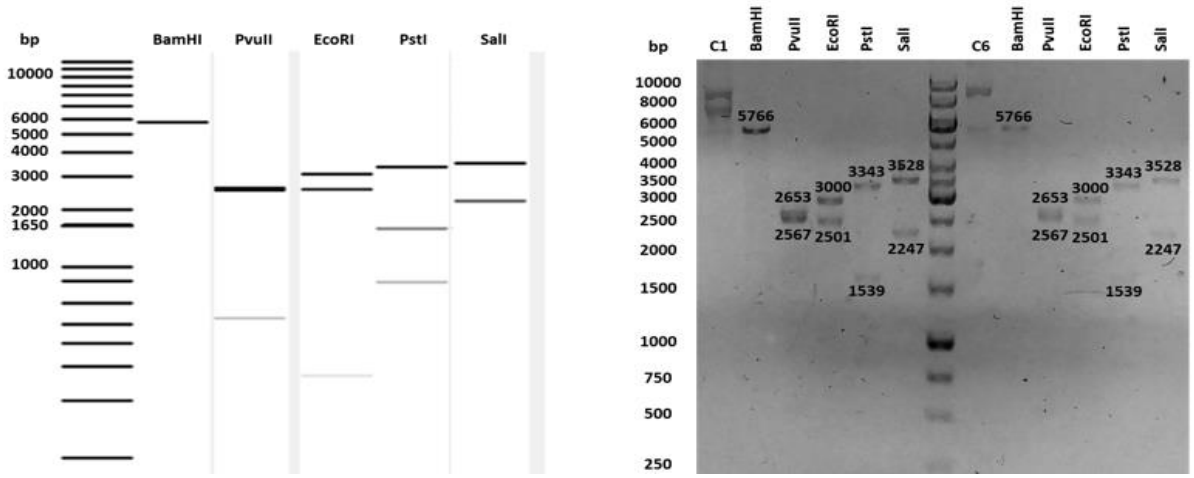
Los productos de ligación fueron precipitados con etanol absoluto y resuspendidos en el volumen necesario para transformar por electroporación células electrocompetentes de *E. coli* DH5α, pues se ha observado que una mayor concentración de DNA da lugar a un mayor número de eventos de transformación positivos. Dado que el vector posee sitios de reconocimiento para la enzima RNA polimerasa en marco con una secuencia que codifica el α-péptido de la enzima β-galactosidasa, obstruida cuando se da la inserción del fragmento de interés, las colonias cultivadas sobre placas LB-Amp y suplementadas con X-Gal fueron seleccionadas de acuerdo con su color: las colonias blancas se consideran recombinantes. Las colonias positivas fueron cultivadas en medio LB líquido y se sometieron a un proceso de extracción de plásmido para comprobación mediante PCR. Para corroborar la obtención del recombinante se ensayaron dos juegos de iniciadores, según las combinaciones propuestas en la Figura 5-3. Como puede observarse, los dos vectores se pueden diferenciar según el producto obtenido, que difiere en 22 pb. La **Figura 5-7** presenta los resultados obtenidos al llevar a cabo una PCR de comprobación con los juegos de iniciadores indicados, haciendo uso del DNA extraído de las colonias como molde.

Figura 5-7. Comprobación de colonias positivas seleccionadas tras la transformación con los productos de la ligación de *ctpF* en pGEMT-Easy. Las colonias fueron obtenidas a partir de la relación 1:3, única para la que se obtuvieron colonias blancas.



Se observa que para las colonias seleccionadas sólo se obtuvo el producto de ligación denominado pLNA24a, lo que indica que estas no estaban mezcladas y cada una corresponde a una única unidad formadora de colonia. Este DNA plasmídico también fue ensayado usando algunas enzimas de restricción para comparar el patrón de corte obtenido con una predicción *in silico* del mismo. Los resultados de este mapeo se presentan en la **Figura 5-8**. Tanto el plásmido de la colonia 1 (C1) como el de la colonia 6 (C6) dieron lugar a un patrón idéntico al predicho en el programa ApE. Como control se utilizó el plásmido recombinante sin cortar, lo que permitió observar bandas que corresponden a los topoisómeros, seguidos por un carril en el que se sembró el plásmido cortado en un solo sitio con la enzima *Bam*HI. Este carril da evidencia tanto de que se obtiene una banda en el tamaño esperado al sumar los pesos del inserto y el vector vacío como también de la inserción del único sitio de restricción *Bam*HI, añadido a la secuencia del gen por medio del iniciador directo Fcm2Dir.

Figura 5-8. Mapeo con enzimas de restricción del plásmido pLNA24a obtenido de las colonias 1 y 6, comparado con una predicción *in silico* construida en el programa ApE.



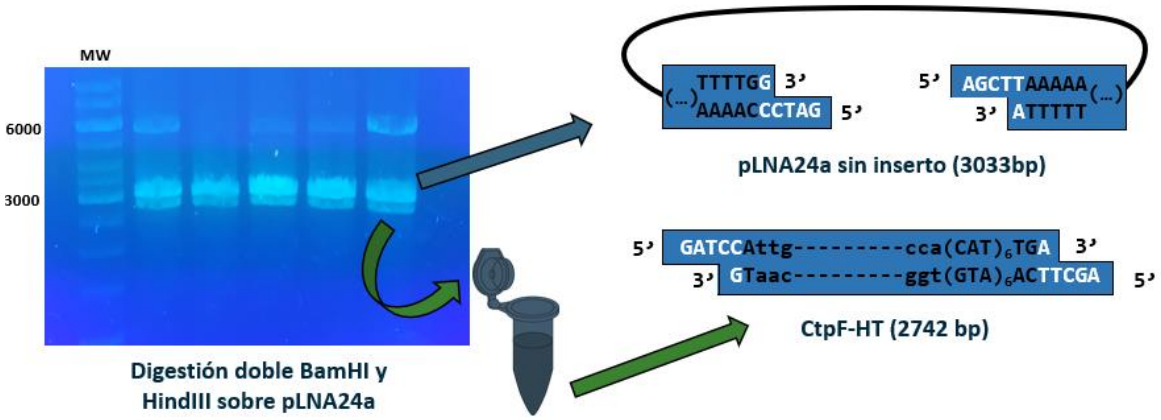
5.2.2 Clonación de *ctpF* en el vector de expresión de micobacterias pMV261

Una vez verificada la obtención del plásmido pLNA24a se continuó con la construcción del recombinante usando como esqueleto el vector de expresión en micobacterias pMV261. Para ello, se liberó el fragmento del gen *ctpF* utilizando las enzimas de restricción *Bam*HI y *Hind*III, cuyo sitio de restricción fue añadido durante la etapa de amplificación. El vector pMV261 fue también a su vez digerido con estas enzimas y defosforilado para disminuir la probabilidad de re-circularización. La **Figura 5-9** esquematiza la obtención del fragmento que fue purificado desde un gel de agarosa al 2% y cuantificado para ser usado posteriormente en la reacción de ligación.

Dado que se esperaba que el fragmento liberado desde pLNA24a fuera de 2724 bp, la banda cortada fue la inferior pues la superior debería corresponder al esqueleto de pGEMT-Easy, con un tamaño de 3033 bp. El plásmido pMV261 digerido y defosforilado fue purificado también desde bandas de gel de agarosa al 2%. Las reacciones de ligación fueron ensayadas en relaciones molares 1:1, 1:2 y 1:3 (vector: inserto) y nuevamente fueron precipitadas con etanol absoluto con el fin de ser concentradas y aumentar así la probabilidad de obtener colonias positivas durante la transformación. La transformación se realizó en células electrocompetentes de *E. coli* Top10 y tras ser recuperadas en medio LB sin antibiótico para ser luego sembradas en placas LB suplementadas con kanamicina,

que es el marcador de resistencia del vector pMV261, sólo se obtuvo colonias en el caso del cultivo proveniente de la reacción 1:1.

Figura 5-9. Esquema de la purificación desde un gel de agarosa al 2% del fragmento que contiene al gen *ctpF*, obtenido tras la digestión de pLNA24 con *Bam*HI y *Hind*III.



Las colonias positivas fueron ensayadas a través de una PCR con la pareja de iniciadores pMVComp Up (pMV261) /F-RT-Rev (*ctpF*), buscando obtener un producto de 655 bp que condujera a afirmar que fue el recombinante pLNA29 y no vector recircularizado lo que permitió a dichas colonias crecer en el medio con antibiótico. La **Figura 5-10** presenta el resultado de esta reacción de comprobación sobre cuatro colonias seleccionadas, introduciendo como control positivo al producto de ligación 1:1. Las colonias C1 y C2, que resultaron positivas al hacer esta comprobación, fueron cultivadas en medio líquido con el fin de realizar la extracción del recombinante. El recombinante extraído de cada colonia fue nuevamente ensayado por medio de una PCR utilizando la pareja de iniciadores ya descrita y adicionalmente fue digerido con enzimas de restricción seleccionadas con el propósito de comparar el patrón obtenido con uno construido por medio del programa ApE. La **Figura 5-11** presenta el resultado de este mapeo de restricción para los recombinantes de la C1 y la C2. En los geles de agarosa utilizados para visualizar los productos de reacción se incluyó como control tanto a los recombinantes como al vector pMV261 sin cortar (circular). Se observa que a pesar de que estos no migran como una banda en el tamaño calculado de acuerdo con su secuencia, pues pueden adoptar distintas conformaciones superenrolladas, los cortes que se generan utilizando la enzima *Bsp*HI en cada uno dan lugar a bandas cuya suma total si corresponde a este valor. De manera interesante, el corte con esta enzima también permite confirmar la inserción de *ctpF* pues

se observa una tercera banda debida a un sitio de corte presente en su secuencia. Finalmente, la integridad de la secuencia fue corroborada por secuenciación (Anexo D).

Figura 5-10. Mapa del recombinante pLNA29 donde se señala la región de anillamiento de los iniciadores pMVComp Up y F-RT-Rev y el resultado de la PCR de comprobación sobre las colonias seleccionadas. Se observa que sólo las colonias C1 y C2 presentan una amplificación del producto esperado, de manera similar al control positivo.

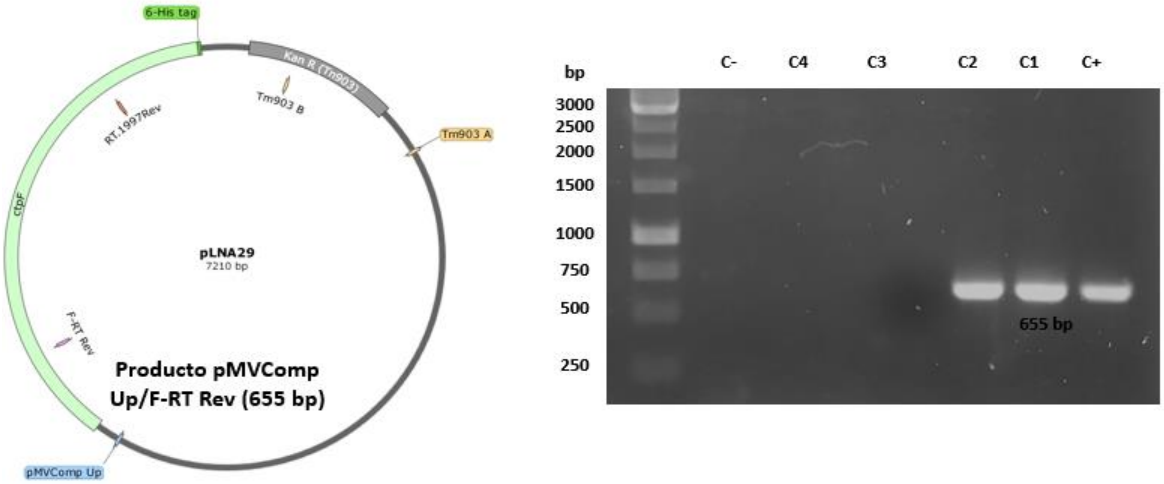
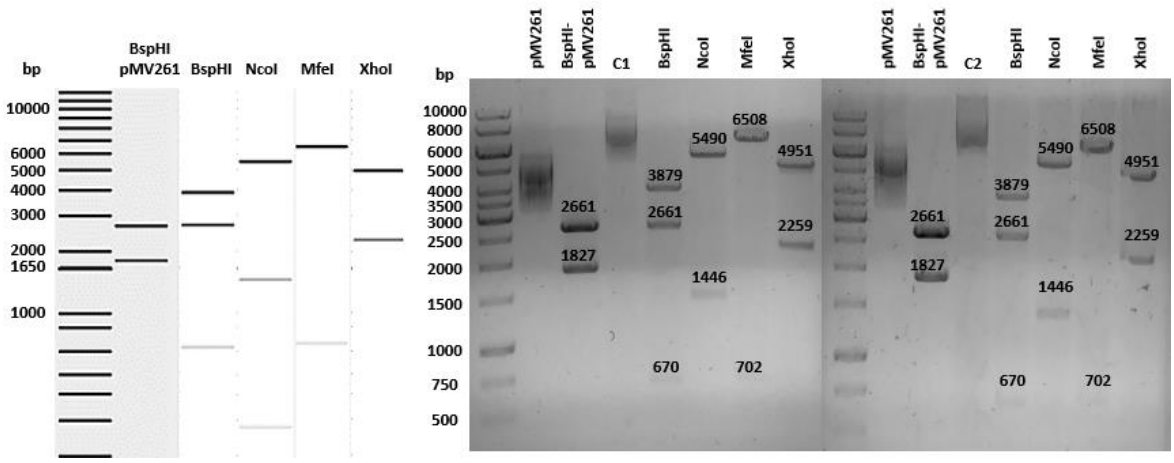


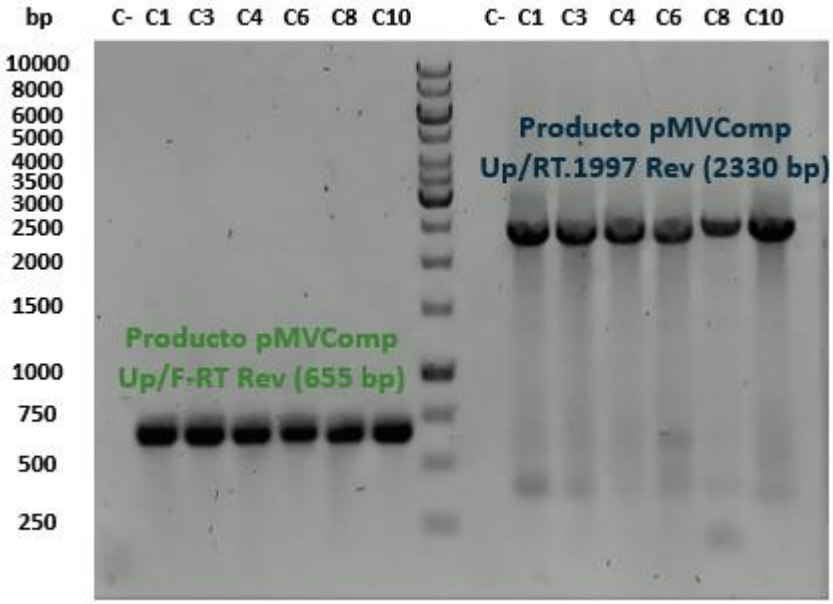
Figura 5-11. Mapeo de restricción del recombinante pLNA29 extraído de las colonias 1 y 2, comparado con el obtenido utilizando el programa ApE.



5.2.3 Transformación de *M. smegmatis* mc^{2}155 wt y Δ3926

Tras haber verificado la obtención del recombinante pLNA29 se procedió a transformarlo en células de *M. smegmatis* mc^{2}155 tipo silvestre y del mutante de *pma1* (MSMEG_3926), homólogo de *ctpF*. Tras la transformación por electroporación de células electrocompetentes de la cepa silvestre, se seleccionaron seis colonias que crecieron en LB suplementado con kanamicina y fueron ensayadas a través de PCR utilizando dos parejas de iniciadores: pMVComp Up / F-RT Rev (producto 655 bp) y pMVComp UP / RT.1997 Rev (producto 2330 bp). La **Figura 5-12** resume los resultados obtenidos para esta amplificación.

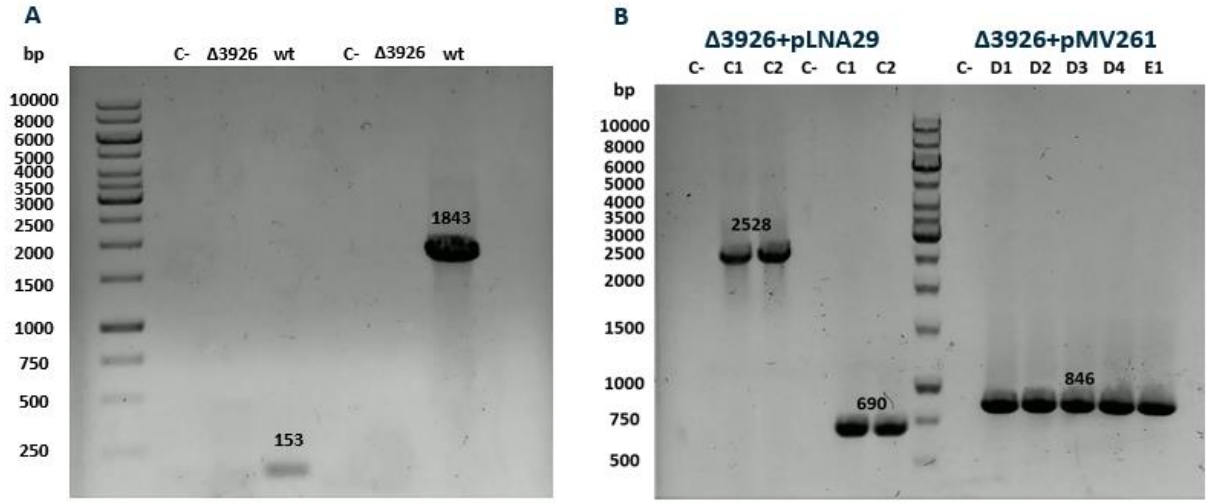
Figura 5-12. Comprobación de la transformación con el recombinante pLNA29 de colonias seleccionadas de *M. smegmatis* mc^{2}155 wt utilizando dos parejas de iniciadores.



Las seis colonias contenían el recombinante pLNA29. Posteriormente, se continuó con la transformación de la cepa mutante Δ3926. Como paso inicial se decidió realizar una comprobación del genotipo mutante, realizando una PCR con iniciadores dirigidos al gen *pma1* sobre DNA genómico extraído de la cepa. Como control de la amplificación se empleó DNA genómico de *M. smegmatis* mc^{2}155 wt. Se emplearon los iniciadores Pma1-RT-Dir2 / Pma1-RT-Rev1 (153 bp) y Pma1-RT-Dir2/Pma1-RT-Rev1 (1843 bp). Una vez realizada esta verificación se prepararon células electrocompetentes y se transformaron tanto con el recombinante como con el vector pMV261 vacío, con el fin de preparar un

control para los experimentos de acumulación de calcio. La comprobación de pLNA29 se realizó con dos juegos de iniciadores, pMVComp Down/ F-RT-Dir (2528 bp) y pMVComp Down/ RT.1997 Dir (690 bp), mientras que la comprobación de pMV261 se realizó con iniciadores dirigidos al gen de resistencia a kanamicina, Tm903A/ Tm903B (846 bp). La **Figura 5-13** resume los resultados de estas comprobaciones y la verificación del genotipo mutante.

Figura 5-13. A. PCR de comprobación para verificar la ausencia del gen *pma1* en el genoma de la cepa Δ3926. B. PCR de comprobación para verificar la presencia del recombinante pLNA29 o el vector vacío pMV261 en colonias obtenidas a partir de la cepa mutante.

