



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE COLOMBIA

**Complementación de mutantes de
Mycobacterium tuberculosis
defectivos en ATPasas tipo P:
Construcción de plásmidos
integrativos con promotores
autoinducibles**

Q.F. MANUEL ORLANDO FIGUEROA CASTILLO

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de ciencias, Instituto de Biotecnología
Bogotá, Colombia

2023

Complementación de mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* defectivos en ATPasas tipo P: Construcción de plásmidos integrativos con promotores autoinducibles

Q.F. MANUEL ORLANDO FIGUEROA CASTILLO

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título
de:

Magister en Ciencias Microbiología

Director (a):

Carlos Yesid Soto Ospina, Químico, MSc, PhD.

Profesor Titular

Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia

Línea de Investigación:

Biología Molecular de Micobacterias

Grupo de Investigación:

Grupo de Investigación en Bioquímica y Biología Molecular de Micobacterias

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de ciencias, Instituto de Biotecnología, Posgrado Inter facultades

Bogotá, Colombia

2023

Dedico este trabajo a mi madre Marlen Castillo Herrera por creer siempre en mí y no dejarme desfallecer en ningún momento durante este proyecto. A mi novia Danna Marcela Serrano Mojica por darme el impulso de continuar este camino. A mis grandes amigos Carlos Andrés Acosta y Aimmee Lizeth Acosta quienes siempre me ayudaron escuchándome, dándome alientos y compartiendo de su tiempo para jamás rendirme.

A mis compañeros de laboratorio Danna Sofía Camelo y Alver Antonio Cruz, quienes me acompañaron en esta larga travesía, enseñándome y corrigiéndome de la mejor manera para vencer cualquier obstáculo o dificultad presentada y colmarme de conocimiento y experiencia para realizar este trabajo.

Finalizo con el lema que siempre me inculcaron en mi casa:

"Estudia y no serás cuando crecido, ni el juguete vulgar de las pasiones, ni el esclavo servil de los tiranos"

Elías Calixto Pompa

Agradecimientos

Agradezco al profesor Carlos Yesid Soto por esta oportunidad tan bonita de crecimiento personal, quien con dirigirme este trabajo no solo aprendí técnicas en microbiología y biología molecular si no también hice grandes compañeros, donde me sentí no solo investigando si no también aportando en conocimiento, donde encontré acompañamiento durante todo el trabajo y esto me impulso a siempre continuar. Infinitas gracias a mi gran maestra Gina Marcela López, quien siempre estuvo para mí en los pasos más complicados de la tesis junto con el profesor Carlos Yesid, guiándome en los experimentos, guiándome en los objetivos, guiándome en el trabajo.

A la Facultad de Ciencias, al departamento de química, al departamento de farmacia, al Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional de Colombia y a todos sus profesores que aportaron en mi formación.

Resumen

Complementación de mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* defectivos en ATPasas tipo P: Construcción de plásmidos integrativos con promotores autoinducibles

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo ácido alcohol resistente *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). Una de las principales estrategias para el control de la TB es el desarrollo de nuevas vacunas que sustituyan a la actual BCG, ó Bacillus Calmette-Guerin, la que presenta una limitada protección de la TB pulmonar en adultos. En este sentido, las vacunas vivas atenuadas son una de las principales alternativas para reemplazar la actual BCG. por otra parte, teniendo presente el importante papel de las ATPasas tipo p en el control de los gradientes electroquímicos de las micobacterias, estos transportadores de membrana plasmática se consideran objetivos interesantes para la atenuación de *Mtb*. En trabajos previos de nuestro grupo de investigación, la complementación de mutantes defectivos en ATPasas tipo P utilizando plásmidos extracromosomales, multicopia, mostraron una expresión muy aumentada de los genes complementados, durante los procesos de estrés e infección *in vitro*, lo que afecta la recuperación normal de los fenotipos silvestres y las conclusiones de la investigación. Razón por la cual, en el presente trabajo, se evaluó el uso de plásmidos integrativos en la complementación de mutantes de *Mtb* defectivos en el gen *ctpA*, que codifica una ATPasa tipo P de membrana plasmática transportadora de Cu^{2+} . específicamente se comparó la complementación con la proteína CtpA bajo el control del promotor robusto de la proteína *hsp60* proveniente de *E. coli*, con un promotor propio de micobacterias derivado de la proteína antígeno Ag85a, derivado de *Mtb*. Se observó que bajo una condición de estrés oxidativo inducida con peróxido de hidrogeno 4mM, utilizando los vectores integrativos construidos, la transcripción del gen *ctpA* en la cepa complementada bajo control del promotor de la proteína Ag85a es dos veces mayor respecto a la expresión génica bajo el promotor *hsp60*. De esta manera se evidencia que el uso de un promotor propio de *Mtb* favorece la recuperación de los fenotipos silvestres en comparación al uso de un promotor originario de *E. coli*, como es el caso de *hsp60*. Los resultados obtenidos sirvieron para diseñar y construir un sistema de expresión integrativo de la ATPasa tipo P, CtpF (transportador de Ca^{2+} a través de la membrana plasmática de *Mtb*), bajo el control del promotor de Ag85A, para la complementación de mutantes de *Mtb* defectivos en este transportador (*Mtb* Δ *ctpf*), a ser probados en ensayos preclínicos con fines vacunales.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, ATPasas, promotores, transcripción, cepa complementada

Abstract

Complementation of P-type ATPase-defective *Mycobacterium tuberculosis* mutants: construction of integrative plasmids based on the Ag85A promoter

Tuberculosis (TB) is an infectious disease caused by the acid-fast bacillus *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*). One of the main strategies for the control of TB is the development of new vaccines that replace the current BCG Bacillus Calmette-Guérin, which has limited protection against pulmonary TB in adults. In this sense, live attenuated vaccines are one of the main alternatives to replace the current BCG. On the other hand, taking into account the important role of p-type ATPases in the control of electrochemical gradients in mycobacteria, these plasma membrane transporters are considered interesting targets for the attenuation of *Mtb*. In previous work by our research group, the complementation of mutants defective in P-type ATPases using extrachromosomal, multicopy plasmids, showed a greatly increased expression of the complemented genes, during stress and infection processes in vitro, which affects normal recovery. of wild phenotypes and research conclusions. For this reason, in the present work, the use of integrative plasmids was evaluated in the complementation of *Mtb* mutants defective in the *ctpA* gene, which encodes a Cu²⁺-transporting plasma membrane P-type ATPase. Specifically, complementation with the *ctpA* protein was compared under the control of the robust promoter of the *hsp60* protein (from *E. coli*), with a mycobacterial promoter derived from the antigen protein *ag85a* (derived from *Mtb*). It will be observed that under a condition of oxidative stress with 4mm hydrogen peroxide, the expression of *ctpA* in the complemented strain under control of the *ag85a* protein promoter is two times greater than the gene expression under the *hsp60* promoter, using the integrative vectors constructed. In fact, it is reaffirmed that the use of a promoter of an *Mtb* antigen favors the recovery of wild phenotypes compared to the use of *hsp60* originating from *E. coli*. The results obtained served to build an integrative expression system of the P-type ATPase, *ctpF* (Ca²⁺ transporter through the plasma membrane of *Mtb*), under the control of the *Ag85a* promoter, for the complementation of *Mtb* mutants defective in this transporter. *Mtb