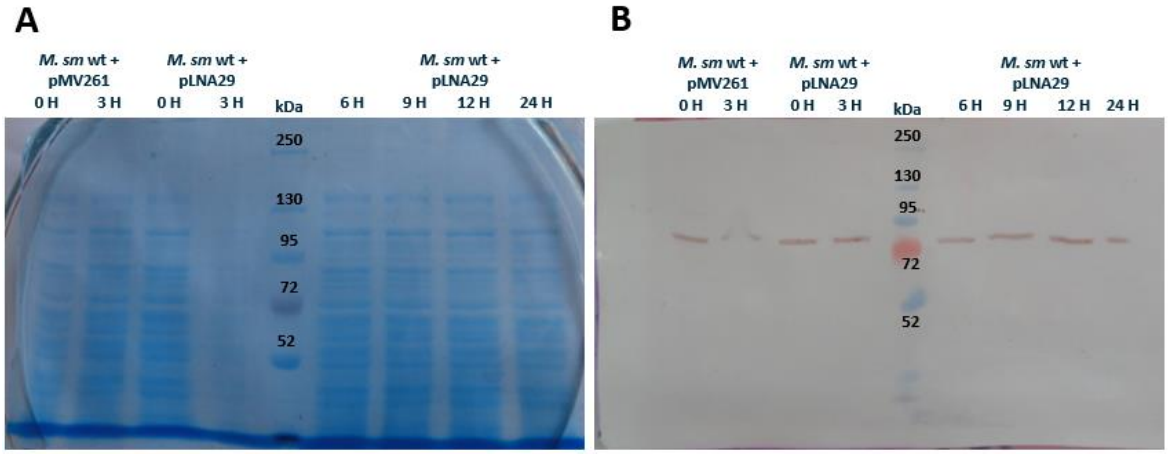


5.2.4 Expresión de CtpF desde el recombinante pLNA29 en *M. smegmatis*

Tras obtener el recombinante de CtpF en pMV261 y comprobar su correcta transformación en las cepas *M. smegmatis* wt y Δ3926, se procedió a expresar la proteína en este sistema, considerando que el gen fue insertado corriente abajo del promotor de choque térmico micobacteriano *Hsp60*. Inicialmente, se llevó a cabo un ensayo de inducción de la expresión a 45°C a diferentes tiempos y los cultivos celulares fueron procesados para obtener fracciones de proteínas que fueron analizadas por SDS-PAGE y Western Blot. En la **Figura 5-14**, no se observa un resultado satisfactorio para la sobreexpresión de CtpF,

toda vez que no fue posible detectar la proteína a la altura esperada (aproximadamente 100 kDa).

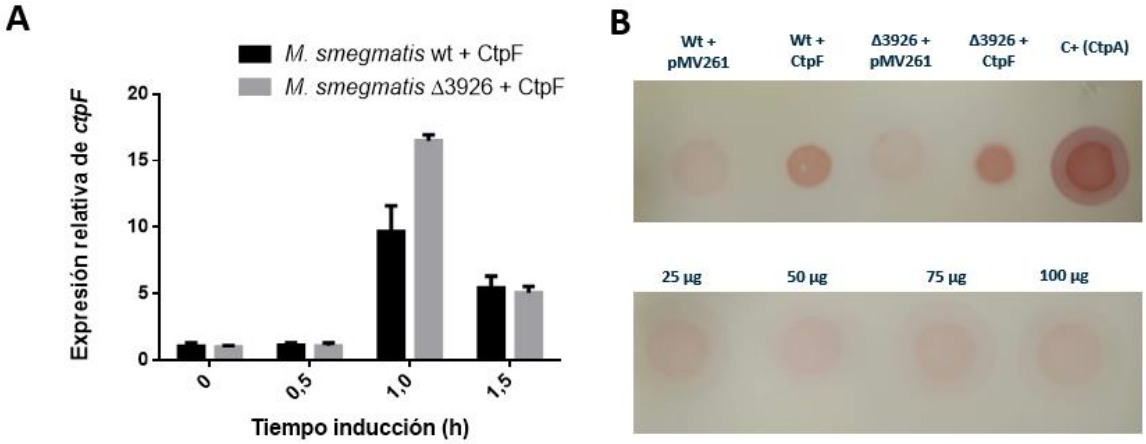
Figura 5-14. Expresión por choque térmico a 45°C de CtpF desde el recombinante pLNA29, analizado por SDS-PAGE (A) y Western-Blot (B).



Los resultados del ensayo de inmunodetección de CtpF, aunque muestran que el choque término fue capaz de promover la expresión de proteínas como la Hsp60 (*groEL2*), según lo evidencia el reconocimiento de su cola de histidinas (HGHGHHHGHAH) representado por una banda a una altura aproximada de 72 kDa asociada posiblemente a una de sus formas oligoméricas (147), no ha dado lugar a la formación de CtpF en niveles detectables, en las condiciones experimentales utilizadas para este ensayo.

Teniendo en cuenta este resultado, se supuso que la cantidad de proteína producida desde el vector de expresión no era lo suficientemente alta como para ser detectada utilizando esta estrategia. Se decidió entonces corroborar que se estaba generando el transcrito de RNA, lo cual se puede realizar mediante qPCR utilizando iniciadores dirigidos al gen *ctpF*, considerando que este gen no está presente en el genoma de *M. smegmatis*. De acuerdo con resultados previos de la literatura y de nuestro grupo de investigación (124, 132, 148), se llevó a cabo un protocolo de extracción de RNA y síntesis de cDNA, que luego fue empleado como molde para la detección de *ctpF.* Adicionalmente, se optó por realizar análisis de DotBlot con las vesículas de membrana preparadas para los ensayos de acumulación. La **Figura 5-15** resume los resultados obtenidos de estos experimentos.

Figura 5-15. A. Expresión relativa del gen *ctpF* desde el vector de expresión pLNA29 en *M. smegmatis* wt y *M. smegmatis* Δ3926 en función del tiempo de inducción por choque térmico a 45 °C, respecto a la expresión del gen *RNA 16S*. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un triplicado técnico. B. Arriba, DotBlot de vesículas de membrana (50 µg) de las cepas control y recombinantes, comparadas con 50 µg de un control positivo de CtpA recombinante marcada con una etiqueta de seis histidinas; abajo, DotBlot de vesículas de membrana control para verificar que la inespecificidad detectada no varía de manera proporcional a la concentración de proteína. El DotBlot se llevó a cabo usando un anticuerpo primario dirigido contra la etiqueta de histidinas (6x-His Epitope Tag Antibody Rabbit, Thermo Fisher Scientific) y un anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano (Goat anti-Rabbit IgG Fc, HRP conjugate, Thermo Fisher Scientific).



Esta gráfica permite concluir que el transcripto de CtpF es sintetizado de forma basal, previo a la inducción por choque térmico y que, tras el choque térmico, su máximo de transcripción se da alrededor de 1 hora. De manera interesante, la expresión relativa es unas 1,5 veces mayor en la cepa mutante que en la cepa silvestre en este máximo, lo que podría señalar que la presencia de Pma1 tiene un efecto represivo sobre la transcripción de CtpF, posiblemente debido a que enzimas llevan a cabo funciones similares o porque existe un límite para el número de monómeros de ATPasa que pueden ser ensamblados por unidad de área de la membrana. Si se compara el nivel de expresión de CtpF determinado en este trabajo con el nivel de expresión de Pma1, determinado en un trabajo previo de nuestro grupo de investigación (132), se observa que el nivel de expresión relativa de CtpF es aproximadamente un orden de magnitud menor que el de Pma1, su homólogo en *M. smegmatis*, pues en dicho trabajo se encontró que el gen *pma1* se transcribe unas 300 veces más que el gen *RNA 16S* bajo condiciones experimentales similares a las que se usaron para estudiar CtpF aquí. Esto da cuenta de que, en términos generales, CtpF no se expresa en la misma magnitud que Pma1 en el modelo

micobacteriano. Cuando se ha hecho uso de *E. coli* para la expresión heteróloga de estas dos proteínas (124), se observa que se obtienen buenos resultados para ambas, lo que soporta el hecho de que el vector pMV261 no es un sistema óptimo para la obtención de grandes cantidades de proteína.

Respecto a la detección de CtpF en las vesículas de membrana, la concentración de proteína de los extractos de *M. smegmatis* y el del control positivo, de *E. coli*, es comparable pues fueron cuantificados bajo las mismas condiciones usando dos métodos: Bradford y BCA. Se observa cómo 50 µg de un extracto de membrana *E. coli* enriquecido con CpA (Cu^+-ATPasa tipo P1B, (64)) posee mucha más proteína marcada que 50 µg de los extractos de *M. smegmatis*, lo que da cuenta de la baja eficiencia de este sistema de expresión; esto sumado al hecho de que mientras para la obtención del extracto de CpA se requirieron 500 mL de medio, los extractos de CtpF se obtuvieron a partir de 2,5 litros. Por otra parte, se observa que los extractos de *M. smegmatis* wt o mutante transformada sólo con el vector vacío, pMV261, presentan una respuesta débil debida a una detección inespecífica o *background*. Con el fin de desestimar la importancia de esta respuesta y descartar su influencia sobre la detección de CtpF, se sembraron cantidades en incrementos sucesivos de 25 µg de estos extractos, confirmando que tal respuesta no es dependiente de la concentración de proteína, por lo que es probable que se trate de una interacción inespecífica del anticuerpo con alguno de los componentes del extracto.

A pesar de que existen reportes en literatura que documentan el uso de pMV261 como vector de expresión para algunas proteínas de micobacterias (148, 149), los trabajos en los que este vector ha sido usado para expresar proteínas de membrana, específicamente ATPasas, han mostrado que su eficiencia no es comparable a otros modelos de expresión. Es posible que debido a la fortaleza del promotor, el cual da lugar a altos niveles de expresión en condiciones *in vitro* (150), este vector no sea apropiado para la expresión de proteínas de membrana, teniendo en cuenta que en muchos casos su expresión en grandes cantidades puede resultar tóxica para las bacterias (151). Aunque esto podría ser contraargumentado desde la perspectiva de los ensayos de expresión heteróloga que han sido exitosos en *E. coli*, hay que considerar que la fortaleza de los promotores utilizados en esos casos se puede regular de una manera más sencilla, variando por ejemplo la concentración de arabinosa en el caso del promotor *araBAD* (152) o la concentración de IPTG en el caso del promotor T7 (153).

Si se desea obtener cantidades significativas de proteína de membrana con fines de purificación o cristalización desde un modelo micobacteriano, el vector pMV261, basado en el promotor *Hsp60*, podría no ser la mejor elección en tanto que su fortaleza no es tan fácil de regular. Existen otros vectores de expresión basados en promotores mucho más fáciles de regular como aquellos que hacen uso del promotor de acetamidasa de *Msm* (154, 155), o el promotor T7 para el que incluso se ha desarrollado una cepa optimizada denominada *M. smegmatis* $mc^2$4517 (156, 157) y que recientemente utilizó para la caracterización y cristalización de una ATPasa tipo F_0F_1 (ATP-sintasa) (158). No obstante, todo esto no implica que el uso de pMV261 no sea recomendado cuando se desea realizar ensayos de actividad en los que la proteína de interés se encuentre embebida en la membrana, en un ambiente muy similar a las condiciones *in vivo*, pues estudios previos han demostrado que es posible trabajar con este tipo de extractos (64, 65, 159) a pesar de que su obtención requiera de cantidades considerables de medio de cultivo. El hecho de que pMV261 no permita la expresión de CtpF en cantidades significativas, no impide la obtención de vesículas de membrana micobacterianas en las que CtpF se encuentre embebida de manera activa. Como se verá en la sección 5.4 y 5.5, las vesículas sobre las cuales se detectó CtpF a través de DotBlot, obtenidas utilizando la expresión por choque térmico desde el vector pLNA29 bajo la condición seleccionada con base en el ensayo de RT-qPCR, fueron usadas exitosamente en los ensayos de acumulación de calcio. Este nivel de expresión es favorable pues al ser mayor que el basal, acentúa el efecto de la proteína y produce una diferencia medible, pero al ser bajo permite comparar su efecto con las condiciones normales en que se expresa desde el genoma de *Mtb*, además de que permite asumir que el modelo no es afectado de forma considerable y por tanto las diferencias encontradas son atribuibles a la función de CtpF y no a otros fenómenos que sean consecuencia de su expresión.

5.3 Efecto de CtpF sobre la acumulación de calcio en células completas de *Mycobacterium smegmatis*

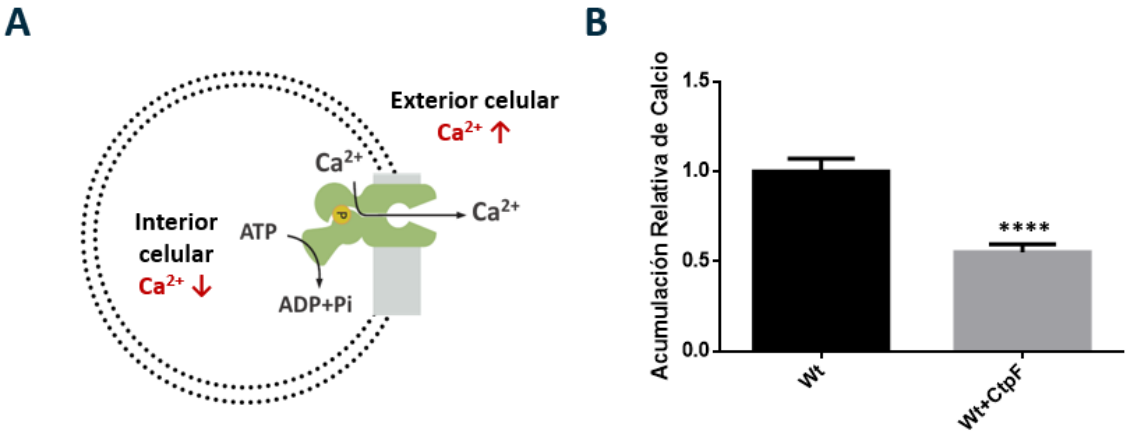
5.3.1 Acumulación de Ca^{2+}

Con el fin de evaluar si la expresión de CtpF desde el vector de expresión en micobacterias pMV261 previene la acumulación frente a un cambio abrupto en la concentración extracelular de Ca^{2+} en las células de *M. smegmatis*, estas fueron cultivadas hasta fase

exponencial en un medio mínimo para ser luego sometidas a la condición de estrés y luego ser lavadas, recolectadas y procesadas para medir su contenido de calcio total. La **Figura 5-16** presenta el modelo planteado y los resultados obtenidos.

De acuerdo con el modelo planteado en este trabajo, CtpF es una proteína Ca^{2+}-ATPasa involucrada en la homeostasis de calcio. Por esta razón, su sobreexpresión en células de *M. smegmatis* debería conferirle la capacidad de responder de mejor manera a cambios abruptos en la concentración extracelular de este cation. Durante este ensayo, la concentración extracelular aumentó varios ordenes de magnitud lo que implica la aparición de un gradiente de concentración que llevaría al ingreso del catión al citosol de la bacteria. Como respuesta a este cambio abrupto, se ha reportado que las bacterias poseen distintas estrategias para reestablecer la concentración citosólica e incluso que este tipo de aumento puede ser interpretado como una señal que desencadena varias respuestas intracelulares (89).

Figura 5-16. A. Modelo planteado para el funcionamiento de CtpF: La ATPasa se encarga de regular la concentración intracelular de calcio utilizando la energía del ATP para movilizarlo en contra de su gradiente de concentración. B. Acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación t student, P<0,05.



A pesar de que el ensayo es de punto final, la escala de tiempo considerada permitió observar que existe una diferencia estadísticamente significativa de la cantidad de calcio que es removida del citosol entre células transformadas con el vector pMV261 y aquellas transformadas con pLNA29. Si se asume que la expresión de CtpF no influye en la

velocidad a la que el calcio ingresa a la célula debido al gradiente de concentración, lo cual es razonable teniendo en cuenta que no se trata de una proteína con un poro hidrofílico sino que posee una compuerta que alterna entre estados abierto y cerrado dependientes tanto de la unión del catión en el segmento transmembranal desde la cara citoplasmática como del ATP en el dominio N, la diferencia detectada indicaría que CtpF está implicada en la remoción del calcio desde el interior de la bacteria.

Un aspecto importante del experimento es la metodología para la recolección de las células y específicamente el buffer de lavado empleado. Durante la optimización del protocolo, se empleó un buffer basado en glicerol, que llevó a resultados insatisfactorios en tanto que no se observaba una diferencia significativa entre ninguna de las cepas. Esto podría deberse a que en la preparación del buffer se excluye al calcio para evitar introducir error en las medidas y en, consecuencia, este abandona las células por difusión pasiva. La solución fue emplear un buffer con una osmolaridad similar a la que enfrentan las células en condiciones normales, lo cual llevó al protocolo que se usó para obtener resultados más satisfactorios. Esto demuestra que las diferencias observadas en los experimentos no son totalmente atribuibles al hecho de que ciertas estructuras de la envoltura celular de las micobacterias puedan quelar el cation, pues como se observó, la difusión simple tenía un gran impacto sobre los resultados de la cuantificación de calcio total. A pesar de que la cuantificación no diferencia entre el calcio contenido en el citosol del calcio quelado por lípidos y otros componentes estructurales, se observa que las diferencias estadísticamente significativas obedecen a cambios en la concentración de calcio disponible en el citosol, la que es susceptible al gradiente de concentración. Por otra parte, en la preparación del buffer se evitó el uso de ligantes con potencial de unión a calcio para regular el pH, con el fin de excluir el efecto de competencia entre el buffer y la envoltura celular por el catión. Esto asegura que, si se asume que las diferencias entre la envoltura celular de las cepas son mínimas, en tanto que los genes estudiados no han sido reportados como participantes de rutas biosintéticas relacionadas con la construcción de la pared, una parte del calcio utilizado en el experimento sea quelado por la envoltura celular de manera constante en los experimentos.

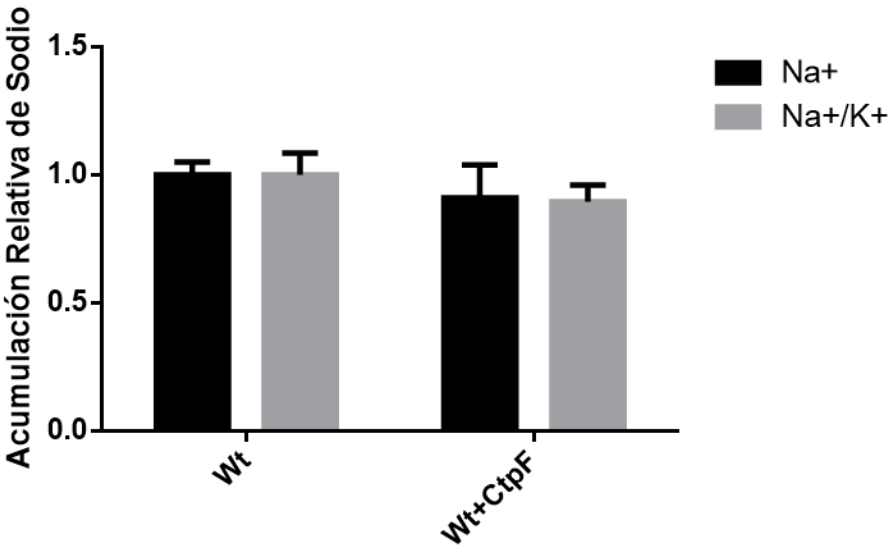
5.3.2 Acumulación de Na^+

Con el fin de soportar la evidencia obtenida que favorece la hipótesis de que CtpF está involucrada de manera específica en el eflujo de calcio desde el citoplasma

micobacteriano, se decidió realizar ensayos de acumulación con sodio, Na^+, otro de los posibles cationes transportados por esta enzima. Si CtpF además de estar involucrada en el eflujo de Ca^{2+} también es responsable por el eflujo de Na^+, se esperaría que, de manera similar a lo observado en los ensayos de acumulación de calcio, su expresión en la membrana de *M. smegmatis* tuviera algún efecto sobre la cantidad de sodio acumulado cuando las células se someten a un aumento abrupto de la concentración del cation en el medio extracelular. De igual manera, considerando los resultados obtenidos previamente en nuestro grupo de investigación (132), se decidió modificar el protocolo de acumulación de sodio para incluir potasio (K^+) pues la actividad sodio dependiente se estimula en presencia de dicho cation. La **Figura 5-17** presenta los resultados obtenidos de los ensayos de acumulación de sodio en ausencia y presencia de potasio.

De manera importante, no se observó una diferencia estadísticamente significativa entre la cantidad de sodio acumulada por la cepa recombinante respecto a la cepa control en ninguno de los dos escenarios. Esto evidencia que, frente a un cambio abrupto en la concentración de sodio en el medio extracelular, las células de *M. smegmatis* responden de manera similar sin importar que CtpF se haya expresado en la membrana plasmática.

Figura 5-17. Acumulación de sodio en ausencia y presencia de potasio en células completas de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias.



Las bacterias poseen distintos mecanismos de transporte de sodio que pueden responder al aumento de la concentración de este ion en el ambiente extracelular. Distintas proteínas de membrana se encargan de mantener un gradiente de concentración en el cual la concentración al interior de la célula es más baja que en el exterior. Si CtpF estuviese encargada del restablecimiento de la concentración de Na^+ tras un aumento abrupto en su concentración, se esperaría que las células recombinantes exhibieran un menor contenido de sodio comparadas con la cepa silvestre en un determinado instante de tiempo. Según estos resultados, CtpF no influye en la forma en que la célula se recupera del aumento abrupto en la concentración de sodio lo cual tiene sentido a la luz de la diversidad de sistemas de transporte pasivo que se apoyan en el sodio para llevar a cabo su función y que serían capaces normalizar el gradiente de concentración.

Por otra parte, considerando que CtpF es una Ca^{2+}-ATPasa y trabajando sobre la hipótesis de que estaría involucrada en el transporte de sodio, es coherente compararla con las Na^+/K^+-ATPasas de la clase P2. Por esta razón también se incluyó al potasio en los experimentos pues en este tipo de bombas la presencia de K^+, Na^+ y ATP es indispensable para que haya lugar a la actividad de transporte. Los resultados muestran que la inclusión de potasio en los experimentos no tuvo un impacto estadísticamente significativo sobre la acumulación de sodio y ratifican que la función de CtpF no es reestablecer los niveles de sodio luego de un aumento abrupto en su concentración. Esto es coherente si se considera que los sistemas de transporte pasivo o de transporte activo secundario poseen una mayor tasa de transporte que las ATPasas (48), por lo que su efecto sería más rápido que el de CtpF. A pesar de que el mismo argumento aplicaría para el calcio, los resultados sí muestran una diferencia estadísticamente significativa en ese caso, por lo que se puede apreciar que CtpF tiene un impacto sobre la tasa a la cual se expulsa el calcio de la célula para reestablecer su concentración.

5.4 Efecto de CtpF sobre la acumulación de calcio en vesículas de membrana de *Mycobacterium smegmatis*

Al observar que la expresión de CtpF evita la acumulación de calcio en células recombinantes, se decidió medir su efecto sobre la acumulación en un modelo de vesículas de membrana en el que se favorece una configuración invertida, de manera que la dirección de transporte del catión cambia, y es corroborada.

5.4.1 Acumulación de calcio en vesículas de membrana

La fracción de membrana obtenida a partir del extracto celular lisado de manera mecánica y separado por centrifugación diferencial se resuspendió en un buffer que favorece la formación de vesículas de membrana en conformación invertida (160, 161) al incorporar al detergente Brij-58, un polioxietilenacil éter cuya cabeza polar posee un tamaño tal que induce la apertura e inversión de vesículas de membrana de acuerdo con lo postulado en la hipótesis de acoplamiento de bicapas lipídicas (162). En su conformación natural, los dominios de fosforilación, actuador y de unión a nucleótido de CtpF se encuentran ubicados en el interior de la célula, expuestos en la cara citoplasmática de la membrana. En las vesículas invertidas, estos dominios estarían expuestos en el exterior de la vesícula, lo cual permitiría controlar el funcionamiento de la enzima por medio del consumo de ATP en el buffer de reacción.

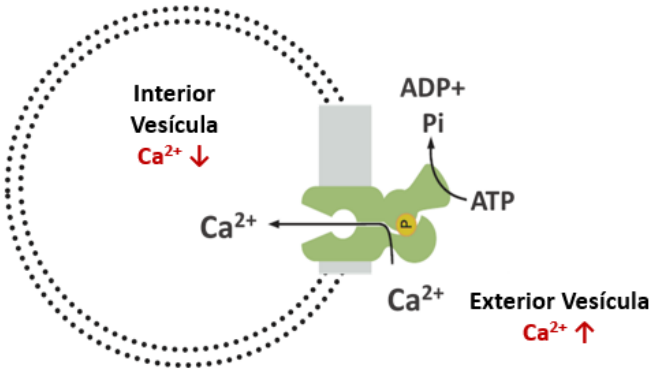
Con el fin de corroborar que las vesículas obtenidas preservaban a las proteínas CtpF en una conformación activa, se sometieron a un ensayo de actividad ATPasa en presencia de Ca^{2+}, de acuerdo con las condiciones optimizadas en estudios anteriores (124). Una vez se verificó que las vesículas de membrana presentaban actividad Ca^{2+}-ATPasa se llevó a cabo un ensayo de acumulación de calcio con el fin de corroborar tanto la dirección del transporte del cation como la diferencia de acumulación entre vesículas control y vesículas recombinantes. La **Figura 5-18** presenta el modelo de vesículas de membrana con configuración invertida y los resultados de actividad ATPasa y acumulación de calcio. Estos resultados muestran que las vesículas recombinantes presentan una actividad aproximadamente dos veces mayor que la actividad de las vesículas control, lo cual es coherente con el hecho de que la expresión de las proteínas recombinantes tiene un impacto sobre la actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas.

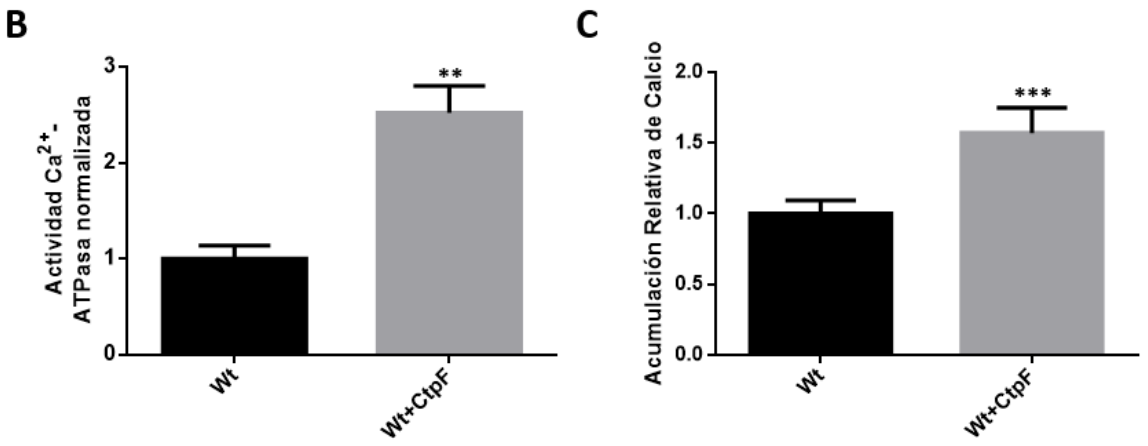
Los resultados muestran que las vesículas de membrana enriquecidas con CtpF presentan una acumulación de calcio mayor que las vesículas control, lo cual es coherente con el hecho de que CtpF transporta el Ca^{2+} desde el interior de la micobacteria hacia el exterior celular y que, por tanto, si su configuración se invierte, esta dirección de transporte cambiaría en el mismo sentido. En este punto sería posible argumentar que durante la reconstitución de las vesículas de membrana no se incluye al calcio dentro del buffer de re-suspensión por lo que el interior de la vesícula posee una baja concentración del ion respecto a la concentración en el exterior y, por ende, la acumulación de calcio está dada

por el transporte pasivo del ion hacia el interior de la vesícula. Este argumento es válido, sin embargo, se debe considerar tanto el ensayo de actividad Ca^{2+}-ATPasa, que sugiere que las vesículas de membrana hidrolizan ATP en presencia de Ca^{2+}, como el ensayo de acumulación relativa, que muestra que hay una mayor acumulación del cation en comparación con las vesículas control, es decir, a pesar de que puede que existan mecanismos que permiten la difusión de calcio hacia el interior de la vesícula, estos son comunes tanto a las vesículas control como a las vesículas recombinantes. La única diferencia radica en la presencia de CtpF, y por tanto se puede responsabilizar a esta por la acumulación y la actividad ATPasa adicional observada en las vesículas recombinantes.

Figura 5-18. A. Modelo planteado para la orientación de CtpF en las vesículas de membrana: Los dominios citoplasmáticos quedan expuestos hacia el exterior de la vesícula y, adicionalmente, se invierte la dirección de transporte del cation. B. Actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana utilizadas en el ensayo de acumulación. C. Acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis* transformadas con pLNA29, normalizada respecto a la acumulación de la cepa wt transformada con pMV261. En ambas gráficas, las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un duplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación t student, P<0,05.

A





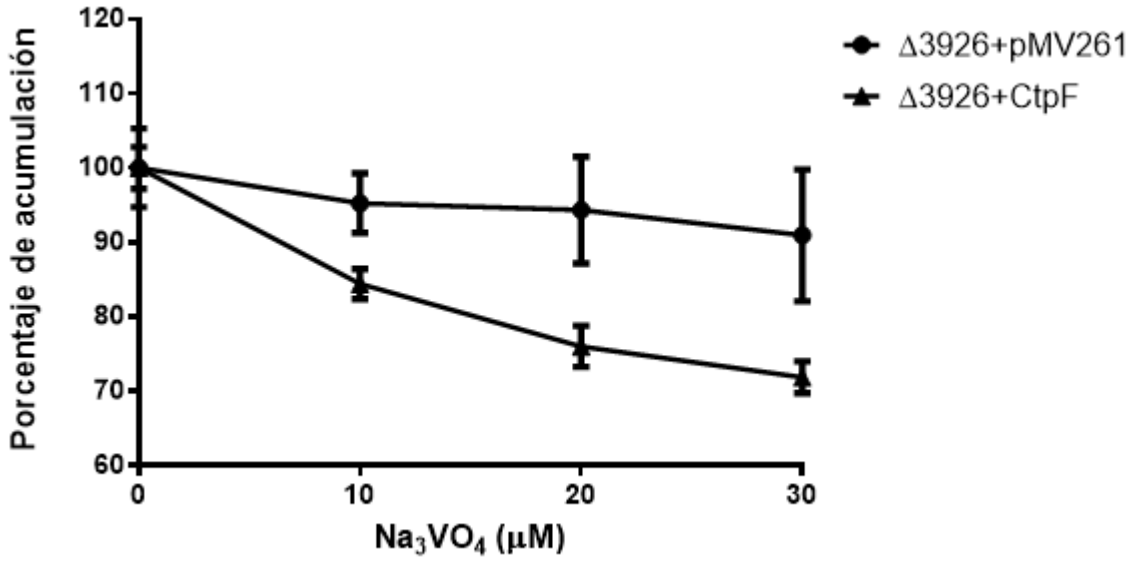
Es importante resaltar que el mecanismo de transporte de las Ca^{2+}-ATPasas requiere tanto de la presencia del cation como de ATP en el medio (80), por lo que el efecto de difusión no se daría a través de CtpF en ausencia de ATP. Esto se debe a que el cambio conformacional que termina por exponer los sitios de unión de Ca^{2+} hacia la otra cara de la membrana es inducido precisamente por la unión tanto del cation a ellos, como del ATP a su sitio en el domino N. Es justamente en ese principio que se basa la relación entre los ensayos de actividad ATPasa y los de acumulación de calcio. Un efecto de inhibición sobre la actividad ATPasa debe verse reflejado tanto en la cantidad de fosfato liberado producto de la hidrólisis del ATP como en la cantidad de calcio acumulado en el interior de las vesículas.

5.4.2 Sensibilidad a vanadato de sodio

Para soportar la hipótesis de que parte de la acumulación observada en las vesículas de membrana de *M. smegmatis* se debe a un transporte activo dependiente de Ca^{2+}, mediado por la ATPasa tipo P CtpF, se decidió llevar a cabo un ensayo en presencia del inhibidor prototípico de este tipo de bombas: el anión ortovanadato, VO_4^{3-} (163). En principio, el experimento fue planteado para ser llevado tanto en vesículas de membrana de *Msm* wt como en las vesículas de la cepa mutante. Sin embargo, al ejecutar los ensayos en la cepa silvestre no fue posible obtener resultados reproducibles. Es probable que esto se deba a la presencia de Pma1 en dicho modelo, en tanto que su actividad ATPasa podría interferir con la manera en que el calcio se acumula en la vesícula y que la cantidad de vanadato utilizada no fuera suficiente para inhibir todo el transporte debido a esta enzima. Cuando se aumentó la cantidad de vanadato para tratar de disminuir este efecto, la cantidad de

calcio acumulada no fue reproducible entre las réplicas técnicas del ensayo por lo que infortunadamente este problema experimental no pudo ser solucionado. Es necesario optimizar este experimento, aunque lo realmente ideal sería ejecutarlo en un sistema de proteoliposomas con proteína pura que facilite tanto el trabajo como el análisis de los resultados. De cierta forma el mutante está un paso más cerca de esa idealidad pues se remueve a Pma1, cuya función sería redundante en las condiciones del ensayo, y da una idea del rango de concentraciones de vanadato que podrían usarse, haciendo de este un experimento de tipo exploratorio. La **Figura 5-19** presenta los resultados de acumulación de calcio en presencia de diferentes concentraciones de vanadato de sodio.

Figura 5-19. Porcentaje de acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis* Δ3926 transformada con pMV261 o el recombinante de CtpF. Se definió como 100% la cantidad de calcio acumulada por las vesículas control (pMV261) en ausencia de vanadato de sodio y los demás valores fueron normalizados respecto a esta. Los puntos representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un triplicado técnico para cada valor de concentración de Na_3VO_4.



En este ensayo se comparó la acumulación de las vesículas de membrana en presencia de distintas concentraciones de vanadato de sodio respecto a la acumulación en ausencia de este inhibidor. Como puede observarse, mientras que el vanadato no tiene un efecto importante sobre las vesículas de membrana control, pues aun cuando los datos presentan una dispersión considerable la acumulación se ve inhibida máximo en un 10-15%, las vesículas enriquecidas con CtpF exhiben una disminución drástica de la acumulación de calcio en función de la concentración de vanadato, llegando a ser hasta un 25-30% menor

que en ausencia del inhibidor. De manera relevante, este es el mismo nivel de inhibición que se observa cuando en lugar de acumulación de calcio se determina actividad ATPasa basada en la medida de la liberación de fosfato producto de la hidrólisis del ATP (124), lo que permite reafirmar la relación cercana que existe entre los resultados de los ensayos de actividad y los de acumulación. Estos resultados corroboran la afirmación realizada previamente de que si bien un buen porcentaje de la acumulación de calcio en las vesículas enriquecidas es ocasionado por el gradiente de concentración y la difusión a través de transportadores pasivos (cerca del 75% para una concentración de Na_3VO_4 de 30 µM), CtpF actúa como un transportador ATP-dependiente y vanadato-sensible del catión, soportando así los resultados obtenidos en células completas y que llevan a postular a CtpF como una proteína de eflujo de calcio desde el interior de las micobacterias.

5.5 Comparación *in vitro* del efecto de Pma1 y CtpF sobre la acumulación de calcio en *M. smegmatis Δ3926*

A la luz de los resultados obtenidos tras analizar el efecto de la sobreexpresión de CtpF tanto en células completas como en vesículas de membrana y considerando la similitud que guarda esta enzima con su homólogo de *M. smegmatis*, Pma1, analizada a través de herramientas bioinformáticas (sección 5.1), se decidió llevar a cabo estos experimentos de acumulación con Pma1 para confirmar la predicción de que su función respecto al eflujo selectivo de calcio sería aproximadamente igual a la de CtpF bajo las mismas condiciones experimentales. Con el fin de facilitar el análisis de los resultados los experimentos se realizaron en la cepa mutante *M. smegmatis Δ3926*, para evitar una posible interferencia de Pma1, expresada desde el genoma de la micobacteria, sobre la acumulación de calcio.

5.5.1 Acumulación en células completas

El primer paso fue evaluar la acumulación de calcio y sodio en células completas del mutante, transformadas con los recombinantes pLNA29 y pCAT3. La **Figura 5-20** presenta los resultados de estos experimentos. De forma sorprendente, la acumulación de calcio en las células mutantes recombinantes (rotuladas como Δ3926+CtpF o Δ3926+Pma1) tuvo una diferencia estadísticamente significativa respecto a la acumulación en las células mutantes transformadas sólo con el vector vacío (rotulada Δ3926). Este resultado favorece la hipótesis de que Pma1 está involucrada en la homeostasis de calcio en *M. smegmatis*,

de manera homóloga a CtpF, al encargarse del eflujo del cation hacia el exterior celular en contra de su gradiente de concentración y que ambas proteínas son capaces de suplir esta función en las células mutantes.

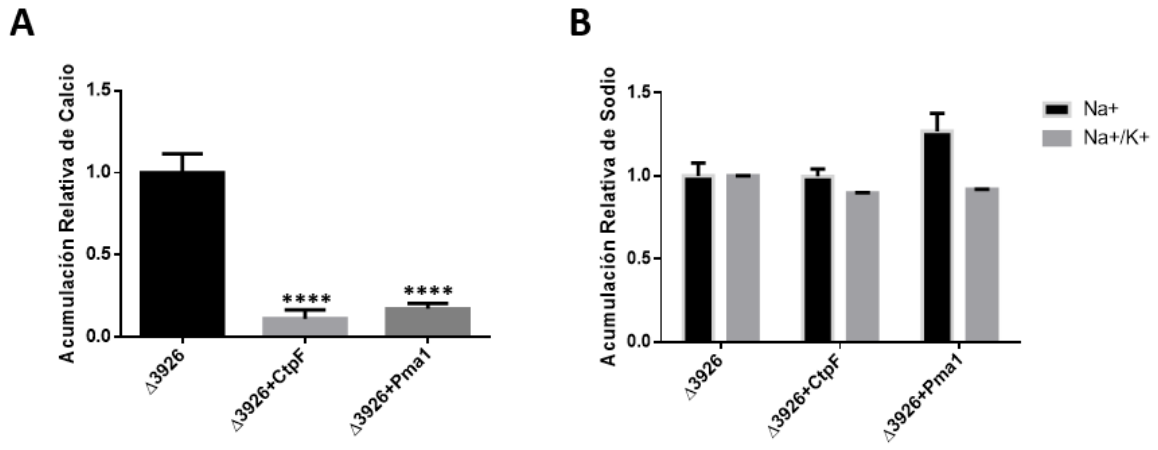
Si se compara la cantidad de calcio acumulada en las células mutantes respecto a la acumulada en las células de la cepa silvestre (Anexo C, Figura C-1), se observa que las células mutantes acumulan cerca de 3 veces más calcio que las células wt. Esto indica que la deleción de Pma1 tiene un impacto notorio sobre el eflujo de calcio, lo cual corrobora que Pma1 está involucrada en la homeostasis de este ion. Esta gráfica también permite observar que la transformación de la cepa mutante con los recombinantes ocasiona una acumulación menor que la cepa silvestre. Es importante notar que aunque en principio la transformación de las células mutantes con un vector que expresa Pma1 debería reestablecer el nivel de acumulación hasta el obtenido por la cepa silvestre, se debe considerar el hecho de que pMV261 no es un vector de única copia (131) por lo que en términos generales, se esperaría una mayor población de monómeros de Pma1 en la membrana plasmática de las células mutantes transformadas con el vector de expresión que en la membrana de la cepa silvestre, que posee una única copia del gen (como se indicó anteriormente la expresión desde este vector acentúa el efecto de la función de la proteína sin ser exageradamente alto, lo cual facilita el análisis de los resultados). De manera notable, si se atribuye la función de eflujo de Ca^{2+} a Pma1, se observa que el aumento en la acumulación en la cepa mutante es compensado por el recombinante pCAT3 más un excedente, que coincide de manera cercana con el excedente que otorga el recombinante pLNA29 tanto a la cepa silvestre como a la cepa mutante (aproximadamente 0,5 mg Ca^{2+} por mg de pellet). Este resultado soporta la hipótesis de que existe un tope para el número de monómeros de ATPasa que se incorporan a la membrana plasmática cuando son expresados de forma basal desde el vector pMV261 y que la membrana plasmática no puede acomodar un exceso de estos transportadores, lo cual justifica el hecho de que la expresión de CtpF sea mayor en la cepa mutante que en la cepa silvestre, como se observó anteriormente (sección 5.2.4).

Por otra parte, se observa que al igual que los experimentos llevados a cabo en la cepa silvestre, el efecto de CtpF sobre la acumulación de sodio es indetectable y que Pma1 se comporta de manera similar bajo las mismas condiciones experimentales. Si bien estos resultados contrastan un poco con estudios previos de estas proteínas (124, 132), en tanto que en ellos se observó que la actividad ATP-dependiente de estas enzimas era además

de calcio, estimulada por sodio y potasio, es probable que la diferencia se deba a que las propiedades *in vitro* de estos transportadores son considerablemente distintas a sus propiedades *in vivo*. Se ha demostrado que los modelos empleados para reproducir los microambientes membranales difícilmente son reproducibles y que las condiciones de aglomeración y estados alejados del equilibrio que se viven en el ambiente intracelular tienen consecuencias significativas sobre las propiedades de las macromoléculas (164). Por ende, no sería sorprendente que las determinaciones *in vitro*, realizadas en soluciones idealizadas (diluidas) arrojaran resultados diferentes a las determinaciones realizadas *in vivo*. Particularmente, los aminoácidos que hacen parte de los sitios de unión al catión metálico de las ATPasas tipo P2 son compartidos en buena medida por todas las ATPasas de la subclase (124, 139), por lo que es posible que las condiciones *in vitro* pudieran favorecer la interacción con otros cationes distintos al catión transportado *in vivo*. El valor agregado de estos experimentos de acumulación en células completas es que permiten contrastar la selectividad de la ATPasa estudiada con los resultados obtenidos a través de ensayos en que esta se separa de la mayoría de los componentes celulares y se resuspende en un medio distinto al medio intracelular. A pesar de todo esto, es importante resaltar que la afinidad por Ca^{2+} de CtpF y Pma1, determinada en dichos modelos experimentales, es mayor que su afinidad por Na^{+} o K^{+}, aun cuando es estimulada por ellos (124, 132).

Figura 5-20. A. Acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05. **B.** Acumulación de sodio en ausencia y presencia de potasio en células completas de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. No hay diferencia estadísticamente significativa entre las medias. Una comparación de la cantidad de calcio

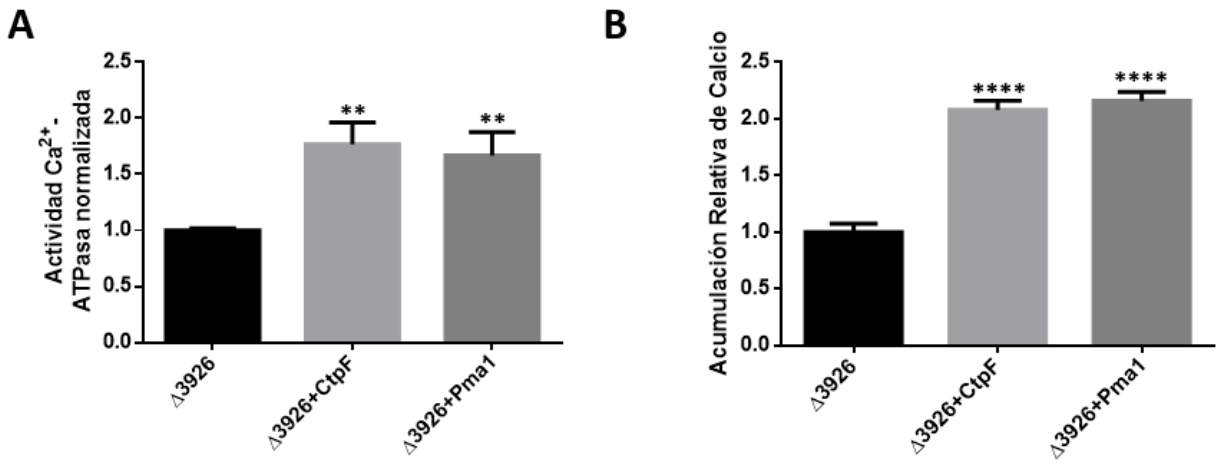
absoluta acumulada por cada cepa silvestre y mutante se presenta en la Figura C-1 (anexo C).



5.5.2 Acumulación en vesículas de membrana

Luego de verificar que Pma1 se comporta de manera similar a CtpF, respecto a la acumulación de calcio, sodio y potasio en células completas de *M. smegmatis Δ3926*, se decidió evaluar su efecto sobre la acumulación de calcio en vesículas de membrana. Al igual que en los experimentos realizados con vesículas de la cepa silvestre, se determinó la actividad ATPasa de estas vesículas, con el fin de validar su uso en el experimento de acumulación. La **Figura 5-21** presenta los resultados de actividad ATPasa y acumulación de calcio.

Figura 5-21. A. Actividad Ca^{2+}-ATPasa de las vesículas de membrana utilizadas en el ensayo de acumulación. **B.** Acumulación de calcio en vesículas de membrana de *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1), normalizada respecto a la acumulación de la cepa mutante transformada con pMV261. En ambas gráficas, las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un duplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05.



Estos resultados muestran que las vesículas de membrana que sobreexpresan CtpF y Pma1, obtenidas a partir de la cepa mutante, hidrolizan ATP de forma Ca^{2+}-dependiente. De manera interesante, si se compara la actividad ATPasa normalizada de estas vesículas, respecto al control, con la actividad de las vesículas que sobreexpresan CtpF provenientes de la cepa silvestre (**Figura 5-18**), se observa que la de las primeras es menor. Esto concuerda con el hecho de que, en la cepa silvestre, Pma1 debería estar presente en la membrana, por lo que además de la contribución de CtpF a la actividad ATPasa total, también se debe considerar el aporte de Pma1. Por otra parte, se observa que los niveles de actividad de las dos proteínas son muy cercanos. A pesar de que estos ensayos no permiten cuantificar la estequiometría de transporte de Ca^{2+}, como se ha hecho en otros estudios (106), pues el sistema de reconstitución proviene de un extracto de membrana y por tanto posee otras proteínas que podrían hidrolizar ATP, el hecho de que los niveles de actividad sean similares sí indica que la tasa a la cual se hidroliza el ATP es comparable y dado que esta actividad de hidrólisis es dependiente de la actividad de transporte del catión, se podría sugerir que las dos proteínas poseen la misma estequiometría. De acuerdo con el análisis bioinformático de las secuencias de estas enzimas (sección 5.1), la estequiometría sería 2 Ca^{2+} transportados por cada molécula de ATP hidrolizada; no obstante, el valor exacto tendría que ser determinado en un modelo de reconstitución preparado a partir de proteína pura.

Respecto a los resultados de acumulación, se observa que tanto Pma1 como CtpF favorecen la acumulación de aproximadamente dos veces más calcio del que acumulan las vesículas provenientes de la cepa mutante transformada únicamente con el vector

pMV261.Estos resultados son relevantes pues corroboran que ambas proteínas pueden funcionar como bombas de eflujo de Ca^{2+} desde el interior de las micobacterias, pues cuando se invierte su orientación también lo hace la dirección de transporte. También es importante el hecho de que los niveles de acumulación sean similares pues ratifica que su estequiometría de transporte es similar. Cabe resaltar que aun cuando los experimentos de actividad ATPasa y acumulación están relacionados, no existe una reacción de causalidad que determine los resultados a obtener. Si bien los niveles de actividad ATPasa de las dos enzimas puede ser similares, podría ocurrir, por ejemplo, que una de ellas transportara sólo 1 catión por molécula de ATP hidrolizada. Esto se vería reflejado en una menor acumulación de calcio en el experimento con las vesículas. Otro aspecto notable de estos dos ensayos es que los resultados son coherentes aun cuando las determinaciones se hacen por métodos considerablemente distintos; mientras la actividad ATPasa es calculada a partir de una cuantificación de fosfato, generado durante la hidrólisis de ATP, basada en la formación de un complejo coloreado, la acumulación de calcio se mide con base en la absorción atómica del metal.

6. Conclusiones y perspectivas

6.1 Conclusiones

Los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo permiten concluir que es posible lograr la expresión heteróloga de la proteína CtpF en el modelo *M. smegmatis*, por medio del vector lanzadera pMV261, en niveles adecuados para la determinación de características funcionales de la enzima en un sistema de vesículas de membrana, pero no con fines de purificación. La eficiencia del sistema de expresión es baja comparada con sistemas de expresión diseñados para *E. coli*.

Es posible concluir también que CtpF evita la acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis*, en comparación a las células no transformadas de la cepa silvestre. Esta actividad de transporte es selectiva para Ca^{2+} respecto a Na^{+} y Na^{+}/K^{+}, en tanto que un aumento abrupto de la concentración de estos iones no ocasiona una acumulación preferencial en alguno de los dos tipos de células. También se puede concluir que *M. smegmatis* es un modelo adecuado para el estudio de ATPasas tipo P de *M. tuberculosis*.

Asimismo, al reconstituir CtpF en un modelo de vesículas de membrana en que se favorece la orientación invertida de estas, es posible confirmar la dirección de transporte de Ca^{2+}, en tanto que las vesículas enriquecidas con la proteína acumulan más calcio que sus contrapartes provenientes de la cepa silvestre transformada sólo con pMV261. Esta actividad de transporte es sensible a ortovanadato de sodio (Na_3VO_4), inhibidor clásico de las ATPasas tipo P, con lo cual se ratifica que el catión ingresa a la vesícula a través de esta ATPasa, y representa cerca del 25% del total de la acumulación de calcio.

Finalmente, es posible concluir que Pma1 funciona de manera muy similar a CtpF bajo las condiciones experimentales ensayadas, lo cual confirma las predicciones bioinformáticas basadas en su homología. Adicionalmente, los resultados indican que poseen una

estequiometría de transporte muy similar; el valor exacto sólo puede ser determinado utilizando un modelo de reconstitución a partir de proteína purificada.

6.2 Perspectivas

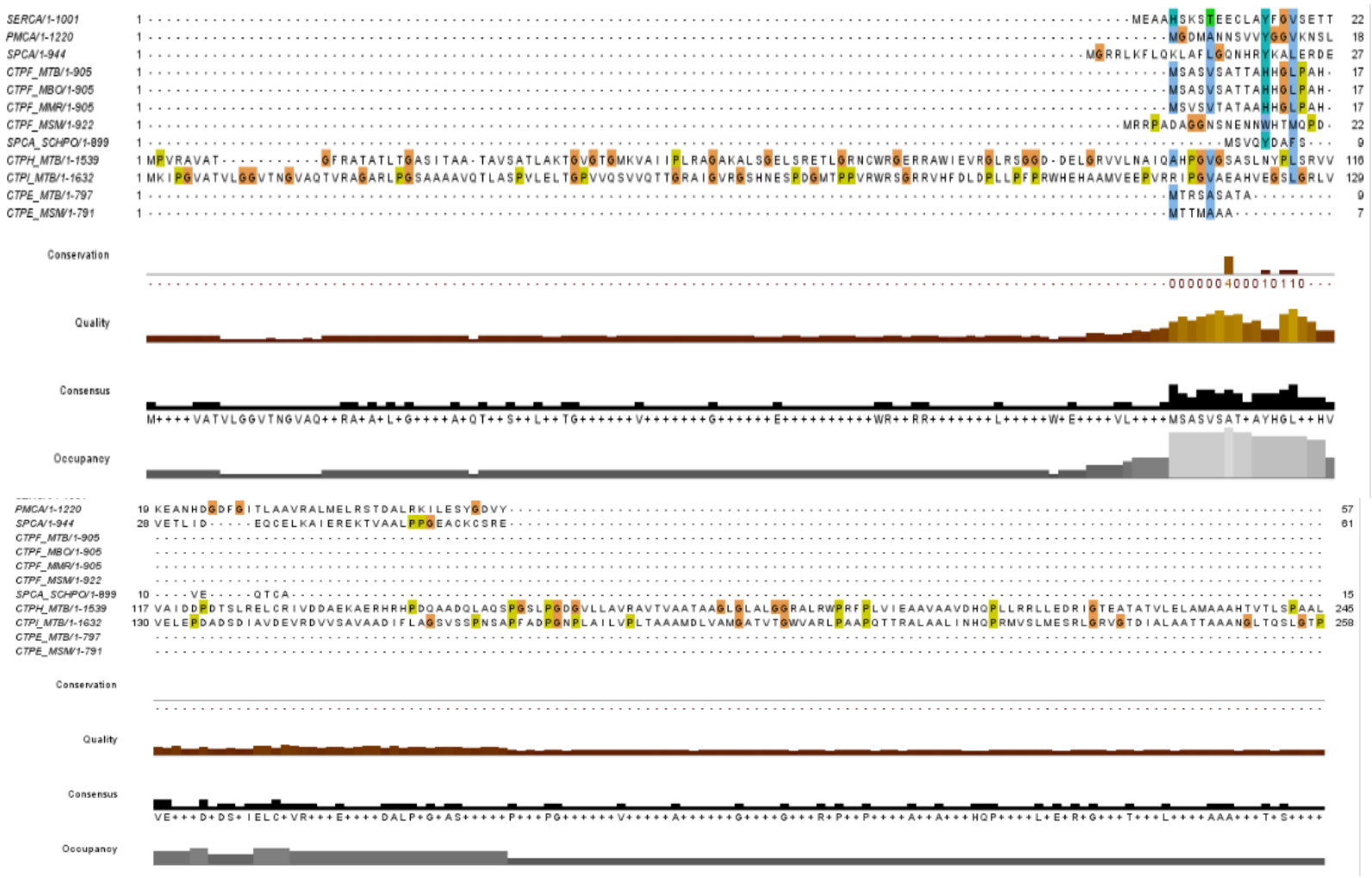
A corto plazo, se espera evaluar el efecto de la deleción del gen *ctpF* en *M. tuberculosis* sobre la acumulación de calcio en células completas, basándose en la metodología desarrollada durante este trabajo. Asimismo, se pretende evaluar si la complementación de esta cepa mutante con el recombinante pLNA29 es capaz de revertir el efecto de la mutación.

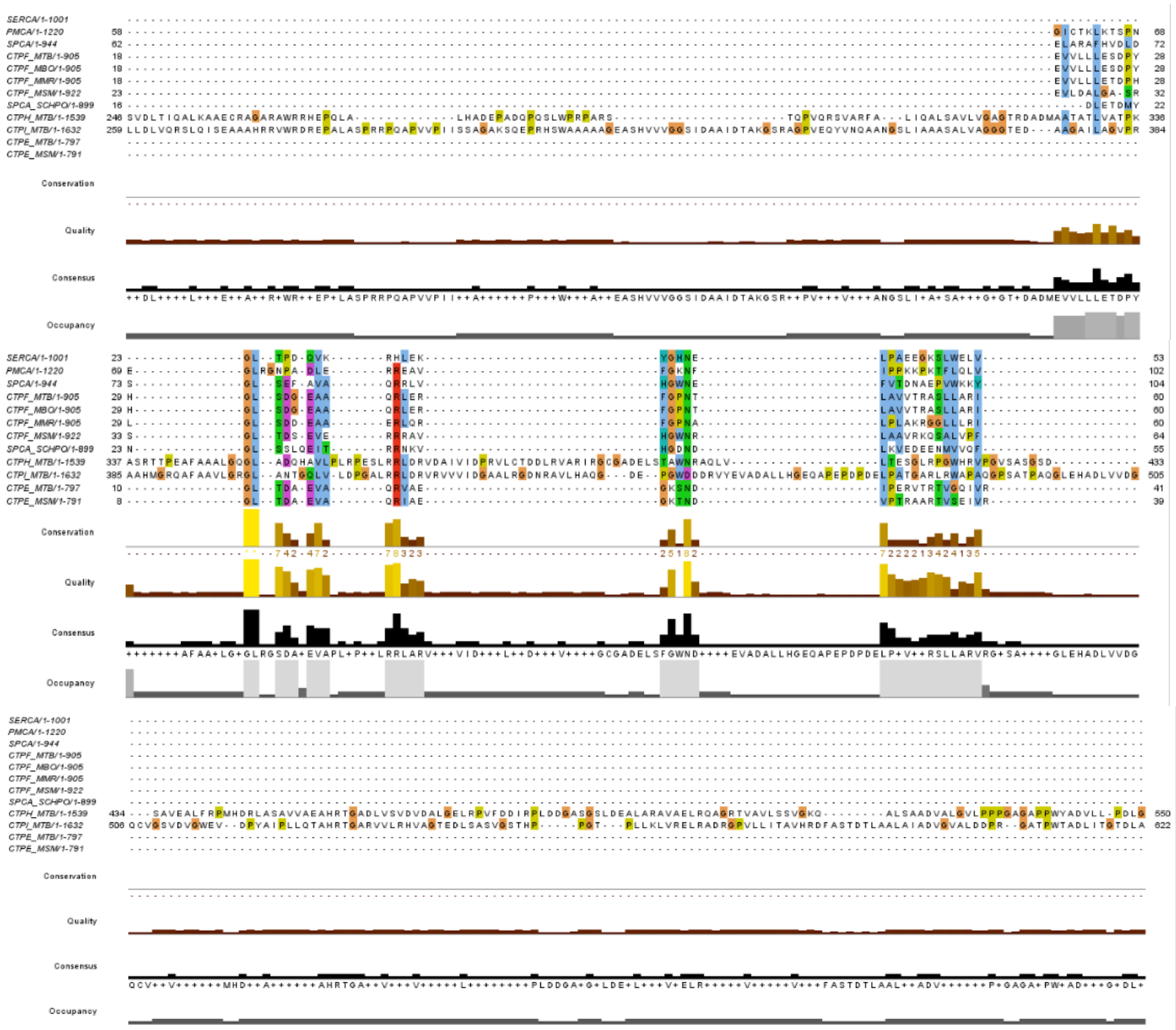
A mediano plazo, se planea evaluar el efecto de la deleción del gen *ctpF* sobre la resistencia de *M. tuberculosis* a diversas condiciones de estrés, incluidas las experimentadas durante la infección en macrófagos, y determinar si la complementación de la cepa mutante con pLNA29 recupera la función de CtpF.

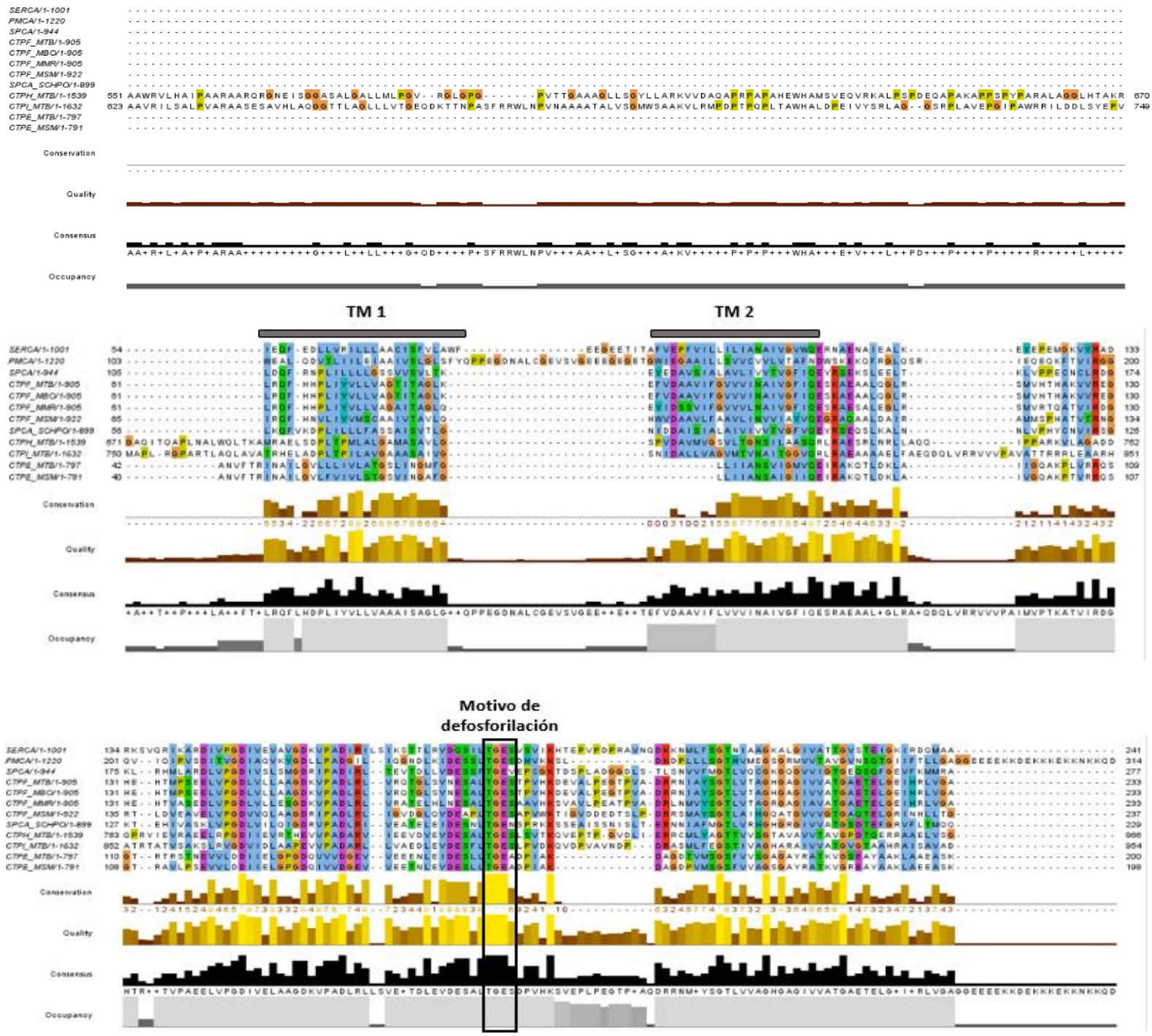
A largo plazo, se espera que los resultados obtenidos durante el desarrollo de este trabajo faciliten la caracterización de otras ATPasas tipo P2 y que el conocimiento adquirido sobre CtpF permita avanzar en el desarrollo de nuevos compuestos antituberculosos con el fin de mejorar el control sobre la enfermedad.

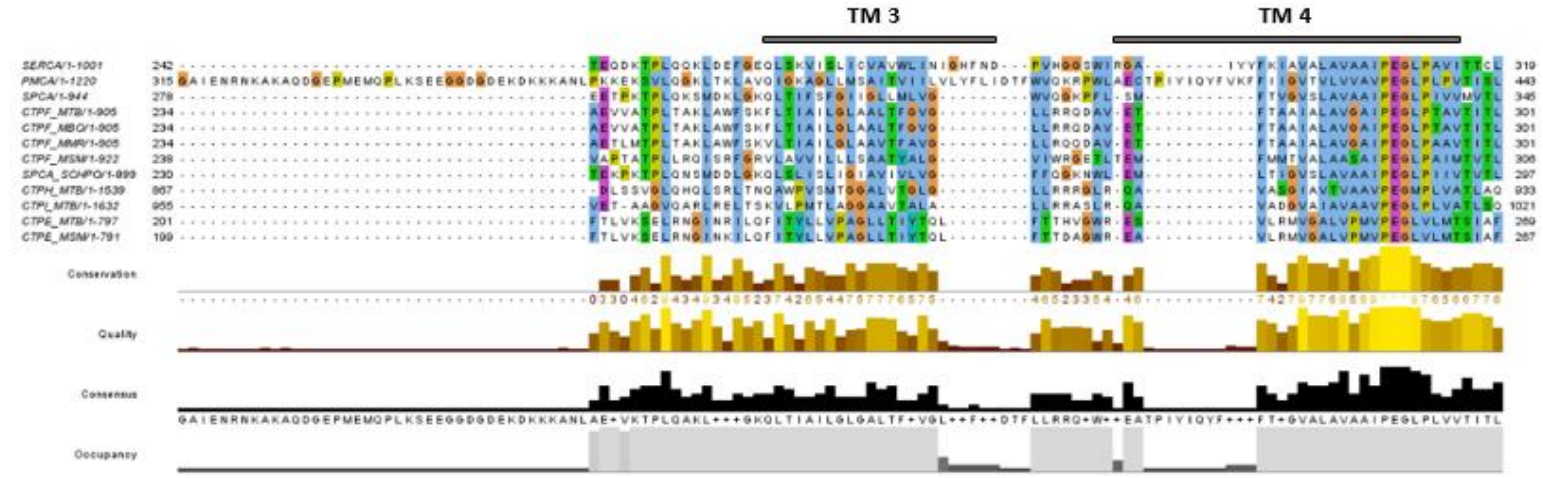
A. Anexo: Alineamiento múltiple de 12 ATPasas tipo P2 seleccionadas

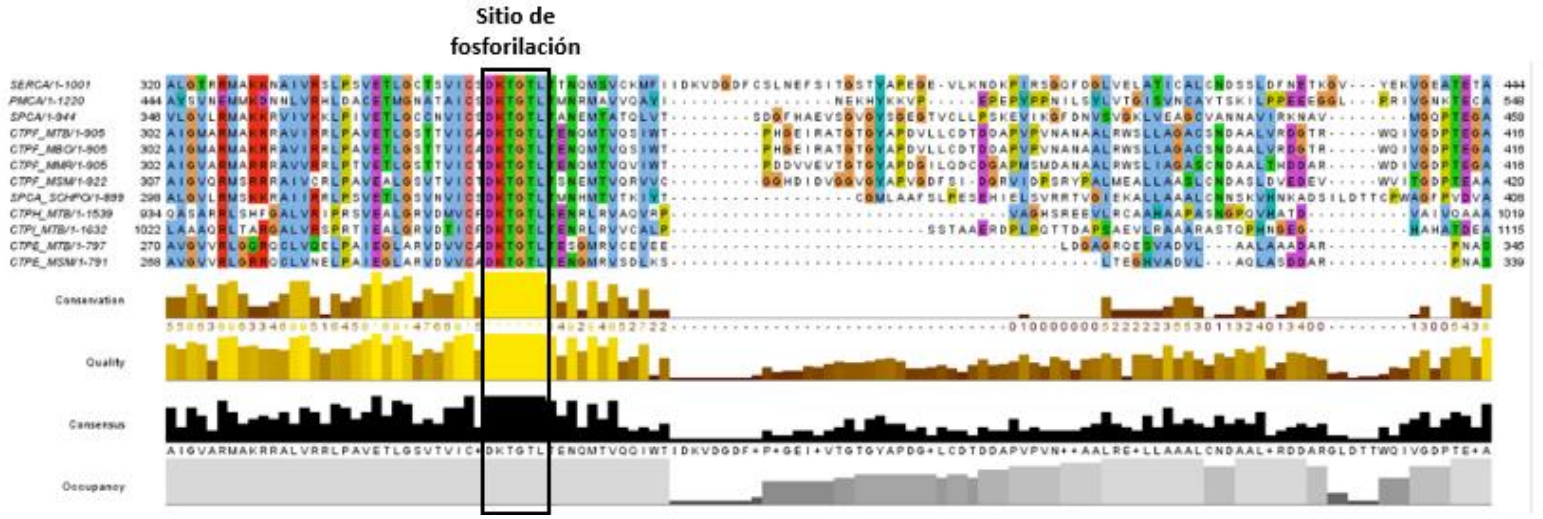
Figura A-1. Alineamiento múltiple de 12 secuencias de ATPasas tipo P2 construido con MUSCLE (128) y visualizado en Jalview (126) utilizando el agrupamiento por color tipo Clustal X: azul (hidrofóbicos), rojo (cargados positivamente), magenta (cargados negativamente), verde (polares), rosado (cisteínas), naranja (glicinas), amarillo (prolinas), cian (aromáticos), blanco (no conservados). Se incluyen las regiones transmembranales de SERCA (80) y los motivos conservados de las ATPasas tipo P (56).

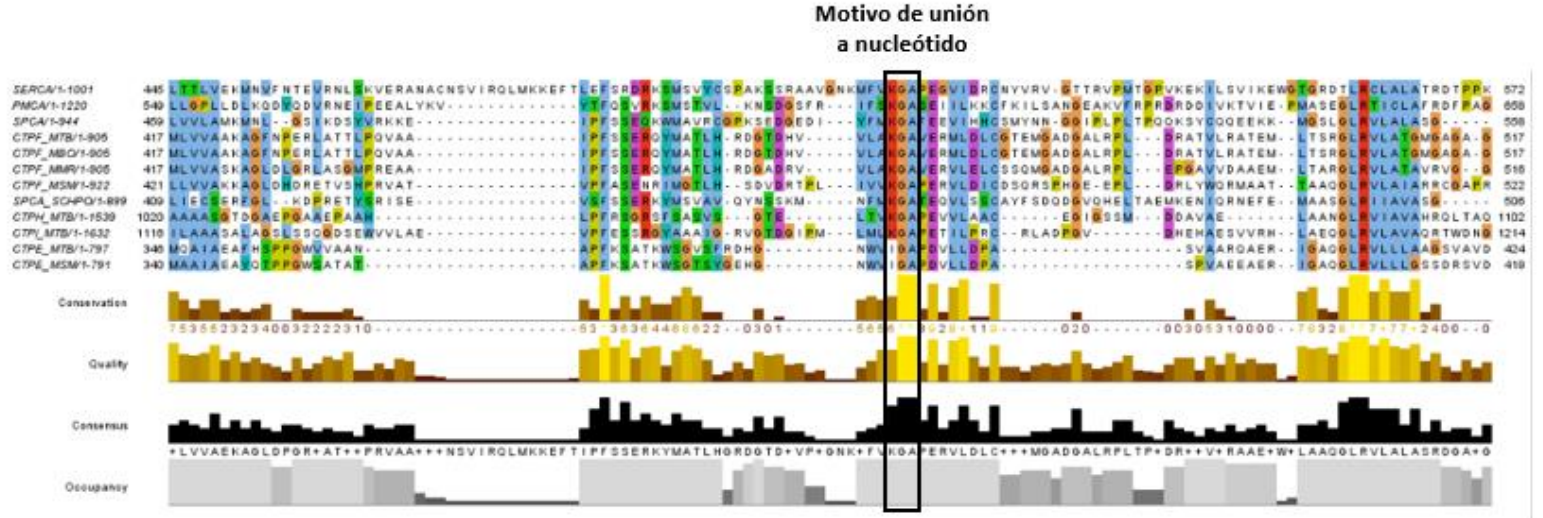


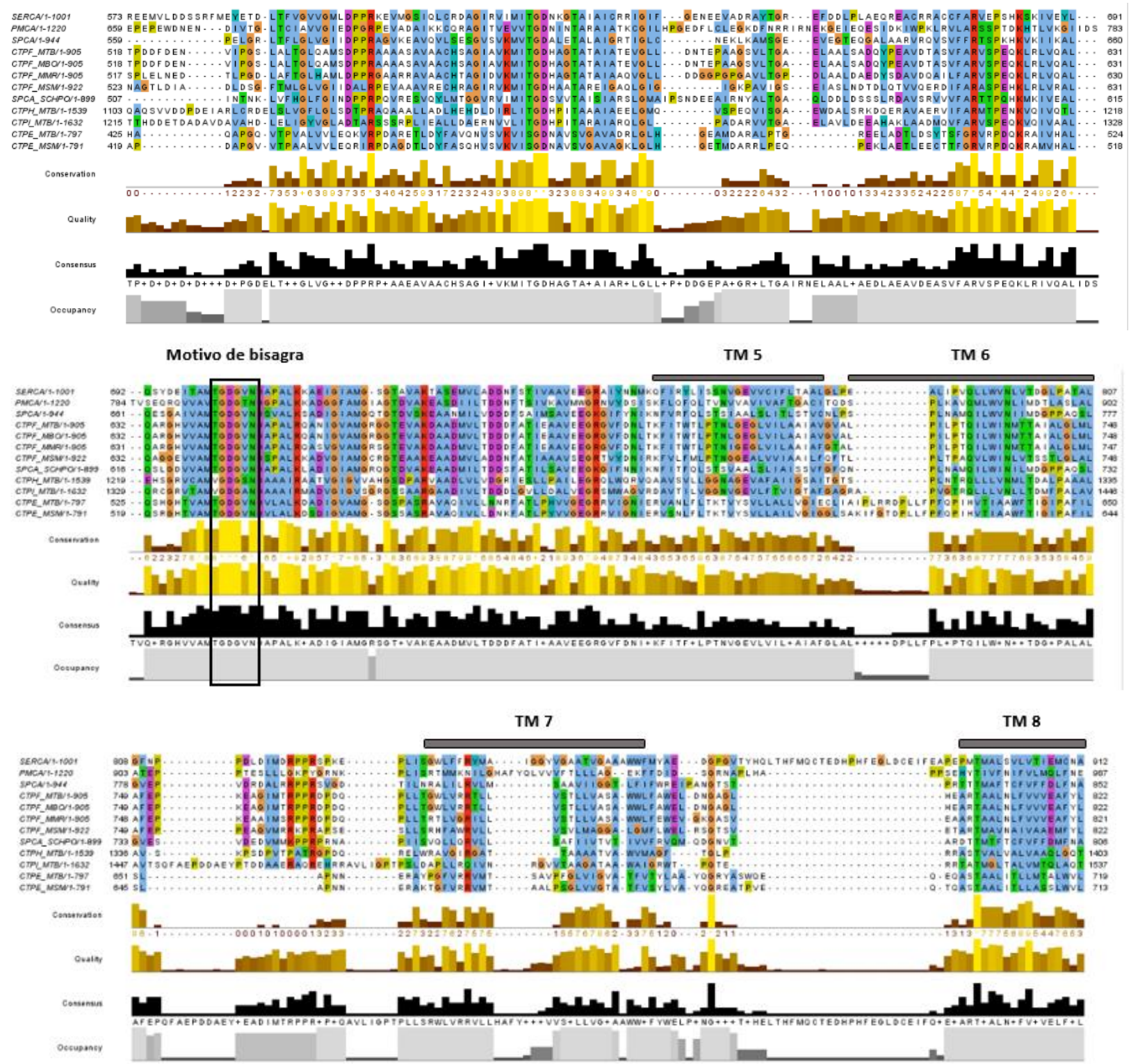

SERCA/1-1001
PMCA/1-1220
SPCA/1-944
CTPF_MTB/1-905
CTPF_MBO/1-905
CTPF_MMR/1-905
CTPF_MSM/1-922
SPCA_SCHPO/1-899
CTPH_MTB/1-1539
CTPI_MTB/1-1632
CTPE_MTB/1-797
CTPE_MSM/1-791
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy

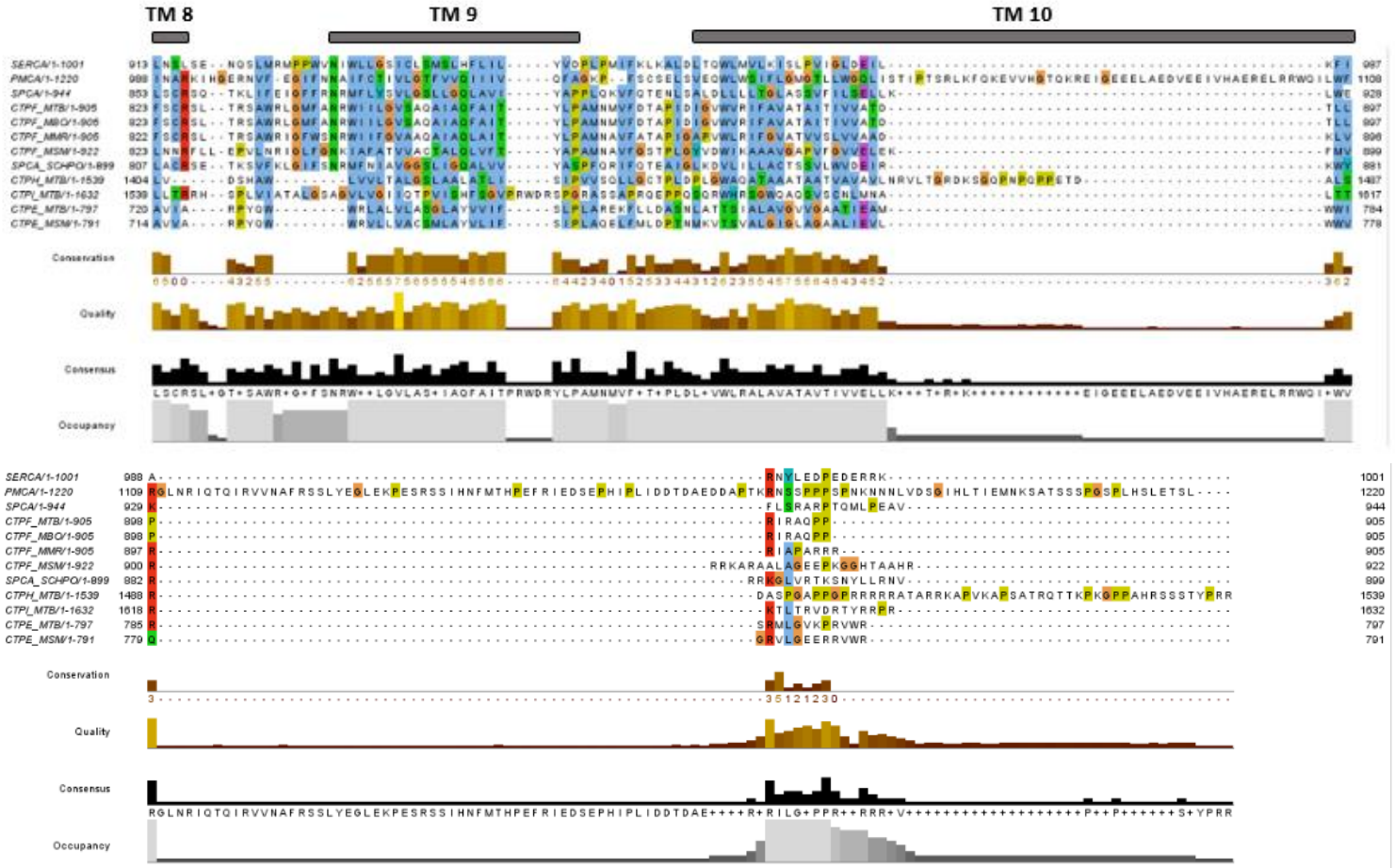

SERCA/1-1001
PMCA/1-1220
SPCA/1-944
CTPF_MTB/1-905
CTPF_MBO/1-905
CTPF_MMR/1-905
CTPF_MSM/1-922
SPCA_SCHPO/1-899
CTPH_MTB/1-1539
CTPI_MTB/1-1632
CTPE_MTB/1-797
CTPE_MSM/1-791
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy
TM 1
TM 2
Motivo de defosforilación


TM 3
TM 4
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy


Sitio de fosforilación
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy


Motivo de unión a nucleótido
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy


Motivo de bisagra
TM 5
TM 6
TM 7
TM 8
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy


TM 8
TM 9
TM 10
Conservation
Quality
Consensus
Occupancy

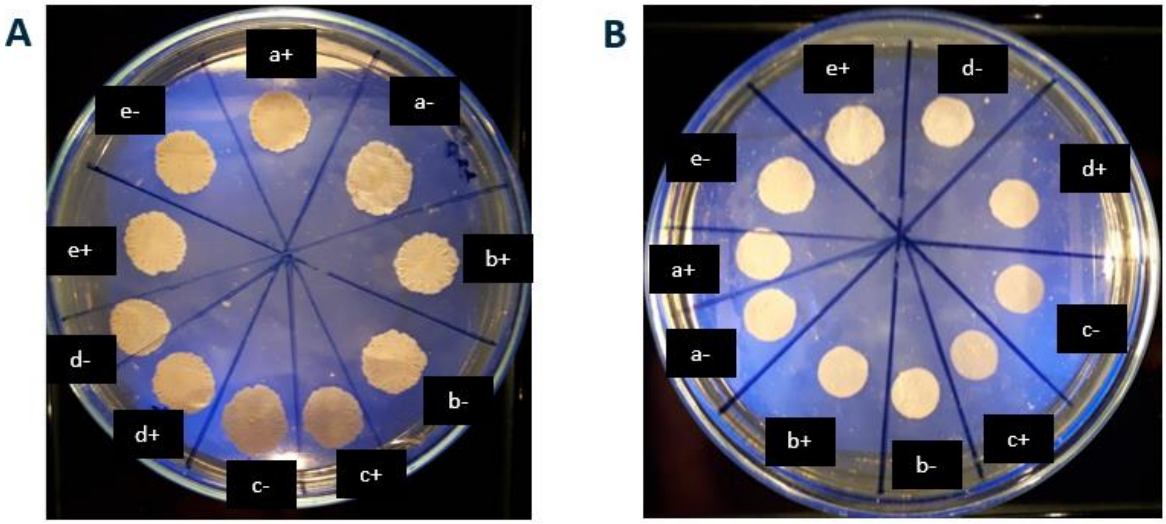
B. Anexo: Viabilidad de células de *Mycobacterium smegmatis* frente a altas concentraciones de Ca^{2+} y Na^{+}

Este ensayo se llevó a cabo para verificar que las concentraciones de calcio y sodio usadas en los experimentos no afectaron la viabilidad de las células. Se cultivaron las cepas recombinantes y control en medio Sauton hasta un OD_{595} aproximadamente igual a 1 y una cantidad medida este cultivo se usó para inocular 10 mL de Sauton a un OD_{595} final de 0,02. Se incubaron durante 24 horas a 37°C y 80 rpm, para luego subdividirse en dos porciones de 5 mL. Una de ellas, denominada positiva, fue suplementada con 10 mM Ca^{2+} o 240 mM Na^{+} y la otra, negativa, con agua desionizada estéril. Se incubaron durante 1 hora a 37 °C y 80 rpm y luego una alícuota de 200 µL fue cultivada sobre placas agar-LB suplementadas con Kanamicina 25 µg/mL. Se incubaron finalmente durante 3 días a 37 °C.

Considerando los ensayos adelantados previamente (124), las concentraciones escogidas fueron 10 mM Ca^{2+} y 240 mM Na^{+}, de manera que se garantizara que habría un gradiente de concentración con dirección hacia el interior de la célula, presionándola así a utilizar sus mecanismos de regulación de la concentración citosólica de estos iones. El experimento fue llevado a cabo de la misma manera en que se ejecutaron los experimentos de acumulación, pero antes de la recolección de las células se tomó una alícuota de 100 µL del medio y fue sembrada en una placa LB suplementada con kanamicina. Se observó que, en todos los casos, el tratamiento con el catión (positivo) no condujo a una diferencia en el crecimiento de las células comparadas con el tratamiento con agua desionizada estéril (negativo). La **Figura B-1** presenta las imágenes de las placas donde se sembró cada muestra de cultivo.

Este resultado sugirió que aun cuando las concentraciones seleccionadas con base en estudios previos y de tal manera que superan las concentraciones extracelulares a las que normalmente se ven expuestas las células (47, 89) son altas, no tienen efecto alguno sobre la viabilidad o el crecimiento de las bacterias durante el tiempo de incubación pues aun cuando las placas no mantienen estas condiciones, si la viabilidad se viera afectada, se esperaría que el crecimiento de los ensayos positivos cambiara respecto al crecimiento de los ensayos negativos. Por tanto, todos los resultados de acumulación, determinados como fracción de calcio total respecto al peso seco del pellet, corresponderían al catión internalizado por células viables.

Figura B-1. Ensayo de viabilidad de las células de *M. smegmatis* mc^{2}155 wt transformadas con pMV261 (a) o CtpF (b) y las células de *M. smegmatis* mc^{2}155 Δ3926, transformadas con pMV261 (c), CtpF (d) o Pma1 (e), frente a las concentraciones a ser usadas en los ensayos de acumulación de A. Ca^{2+} y B. Na^{+}. Los positivos corresponden al tratamiento con catión y los negativos al tratamiento con agua desionizada estéril.



C. Anexo: Comparación de acumulación y actividad ATPasa en *M. smegmatis* Δ3926 respecto a *M. smegmatis* wt

Figura C-1. Acumulación de calcio en células completas de *M. smegmatis* y *M. smegmatis* Δ3926, transformadas con pLNA29 o pCAT3. Las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un cuadriplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05, en que se tomó a *M. smegmatis* wt como grupo de referencia.

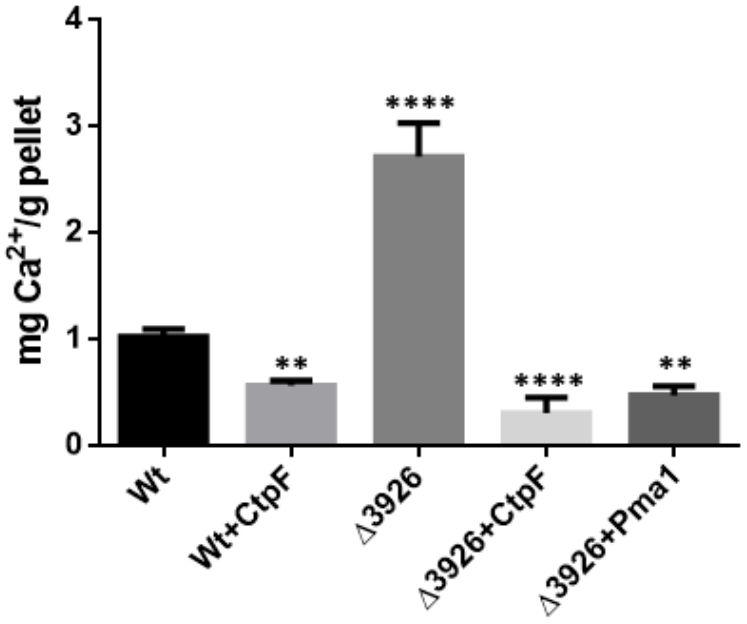
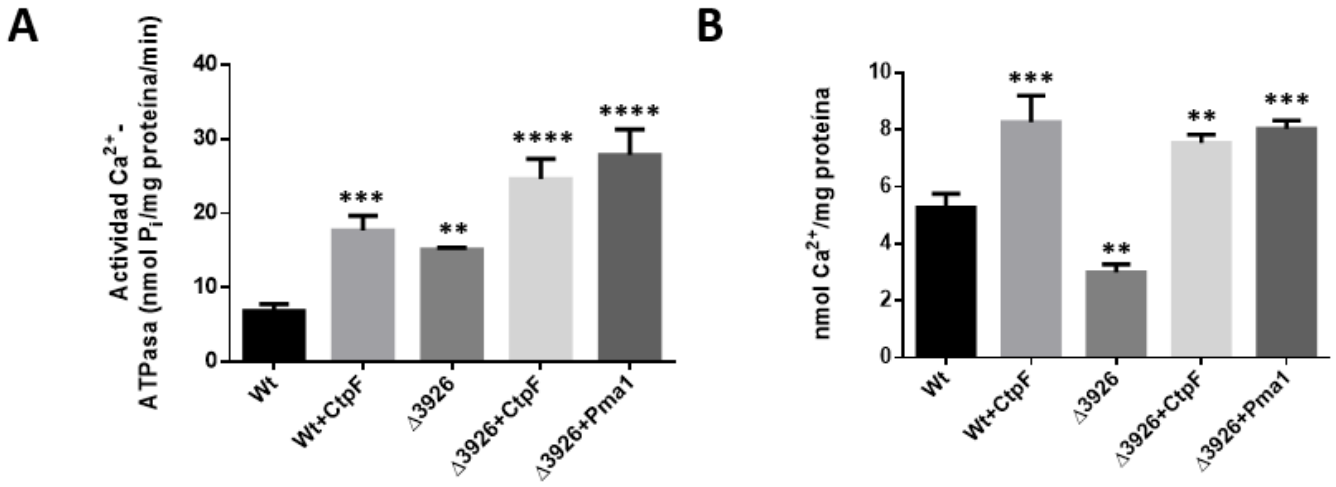


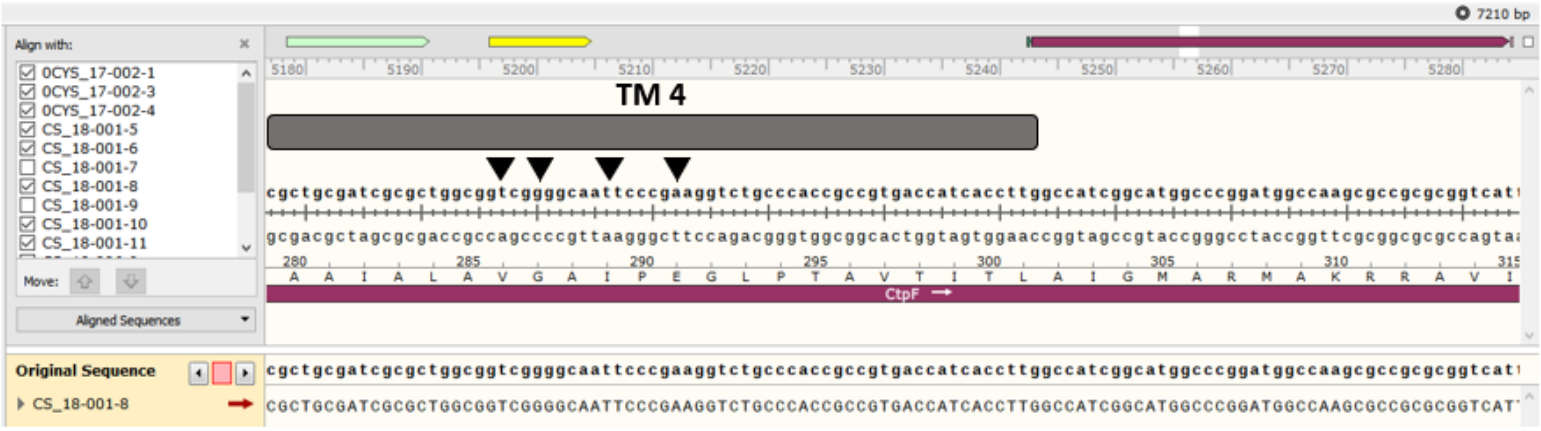
Figura C-2. Actividad Ca^{2+}-ATPasa (**A)** y Acumulación de calcio (**B)** en vesículas de membrana de *M. smegmatis* wt y *M. smegmatis Δ3926* transformadas con pLNA29 (CtpF) o pCAT3 (Pma1). En ambas gráficas, las barras representan el promedio ± desviación estándar (n=3) de un duplicado biológico. Los asteriscos indican el resultado de una prueba

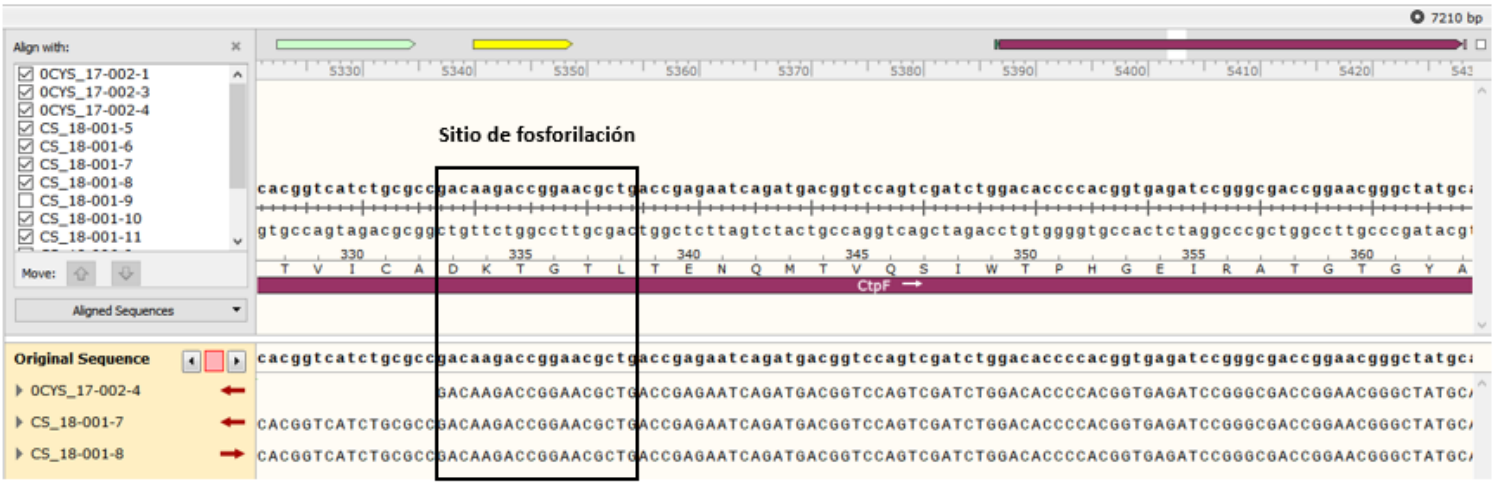
de comparación múltiple de Dunnett, α=0,05, en que se tomó a *M. smegmatis* wt como grupo de referencia.



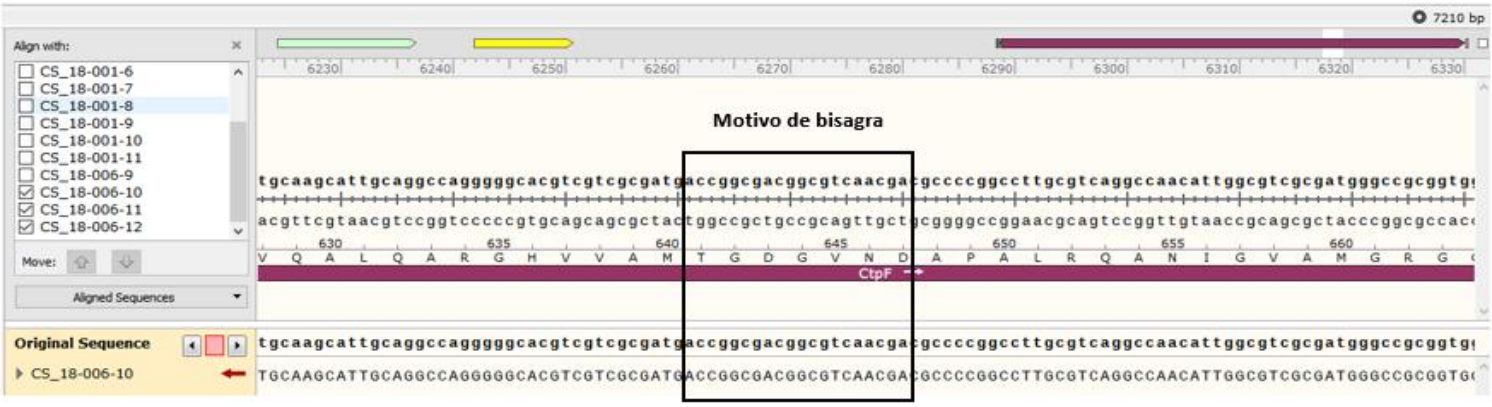
D. Anexo: Secuenciación de pLNA29

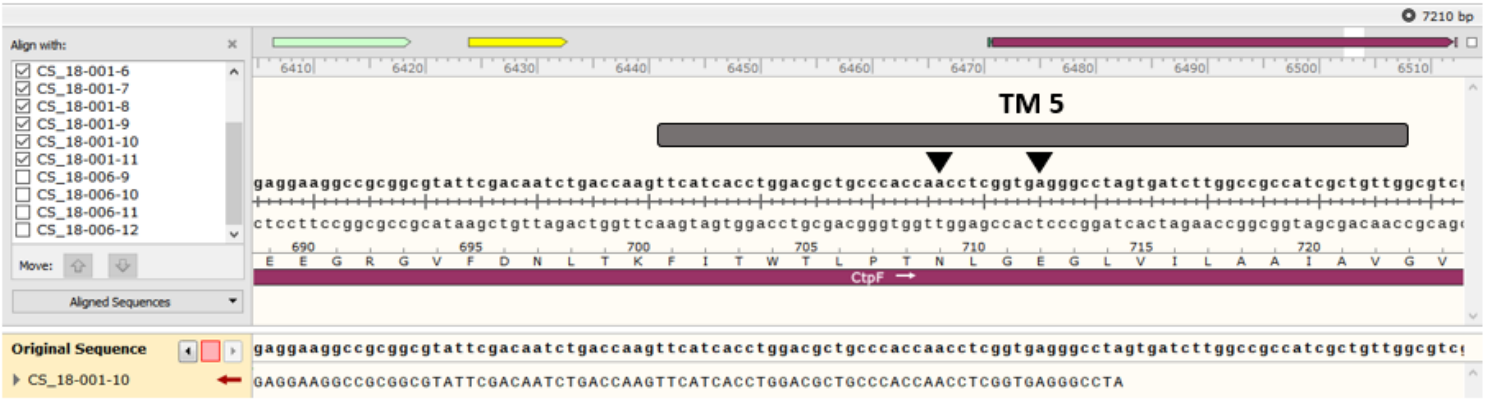
Figura D-1. Alineamiento de los resultados de la secuenciación de pLNA29 comparados con la secuencia esperada, construido por medio del software SnapGene (GSL Biotech). Se visualizan los motivos característicos de las ATPasas tipo P, los residuos involucrados en la unión a calcio y las regiones de inicio y finalización de la transcripción.

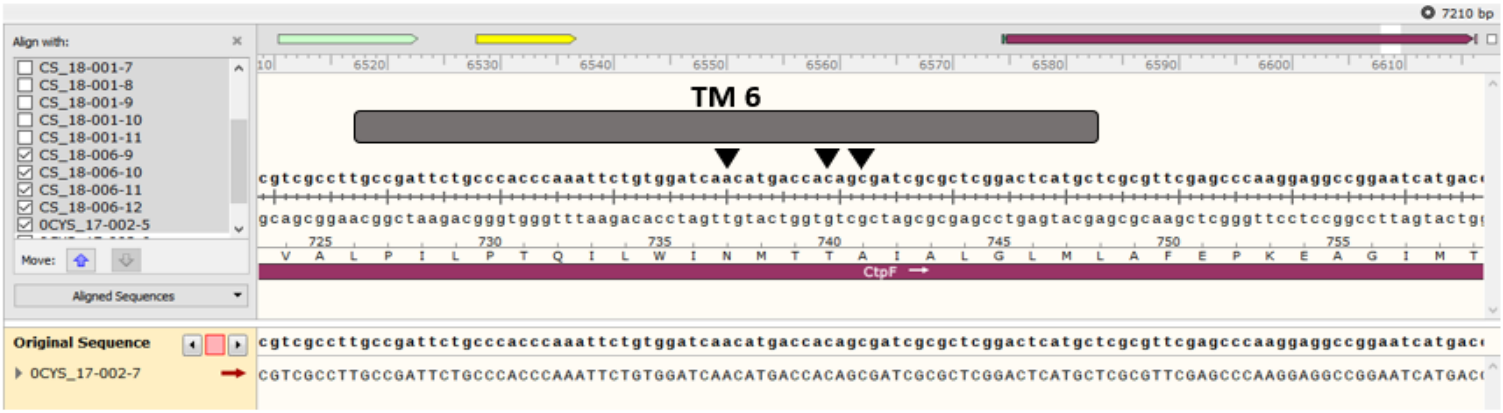

7210 bp
Align with:
0CYS_17-002-1
0CYS_17-002-3
0CYS_17-002-4
CS_18-001-5
CS_18-001-6
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
Move:
Aligned Sequences
TM 4
CtpF
Original Sequence
CS_18-001-8

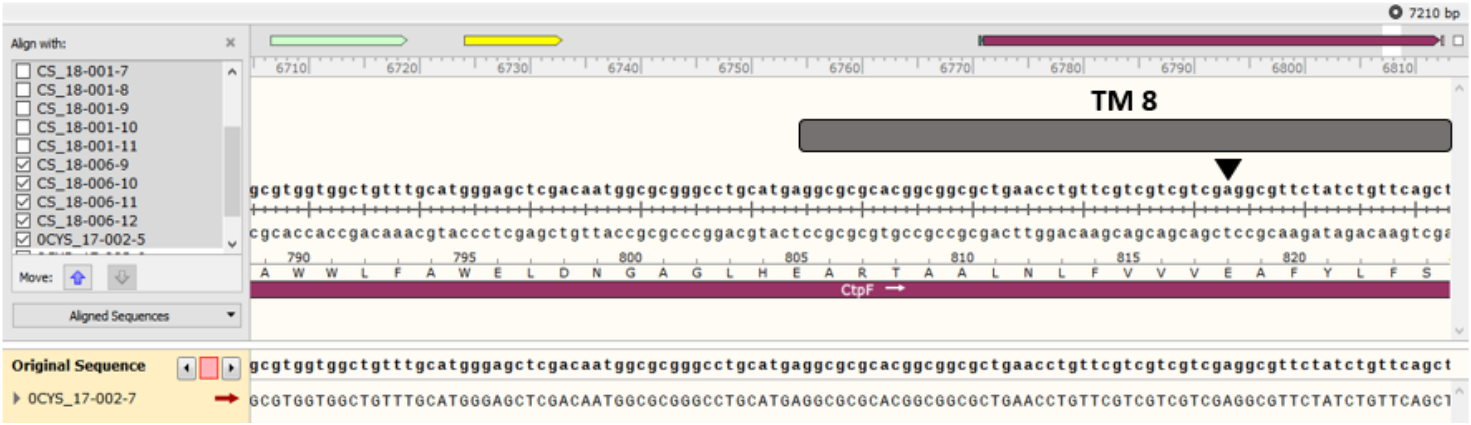

7210 bp
Align with:
0CYS_17-002-1
0CYS_17-002-3
0CYS_17-002-4
CS_18-001-5
CS_18-001-6
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
Move:
Aligned Sequences
Sitio de fosforilación
CtpF
Original Sequence
0CYS_17-002-4
CS_18-001-7
CS_18-001-8

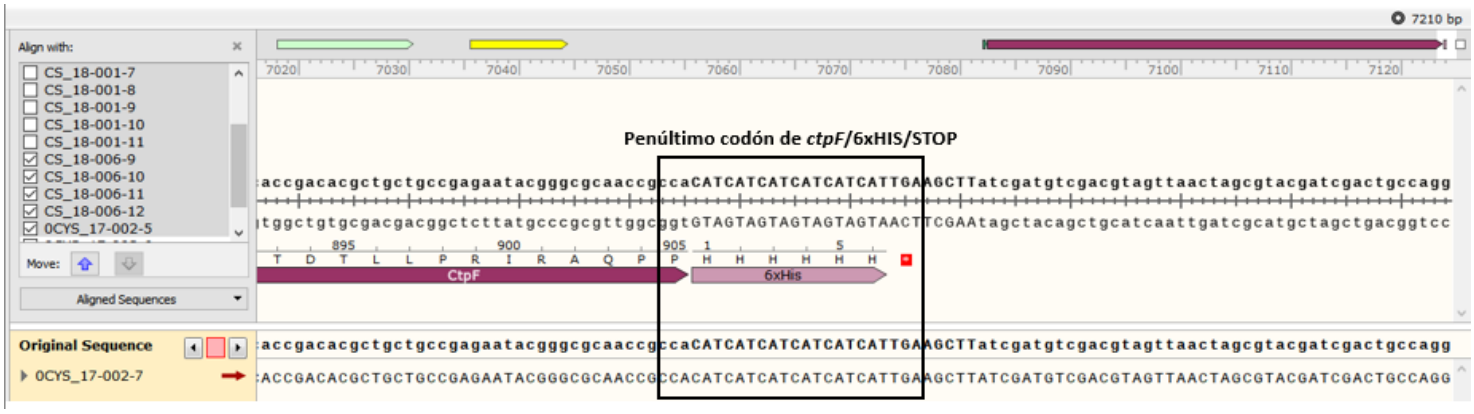
7210 bp
Align with:
0CYS_17-002-1
0CYS_17-002-3
0CYS_17-002-4
CS_18-001-5
CS_18-001-6
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
Move:
Aligned Sequences
Motivo de unión a nucleótido
CtpF
Original Sequence
0CYS_17-002-3
0CYS_17-002-4
CS_18-001-7

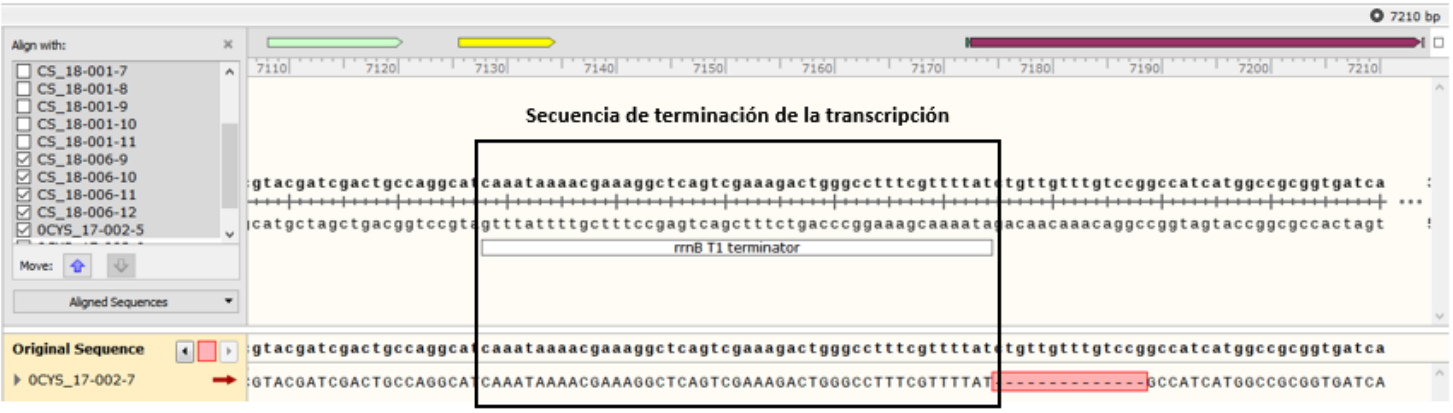

7210 bp
Align with:
CS_18-001-6
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
CS_18-006-9
CS_18-006-10
CS_18-006-11
CS_18-006-12
Move:
Aligned Sequences
Motivo de bisagra
CtpF
Original Sequence
CS_18-006-10


7210 bp
Align with:
CS_18-001-6
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
CS_18-006-9
CS_18-006-10
CS_18-006-11
CS_18-006-12
Move:
Aligned Sequences
TM 5
CtpF
Original Sequence
CS_18-001-10


7210 bp
Align with:
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
CS_18-006-9
CS_18-006-10
CS_18-006-11
CS_18-006-12
0CYS_17-002-5
Move:
Aligned Sequences
TM 6
CtpF
Original Sequence
0CYS_17-002-7


7210 bp
Align with:
CS_18-001-7
CS_18-001-8
CS_18-001-9
CS_18-001-10
CS_18-001-11
CS_18-006-9
CS_18-006-10
CS_18-006-11
CS_18-006-12
0CYS_17-002-5
Move:
Aligned Sequences
TM 8
CtpF
Original Sequence
0CYS_17-002-7


7210 bp
Penúltimo codón de *ctpF*/6xHIS/STOP
CtpF
6xHis
Original Sequence
0CYS_17-002-7


7210 bp
Secuencia de terminación de la transcripción
rrnB T1 terminator
Original Sequence
0CYS_17-002-7

Bibliografía

1. World Health Organization (2018) *Global Tuberculosis Report 2018*, WHO/HTM/TB/2017.23
2. Soldati, T., y Neyrolles, O. (2012) Mycobacteria and the Intraphagosomal Environment: Take It With a Pinch of Salt(s)! *Traffic*. **13**, 1042-1052
3. Wayne and C. D. Sohaskey, L. G. (2001) Nonreplicating persistence of Mycobacterium tuberculosis. *Annu. Rev. Microbiol.* **55**, 139-163
4. Novoa-Aponte, L., y Soto Ospina, C. Y. (2014) Mycobacterium tuberculosis p-type atpases: Possible targets for drug or vaccine development. *Biomed Res. Int.* 10.1155/2014/296986
5. Raimunda, D., Long, J. E., Sassetti, C. M., y Argüello, J. M. (2012) Role in metal homeostasis of CtpD, a Co 2+ transporting P1B4-ATPase of Mycobacterium smegmatis. *Mol. Microbiol.* **84**, 1139-1149
6. Knechel, N. A. (2009) Tuberculosis: Pathophysiology, Clinical Features, and Diagnosis. *Crit. Care Nurse*. **29**, 34-43
7. Coll, P. (2009) Fármacos con actividad frente a Mycobacterium tuberculosis. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **27**, 474-480
8. Nunes-alves, C., Booty, M. G., Carpenter, S. M., Jayaraman, P., Rothchild, A. C., y Behar, S. M. (2014) In search of a new paradigm for protective immunity to TB. *Nat. Rev. Microbiol.* **12**, 289-299
9. Ahmad, S. (2011) Pathogenesis, immunology, and diagnosis of latent mycobacterium tuberculosis infection. *Clin. Dev. Immunol.* 10.1155/2011/814943
10. Blumberg, H. M., y Ernst, J. D. (2016) The challenge of latent TB infection. *JAMA - J. Am. Med. Assoc.* **316**, 931-933
11. O'Garra, A., Redford, P. S., McNab, F. W., Bloom, C. I., Wilkinson, R. J., y Berry, M. P. R. (2013) *The Immune Response in Tuberculosis*, 10.1146/annurev-immunol-032712-095939
12. Rustad, T. R., Sherrid, A. M., Minch, K. J., y Sherman, D. R. (2009) Hypoxia: A window into Mycobacterium tuberculosis latency. *Cell. Microbiol.* **11**, 1151-1159

13. Bartek, I. L., Rutherford, R., Gruppo, V., Morton, R. A., Morris, R. P., Klein, M. R., Visconti, K. C., Ryan, G. J., Schoolnik, G. K., Lenaerts, A., y Voskuil, M. I. (2009) The DosR regulon of M. tuberculosis and antibacterial tolerance. *Tuberculosis*. **89**, 310-316
14. Horsburgh, C. R., Barry, C. E., y Lange, C. (2015) Treatment of Tuberculosis. *N. Engl. J. Med.* **373**, 2149-2160
15. NIH (2016) Tuberculosis Drugs and Mechanisms of Action. *NIH*
16. Khoshnood, S., Heidary, M., Haeili, M., Drancourt, M., Darban-Sarokhalil, D., Nasiri, M. J., y Lohrasbi, V. (2018) Novel vaccine candidates against Mycobacterium tuberculosis. *Int. J. Biol. Macromol.* **120**, 180-188
17. Nieuwenhuizen, N. E., Kulkarni, P. S., Shaligram, U., Cotton, M. F., Rentsch, C. A., Eisele, B., Grode, L., y Kaufmann, S. H. E. (2017) The Recombinant Bacille Calmette-Guérin Vaccine VPM1002: Ready for Clinical Efficacy Testing. *Front. Immunol.* **8**, 1147
18. Gonzalo-Asensio, J., Marinova, D., Martin, C., y Aguilo, N. (2017) MTBVAC: Attenuating the Human Pathogen of Tuberculosis (TB) Toward a Promising Vaccine against the TB Epidemic. *Front. Immunol.* 10.3389/fimmu.2017.01803
19. Mdluli, K., Kaneko, T., y Upton, A. (2015) The tuberculosis drug discovery and development pipeline and emerging drug targets. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10.1101/cshperspect.a021154
20. Jackson, M. (2014) The mycobacterial cell envelope-lipids. *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 10.1101/cshperspect.a021105
21. Daffé, M., Reyrat, J.-M., y Avenir, G. (2008) *The Mycobacterial Cell Envelope* (Avenir, G., Daffé, M., y Reyrat, J.-M. eds), American Society of Microbiology, 10.1128/9781555815783
22. Chiaradia, L., Lefebvre, C., Parra, J., Marcoux, J., Burlet-Schiltz, O., Etienne, G., Tropis, M., y Daffé, M. (2017) Dissecting the mycobacterial cell envelope and defining the composition of the native mycomembrane. *Sci. Rep.* **7**, 1-12
23. Brennan, P. . (2003) Structure, function, and biogenesis of the cell wall of Mycobacterium tuberculosis. *Tuberculosis*. **83**, 91-97
24. Middlebrook, G. (1947) Virulence and Morphological Characteristics of Mammalian Tubercle Bacilli. *J. Exp. Med.* **86**, 175-184
25. Flannagan, R. S., Jaumouillé, V., y Grinstein, S. (2012) The Cell Biology of

Phagocytosis. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **7**, 61-98

26. Seto, S., Tsujimura, K., Horii, T., y Koide, Y. (2013) *Mycobacterial Survival in Alveolar Macrophages as a Result of Coronin-1a Inhibition of Autophagosome Formation*, Elsevier Inc., 10.1016/B978-0-12-405877-4.00010-X
27. Vergne, I., Chua, J., Singh, S. B., y Deretic, V. (2004) Cell Biology of Mycobacterium Tuberculosis Phagosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **20**, 367-394
28. Russell, D. G., Mwandumba, H. C., y Rhoades, E. E. (2002) Mycobacterium and the coat of many lipids. *J. Cell Biol.* **158**, 421-426
29. Malik, Z. A., Thompson, C. R., Hashimi, S., Porter, B., Iyer, S. S., y Kusner, D. J. (2003) Cutting Edge: Mycobacterium tuberculosis Blocks Ca2+ Signaling and Phagosome Maturation in Human Macrophages Via Specific Inhibition of Sphingosine Kinase. *J. Immunol.* **170**, 2811-2815
30. Petzold, C. J., Stanton, L. H., y Leary, J. A. (2005) Structural characterization of lipoarabinomannans from Mycobacterium tuberculosis and Mycobacterium smegmatis by ESI mass spectrometry. *J. Am. Soc. Mass Spectrom.* **16**, 1109-1116
31. Vergne, I., Gilleron, M., y Nigou, J. (2015) Manipulation of the endocytic pathway and phagocyte functions by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **4**, 1-9
32. Wagner, D., Maser, J., Moric, I., Boechat, N., Vogt, S., Gicquel, B., Lai, B., Reyrat, J. M., y Bermudez, L. (2005) Changes of the phagosomal elemental concentrations by Mycobacterium tuberculosis Mramp. *Microbiology*. **151**, 323-332
33. Trost, M., English, L., Lemieux, S., Courcelles, M., Desjardins, M., y Thibault, P. (2009) The Phagosomal Proteome in Interferon-γ-Activated Macrophages. *Immunity*. **30**, 143-154
34. Ward, S. K., Abomoelak, B., Hoye, E. A., Steinberg, H., y Talaat, A. M. (2010) CtpV: A putative copper exporter required for full virulence of Mycobacterium tuberculosis. *Mol. Microbiol.* **77**, 1096-1110
35. Ng, V. H., Cox, J. S., Sousa, A. O., MacMicking, J. D., y McKinney, J. D. (2004) Role of KatG catalase-peroxidase in mycobacterial pathogenisis: Countering the phagocyte oxidative burst. *Mol. Microbiol.* **52**, 1291-1302
36. Ehrt, S., y Schnappinger, D. (2009) Microreview Mycobacterial survival strategies in the phagosome : **11**, 1170-1178
37. Russell, D. G. (2011) Mycobacterium tuberculosis and the intimate discourse of a

chronic infection. *Immunol. Rev.* **240**, 252-268

38. Leistikow, R. L., Morton, R. A., Bartek, I. L., Frimpong, I., Wagner, K., y Voskuil, M. I. (2010) The Mycobacterium tuberculosis DosR regulon assists in metabolic homeostasis and enables rapid recovery from nonrespiring dormancy. *J. Bacteriol.* **192**, 1662-1670
39. Voskuil, M. I., Schnappinger, D., Visconti, K. C., Harrell, M. I., Dolganov, G. M., Sherman, D. R., y Schoolnik, G. K. (2003) Inhibition of Respiration by Nitric Oxide Induces a *Mycobacterium tuberculosis* Dormancy Program. *J. Exp. Med.* **198**, 705-713
40. Leyten, E. M. S., Lin, M. Y., Franken, K. L. M. C., Friggen, A. H., Prins, C., van Meijgaarden, K. E., Voskuil, M. I., Weldingh, K., Andersen, P., Schoolnik, G. K., Arend, S. M., Ottenhoff, T. H. M., y Klein, M. R. (2006) Human T-cell responses to 25 novel antigens encoded by genes of the dormancy regulon of Mycobacterium tuberculosis. *Microbes Infect.* **8**, 2052-2060
41. Prosser, G., Brandenburg, J., Reiling, N., Barry, C. E., Wilkinson, R. J., y Wilkinson, K. A. (2017) The bacillary and macrophage response to hypoxia in tuberculosis and the consequences for T cell antigen recognition. *Microbes Infect.* **19**, 177-192
42. Rustad, T. R., Harrell, M. I., Liao, R., y Sherman, D. R. (2008) The enduring hypoxic response of Mycobacterium tuberculosis. *PLoS One*. **3**, 1-8
43. Galagan, J. E., Minch, K., Peterson, M., Lyubetskaya, A., Azizi, E., Sweet, L., Gomes, A., Rustad, T., Dolganov, G., Glotova, I., Abeel, T., Mahwinney, C., Kennedy, A. D., Allard, R., Brabant, W., Krueger, A., Jaini, S., Honda, B., Yu, W. H., Hickey, M. J., Zucker, J., Garay, C., Weiner, B., Sisk, P., Stolte, C., Winkler, J. K., Van De Peer, Y., Iazzetti, P., Camacho, D., Dreyfuss, J., Liu, Y., Dorhoi, A., Mollenkopf, H. J., Drogaris, P., Lamontagne, J., Zhou, Y., Piquenot, J., Park, S. T., Raman, S., Kaufmann, S. H. E., Mohney, R. P., Chelsky, D., Branch Moody, D., Sherman, D. R., y Schoolnik, G. K. (2013) The Mycobacterium tuberculosis regulatory network and hypoxia. *Nature*. **499**, 178-183
44. Park, H., Guinn, K. M., Harrell, M. I., Liao, R., Voskuil, M. I., Tompa, M., Schoolnik, G. K., y Sherman, D. R. (2003) Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of. *Mol. Microbiol.* **48**, 833-843
45. Pulido, P. A., Novoa-Aponte, L., Villamil, N., y Soto, C. Y. (2014) The DosR Dormancy Regulator of Mycobacterium tuberculosis Stimulates the Na+/K+ and

Ca2+ ATPase Activities in Plasma Membrane Vesicles of Mycobacteria. *Curr. Microbiol.* **69**, 604-610

46. Lodish, H., Berk, A., Kaiser, C., Krieger, M., y Bretscher, A. (2016) *Molecular Cell Biology*, 8th Ed. (Learning, W. H. F.-M. ed), W.H. Freeman-Macmillan Learning
47. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Morgan, D., Raff, M., Roberts, K., y Walter, P. (2015) *Molecular Biology of The Cell*, 6th Ed., Cambridge University Press, New York
48. Nelson, D., y Cox, M. (2017) *Lehninger Principles of Biochemistry*, 7th Ed.
49. Clarke, R., y Khalid, M. (2015) *Pumps, Channels, and Transporters*, Wiley
50. Skou, J. C. (1998) The Identification of the Sodium-Potassium Pump (Nobel Lecture). *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 2320-2328
51. Pedersen, P. L. (2005) Transport ATPases: Structure, motors, mechanism and medicine: A brief overview. *J. Bioenerg. Biomembr.* **37**, 349-357
52. Higgins, C. F. (1992) Abc Transporters - From Microorganisms To Man. *Annu. Rev. Cell Biol.* **8**, 67-113
53. Pedersen, P. L. (2007) Transport ATPases into the year 2008: A brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J. Bioenerg. Biomembr.* **39**, 349-355
54. Perzov, N., Padler-Karavani, V., Nelson, H., y Nelson, N. (2001) Features of V-ATPases that distinguish them from F-ATPases. *FEBS Lett.* **504**, 223-228
55. Bublitz, M., Morth, J. P., y Nissen, P. (2011) P-type ATPases at a glance. *J. Cell Sci.* **124**, 2515-2519
56. Axelsen, K. B., y Palmgren, M. G. (1998) Evolution of substrate specificities in the P-type ATPase superfamily. *J. Mol. Evol.* **46**, 84-101
57. Mattle, D., Sitsel, O., Autzen, H. E., Meloni, G., Gourdon, P., y Nissen, P. (2013) On allosteric modulation of P-type Cu+-ATPases. *J. Mol. Biol.* **425**, 2299-2308
58. Bublitz, M., Poulsen, H., Morth, J. P., y Nissen, P. (2010) In and out of the cation pumps: P-Type ATPase structure revisited. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 431-439
59. Palmgren, M. G., y Nissen, P. (2011) P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*. **40**, 243-266
60. Kühlbrandt, W. (2004) Biology, structure and mechanism of P-type ATPases. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 282-95
61. Palmgren, M. G., y Axelsen, K. B. (1998) Evolution of P-type ATPases. *Biochim.*

Biophys. Acta - Bioenerg. **1365**, 37-45

62. Hu, G. B., Rice, W. J., Dröse, S., Altendorf, K., y Stokes, D. L. (2008) Three-dimensional structure of the KdpFABC complex of Escherichia coli by electron tomography of two-dimensional crystals. *J Struct Biol*. **161**, 411-418
63. Wang, K., Sitsel, O., Meloni, G., Autzen, H. E., Andersson, M., Klymchuk, T., Nielsen, A. M., Rees, D. C., Nissen, P., y Gourdon, P. (2014) Structure and mechanism of Zn2+-transporting P-type ATPases. *Nature*. **514**, 518-522
64. León-Torres, A., Novoa-Aponte, L., y Soto, C. Y. (2015) CtpA, a putative Mycobacterium tuberculosis P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *BioMetals*. **28**, 713-724
65. López, M., Quitian, L. V., Calderón, M. N., y Soto, C. Y. (2018) The P-type ATPase CtpG preferentially transports Cd2+across the Mycobacterium tuberculosis plasma membrane. *Arch. Microbiol.* **200**, 483-492
66. Agertt, F., Crippa, A., Lorenzoni, P., Scola, R., Bruck, I., de Paola, L., Silvado, C., y Werneck, L. (2007) Menkes disease: Case report. *Arq. Neuropsiquiatr.* **65**, 157-160
67. Ala, A., Walker, A., Ashkan, K., Dooley, J., y Schilsky, M. (2007) Wilson's Disease. *Lancet*. **369**, 397-408
68. Vanoevelen, J., Dode, L., Van Baelen, K., Fairclough, R. J., Missiaen, L., Raeymaekers, L., y Wuytack, F. (2005) The secretory pathway Ca2+/Mn2+-ATPase 2 is a Golgi-localized pump with high affinity for Ca2+ ions. *J. Biol. Chem.* **280**, 22800-22808
69. Brini, M., y Carafoli, E. (2010) The Plasma Membrane Ca+-ATPase and the Plasma Membrane Sodium Calcium Exchanger Cooperate in the Regulation of Cell Calcium. *Cold Spring Harb Perspect Biol*
70. Jorgensen, P. L., Håkansson, K. O., y Karlish, S. J. D. (2003) Structure and Mechanism of Na,K-ATPase: Functional Sites and Their Interactions. *Annu. Rev. Physiol.* **65**, 817-849
71. Shin, J. M., Munson, K., Vagin, O., y Sachs, G. (2009) The gastric HK-ATPase: Structure, function, and inhibition. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **457**, 609-622
72. Kühlbrandt, W., Zeelen, J., y Dietrich, J. (2002) Structure, mechanism, and regulation of the Neurospora plasma membrane H+-ATpase. *Science (80-.).* **297**, 1692-1696
73. Faraco, M., Li, Y., Li, S., Spelt, C., Di Sansebastiano, G. Pietro, Reale, L., Ferranti,

F., Verweij, W., Koes, R., y Quattrocchio, F. M. (2017) A Tonoplast P3B-ATPase Mediates Fusion of Two Types of Vacuoles in Petal Cells. *Cell Rep.* **19**, 2413-2422

74. Lopez-Marques, R. L., Theorin, L., Palmgren, M. G., y Pomorski, T. G. (2014) P4-ATPases: Lipid flippases in cell membranes. *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.* **466**, 1227-1240

75. Sørensen, D. M., Holen, H. W., Holemans, T., Vangheluwe, P., y Palmgren, M. G. (2015) Towards defining the substrate of orphan P5A-ATPases. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1850**, 524-535

76. Ramirez, A., Heimbach, A., Gründemann, J., Stiller, B., Hampshire, D., Cid, L. P., Goebel, I., Mubaidin, A. F., Wriekat, A. L., Roeper, J., Al-Din, A., Hillmer, A. M., Karsak, M., Liss, B., Woods, C. G., Behrens, M. I., y Kubisch, C. (2006) Hereditary parkinsonism with dementia is caused by mutations in ATP13A2, encoding a lysosomal type 5 P-type ATPase. *Nat. Genet.* **38**, 1184-1191

77. Di Fonzo, A., Chien, H., Socal, M., Giraudo, S., Tassorelli, C., Iliceto, G., Fabbrini, G., Marcono, R., Fincati, E., Abbruzzese, G., Marini, P., Squitieri, F., Horstink, M., Montagna, P., Dalla Libera, A., Stocchi, F., Goldwirm, S., Ferreira, J., Meco, G., Martignoni, E., Lopiano, L., Jardim, L., Oostra, B., Barbosa, E., y Bonifati, V. (2007) ATP13A2 missense mutations in juvenile parkinsonism and young onset Parkinson disease. *Neurology*. **68**, 1557-1562

78. Toyoshima, C., Nakasako, M., Nomura, H., y Ogawa, H. (2000) Crystal structure of the calcium pump of sarcoplasmic reticulum at 2.6 A resolution. *Nature*. **405**, 647-655

79. Zanotti, G. (2016) The Ca2+ ATPase of the Sarco-/Endoplasmic Reticulum (SERCA): Structure and Control. en *Regulation of Ca2+-ATPases, V-ATPases and F-ATPases* (Chakraborti, S., y Dhalla, N. eds), p. 137, Springer

80. Musgaard, M., Thøgersen, L., Schiøtt, B., y Tajkhorshid, E. (2012) Tracing Cytoplasmic Ca2+ Ion and Water Access Points in the Ca2+-ATPase. *Biophys. J.* **102**, 268-277

81. Brody, I. A. (1969) Muscle Contracture Induced by Exercise. *N. Engl. J. Med.* **281**, 187-192

82. Vandecaetsbeek, I., Trekels, M., De Maeyer, M., Ceulemans, H., Lescrinier, E., Raeymaekers, L., Wuytack, F., y Vangheluwe, P. (2009) Structural basis for the high Ca2+ affinity of the ubiquitous SERCA2b Ca2+ pump. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **106**,

18533-18538

83. Locatelli, J., De Assis, L. V. M., y Isoldi, M. C. (2014) Calcium handling proteins: Structure, function, and modulation by exercise. *Heart Fail. Rev.* **19**, 207-225

84. Green, K. N., Demuro, A., Akbari, Y., Hitt, B. D., Smith, I. F., Parker, I., y LaFerla, F. M. (2008) SERCA pump activity is physiologically regulated by presenilin and regulates amyloid ?? production. *J. Cell Biol.* **181**, 1107-1116

85. Periasamy, M., y Kalyanasundaram, A. (2007) SERCA pump isoforms: Their role in calcium transport and disease. *Muscle and Nerve*. **35**, 430-442

86. Bhupathy, P., Babu, G. J., y Periasamy, M. (2007) Sarcolipin and phospholamban as regulators of cardiac sarcoplasmic reticulum Ca2+ATPase. *J. Mol. Cell. Cardiol.* **42**, 903-911

87. Dode, L., Andersen, J. P., Leslie, N., Dhitavat, J., Vilsen, B., y Hovnanian, A. (2003) Dissection of the Functional Differences between Sarco(endo)plasmic Reticulum Ca2+ -ATPase (SERCA) 1 and 2 Isoforms and Characterization of Darier Disease (SERCA2) Mutants by Steady-state and Transient Kinetic Analyses. *J. Biol. Chem.* **278**, 47877-47889

88. Michelangeli, F., y East, J. M. (2011) A diversity of SERCA Ca^{2+} pump inhibitors. *Biochem. Soc. Trans.* **39**, 789-797

89. Campbell, A. K. (2015) *Intracellular Calcium*, 1st Ed., John Wiley & Sons

90. Naseem, R., Wann, K. T., Holland, I. B., y Campbell, A. K. (2009) ATP Regulates Calcium Efflux and Growth in E. coli. *J. Mol. Biol.* **391**, 42-56

91. Tisa, L. S., y Adler, J. (1992) Calcium ions are involved in Escherichia coli chemotaxis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**, 11804-8

92. Werthén, M., y Lundgren, T. (2001) Intracellular Ca2+ Mobilization and Kinase Activity during Acylated Homoserine Lactone-dependent Quorum Sensing in Serratia liquefaciens. *J. Biol. Chem.* **276**, 6468-6472

93. Burns, D. A., y Minton, N. P. (2011) Sporulation studies in Clostridium difficile. *J. Microbiol. Methods*. **87**, 133-138

94. Hu, Y., Zhang, X., Shi, Y., Zhou, Y., Zhang, W., Su, X. D., Xia, B., Zhao, J., y Jin, C. (2011) Structures of anabaena calcium-binding protein CcbP: Insights into CA2+signaling during heterocyst differentiation. *J. Biol. Chem.* **286**, 12381-12388

95. Gangola, P., y Rosen, B. P. (1987) Maintenance of intracellular calcium in Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **262**, 12570-12574

96. Jones, H. E., Holland, I. B., y Campbell, A. K. (2002) Direct measurement of free Ca2+ shows different regulation of Ca2+ between the periplasm and the cytosol of Escherichia coli. *Cell Calcium*. **32**, 183-192

97. Dominguez, D. C. (2004) Calcium signalling in bacteria. *Mol. Microbiol.* **54**, 291-297

98. Kazmierczak, J., Kempe, S., y Kremer, B. (2013) Calcium in the Early Evolution of Living Systems: A Biohistorical Approach. *Curr. Org. Chem.* **17**, 1738-1750

99. Domínguez, D. C., Guragain, M., y Patrauchan, M. (2015) Calcium binding proteins and calcium signaling in prokaryotes. *Cell Calcium*. **57**, 151-165

100. Tsien, R. W., y Tsien, R. Y. (1990) Calcium Channels, Stores, and Oscillations. *Annu. Rev. Cell Biol.* **6**, 715-760

101. Nazarenko, L. V., Andreev, I. M., Lyukevich, A. A., Pisareva, T. V., y Los, D. A. (2003) Calcium release from Synechocystis cells induced by depolarization of the plasma membrane: MscL as an outward Ca2+channel. *Microbiology*. **149**, 1147-1153

102. Chang, Y., Bruni, R., Kloss, B., Assur, Z., Kloppmann, E., Rost, B., Hendrickson, W. A., y Liu, Q. (2014) Structural basis for a pH-sensitive calcium leak across membranes. *Science (80-.).* **344**, 1131-1135

103. Reusch, R. N., Huang, R., y Bramble, L. L. (1995) Poly-3-hydroxybutyrate/polyphosphate complexes form voltage-activated Ca2+ channels in the plasma membranes of Escherichia coli. *Biophys. J.* **69**, 754-766

104. Geisler, M., Koenen, W., y Richter, J. (1998) Expression and characterization of a Synechocystis PCC 6803 P-type ATPase in E . coli plasma membranes

105. Desrosiers, M. G., Gately, L. J., Gambel, A. M., y Menick, D. R. (1996) Purification and characterization of the Ca2+-ATPase of Flavobacterium odoratum. *J. Biol. Chem.* **271**, 3945-3951

106. Faxén, K., Andersen, J. L., Gourdon, P., Fedosova, N., Morth, J. P., Nissen, P., y Møller, J. V. (2011) Characterization of a Listeria monocytogenes Ca2+ pump: A SERCA-type ATPase with only one Ca2+-binding site. *J. Biol. Chem.* **286**, 1609-1617

107. Waditee, R., Hossain, G. S., Tanaka, Y., Nakamura, T., Shikata, M., Takano, J., Takabe, T., y Takabe, T. (2004) Isolation and Functional Characterization of Ca2+/H+Antiporters from Cyanobacteria. *J. Biol. Chem.* **279**, 4330-4338

108. Radchenko, M. V., Tanaka, K., Waditee, R., Oshimi, S., Matsuzaki, Y., Fukuhara, M., Kobayashi, H., Takabe, T., y Nakamura, T. (2006) Potassium/proton antiport

system of Escherichia coli. *J. Biol. Chem.* **281**, 19822-19829

109. Guragain, M., Lenaburg, D. L., Moore, F. S., Reutlinger, I., y Patrauchan, M. A. (2013) Calcium homeostasis in Pseudomonas aeruginosa requires multiple transporters and modulates swarming motility. *Cell Calcium*. **54**, 350-361
110. Zhou, Y., Yang, W., Kirberger, M., Lee, H.-W., Ayalasomayajula, G., y Yang, J. (2006) Prediction of EF-Hand Calcium-Binding Proteins and Analysis of Bacterial EF-Hand Proteins. *PROTEINS Struct. Funct. Bioinforma.* **65**, 643-655
111. Michiels, J., Xi, C., Verhaert, J., y Vanderleyden, J. (2002) The functions of Ca2+in bacteria: A role for EF-hand proteins? *Trends Microbiol.* **10**, 87-93
112. Tossavainen, H., Permi, P., Annila, A., Kilpeläinen, I., y Drakenberg, T. (2003) NMR solution structure of calerythrin, an EF-hand calcium-binding protein from Saccharopolyspora erythraea. *Eur. J. Biochem.* **270**, 2505-2512
113. Xi, C., Schoeters, E., Vanderleyden, J., y Michiels, J. (2000) Symbiosis-specific expression of Rhizobium etli casA encoding a secreted calmodulin-related protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 11114-11119
114. Linhartová, I., Bumba, L., Mašn, J., Basler, M., Osička, R., Kamanová, J., Procházková, K., Adkins, I., HejnováHolubová, J., Sadílková, L., Morová, J., y Šebo, P. (2010) RTX proteins: A highly diverse family secreted bya common mechanism. *FEMS Microbiol. Rev.* **34**, 1076-1112
115. Brennan, M. J., y Delogu, G. (2002) The PE multigene family: a «molecular mantra» for mycobacteria. *Trends Microbiol.* **10**, 246-249
116. Bachhawat, N., y Singh, B. (2007) Mycobacterial PE_PGRS Proteins Contain Calcium-Binding Motifs with Parallel β-roll Folds. *Genomics, Proteomics Bioinforma.* **5**, 236-241
117. Meena, L. S. (2015) An overview to understand the role of PE_PGRS family proteins in Mycobacterium tuberculosis H 37 Rv and their potential as new drug targets. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **62**, 145-153
118. Wistow, G. (1990) Evolution of a protein superfamily: Relationships between vertebrate lens crystallins and microorganism dormancy proteins. *J. Mol. Evol.* **30**, 140-145
119. Novoa-Aponte, L., Leon-Torres, A., Patino-Ruiz, M., Cuesta-Bernal, J., Salazar, L. M., Landsman, D., Marino-Ramirez, L., y Soto, C. Y. (2012) In silico identification and characterization of the ion transport specificity for P-type ATPases in the

Mycobacterium tuberculosis complex. *BMC Struct Biol*. **12**, 25

120. Sassetti, C. M., y Rubin, E. J. (2003) Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **100**, 12989-12994
121. Botella, H., Peyron, P., Levillain, F., Poincloux, R., Poquet, Y., Brandli, I., Wang, C., Tailleux, L., Tilleul, S., Charrire, G. M., Waddell, S. J., Foti, M., Lugo-Villarino, G., Gao, Q., Maridonneau-Parini, I., Butcher, P. D., Castagnoli, P. R., Gicquel, B., De Chastellier, C., y Neyrolles, O. (2011) Mycobacterial P 1-Type ATPases mediate resistance to Zinc poisoning in human macrophages. *Cell Host Microbe*. **10**, 248-259
122. Raimunda, D., Long, J. E., Padilla-Benavides, T., Sassetti, C. M., y Argüello, J. M. (2014) Differential roles for the Co2+/Ni2+ transporting ATPases, CtpD and CtpJ, in Mycobacterium tuberculosis virulence. *Mol. Microbiol.* **91**, 185-197
123. Gupta, H. K., Shrivastava, S., y Sharma, R. (2017) A novel calcium uptake transporter of uncharacterized P-type ATPase family supplies calcium for cell surface integrity in Mycobacterium smegmatis. *MBio*. **8**, 1-14
124. Novoa (2016) *Potencial de las ATPasas tipo P como dianas terapéuticas o en el diseño de mutantes atenuados de Mycobacterium Tuberculosis*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia
125. UniProt: the universal protein knowledgebase (2017) *Nucleic Acids Res.* **45**, D158-D169
126. Waterhouse, A. M., Procter, J. B., Martin, D. M. A., Clamp, M., y Barton, G. J. (2009) Jalview Version 2--a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. *Bioinformatics*. **25**, 1189-1191
127. Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., y Tamura, K. (2018) MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol. Biol. Evol.* **35**, 1547-1549
128. Edgar, R. C. (2004) MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1792-1797
129. Whelan, S., y Goldman, N. (2001) A General Empirical Model of Protein Evolution Derived from Multiple Protein Families Using a Maximum-Likelihood Approach. *Mol. Biol. Evol.* **18**, 691-699
130. Efron, B., Halloran, E., y Holmes, S. (1996) Bootstrap confidence levels for phylogenetic trees. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 13429-13429

131. Snapper, S. B., Melton, R. E., y Kieser, S. M. T. (1990) Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of Mycobacterium smegmatis. *Mol. Microbiol.* **4**, 1911-1919

132. Ayala, C. M. (2014) *Clonación, sobreexpresión y determinación de la especificidad iónica de Pma1, una posible Na+/K+ ATPasa de Mycobacterium smegmatis*. Ph.D. thesis, Universidad Nacional de Colombia

133. Chomczynski, P. (1987) Single-Step Method of RNA Isolation by Acid Guanidinium Thiocyanate–Phenol–Chloroform Extraction. *Anal. Biochem.* **162**, 156-159

134. Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., y Neuvians, T. P. (2004) Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper – Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnol. Lett.* **26**, 509-515

135. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254

136. Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., y Klenk, D. C. (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* **150**, 76-85

137. Fiske, C., y Subbarow, Y. (1925) The Colorimetric Determination of Phosphorus. *J. Biol. Chem.* **66**, 375-400

138. Cariani, L., Thomas, L., Brito, J., y del Castillo, J. R. (2004) Bismuth citrate in the quantification of inorganic phosphate and its utility in the determination of membrane-bound phosphatases. *Anal. Biochem.* **324**, 79-83

139. Kocabas, E. (2013) *Atypical P-type ATPases, CtpE and CtpF from Mycobacteria tuberculosis*. Ph.D. thesis, Worcester Polytechnic Institute

140. Yonekura, S. I., y Toyoshima, C. (2016) Mn2+transport by Ca2+-ATPase of sarcoplasmic reticulum. *FEBS Lett.* **590**, 2086-2095

141. Koenderink, J. B., Geibel, S., Grabsch, E., De Pont, J. J. H. H. M., Bamberg, E., y Friedrich, T. (2003) Electrophysiological Analysis of the Mutated Na,K-ATPase Cation Binding Pocket. *J. Biol. Chem.* **278**, 51213-51222

142. Sørensen, T. L.-M., Clausen, J. D., Jensen, A.-M. L., Vilsen, B., Møller, J. V., Andersen, J. P., y Nissen, P. (2004) Localization of a K + -binding Site Involved in Dephosphorylation of the Sarcoplasmic Reticulum Ca 2 +-ATPase. *J. Biol. Chem.*

279, 46355-46358

143. Sun, Y., Hegamyer, G., y Colburn, N. H. (1993) PCR-direct sequencing of a GC-rich region by inclusion of 10% DMSO: application to mouse c-jun. *Biotechniques*. **15**, 372-4

144. Zhou, M. Y., Clark, S. E., y Gomez-Sanchez, C. E. (1995) Universal cloning method by TA strategy. *Biotechniques*. **19**, 34-5

145. K., K., y D., K. (1999) Cloning blunt-end Pfu DNA Polymerase-generated PCR fragments into pGEM®-T Vector Systems. *Promega Notes*. **71**, 10-13

146. Dale, J. W., y van Schantz, M. (2002) *From Genes to Genomes*, John Wiley & Sons, Ltd, Chichester, UK, 10.1002/0470856912

147. Kumar, C. M. S., Khare, G., Srikanth, C. V., Tyagi, A. K., Sardesai, A. A., y Mande, S. C. (2009) Facilitated oligomerization of mycobacterial GroEL: Evidence for phosphorylation-mediated oligomerization. *J. Bacteriol.* **191**, 6525-6538

148. Zhang, L., Zhong, Q., Bao, L., Zhang, Y., Gao, L., Huang, B., y Zhang, H. D. (2009) Rv0901 from Mycobacterium tuberculosis, a possible novel virulent gene proved through the recombinant Mycobacterium smegmatis. *Jpn. J. Infect. Dis.* **62**, 26-31

149. Stover, C. K., de la Cruz, V. F., Fuerst, T. R., Burlein, J. E., Benson, L. A., Bennett, L. T., Bansal, G. P., Young, J. F., Lee, M. H., y Hatfull, G. F. (1991) New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*. **351**, 456-60

150. Dellagostin, O. a, Esposito, G., Eales, L. J., Dale, J. W., y McFadden, J. (1995) Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. *Microbiology*. **141 (Pt 8**, 1785-92

151. Gubellini, F., Verdon, G., Karpowich, N. K., Luff, J. D., Boël, G., Gauthier, N., Handelman, S. K., Ades, S. E., y Hunt, J. F. (2011) Physiological Response to Membrane Protein Overexpression in *E. coli*. *Mol. Cell. Proteomics*. **10**, M111.007930

152. Lee, N., Francklyn, C., y Hamilton, E. P. (1987) Arabinose-induced binding of AraC protein to araI2 activates the araBAD operon promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **84**, 8814-8

153. Tabor, S. (2001) Expression Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System. en *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, NJ, USA, 10.1002/0471142727.mb1602s11

154. Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E. O., y Colston, M. J. (1993) Cloning and

Sequencing of the Gene which Encodes the Highly Inducible Acetamidase of Mycobacterium Smegmatis. *J. Gen. Microbiol.* **139**, 575-583

155. Parish, T., Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E. O., y Colston, E. O. (1997) Regulation of the inducible acetamidase gene of Mycobacterium smegmatis. *Microbiology*. **143**, 2267-2276
156. Wang, F., Jain, P., Gulten, G., Liu, Z., Feng, Y., Ganesula, K., Motiwala, A. S., Ioerger, T. R., Alland, D., Vilcheze, C., Jacobs, W. R., y Sacchettini, J. C. (2010) Mycobacterium tuberculosis Dihydrofolate Reductase Is Not a Target Relevant to the Antitubercular Activity of Isoniazid. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3776-3782
157. Bashiri, G., Rehan, A. M., Greenwood, D. R., Dickson, J. M. J., y Baker, E. N. (2010) Metabolic Engineering of Cofactor F420 Production in Mycobacterium smegmatis. *PLoS One*. **5**, e15803
158. Zhang, A. T., Montgomery, M. G., Leslie, A. G. W., Cook, G. M., y Walker, J. E. (2019) The structure of the catalytic domain of the ATP synthase from Mycobacterium smegmatis is a target for developing antitubercular drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 10.1073/pnas.1817615116
159. Ayala-Torres, C., Novoa-Aponte, L., y Soto, C. Y. (2015) Pma1 is an alkali/alkaline earth metal cation ATPase that preferentially transports Na(+) and K(+) across the Mycobacterium smegmatis plasma membrane. *Microbiol. Res.* **176**, 1-6
160. Johansson, F., Olbe, M., Sommarin, M., y Larsson, C. (1995) Brij 58, a polyoxyethylene acyl ether, creates membrane vesicles of uniform sidedness. A new tool to obtain inside-out (cytoplasmic side-out) plasma membrane vesicles. *Plant J.* **7**, 165-73
161. Santos, P., Gordillo, A., Osses, L., Salazar, L.-M., y Soto, C.-Y. (2012) Effect of antimicrobial peptides on ATPase activity and proton pumping in plasma membrane vesicles obtained from mycobacteria. *Peptides*. **36**, 121-128
162. Singer, S. J., y Oster, G. F. (1992) The bilayer couple hypothesis. *Trends Cell Biol.* **2**, 69-70
163. Clausen, J. D., Bublitz, M., Arnou, B., Olesen, C., Andersen, J. P., Møller, J. V., y Nissen, P. (2016) Crystal Structure of the Vanadate-Inhibited Ca 2+ -ATPase. *Structure*. **24**, 617-623
164. Honigmann, A., y Nadler, A. (2018) The Next Frontier: Quantitative Biochemistry in

Living Cells. *Biochemistry*. **57**, 47-55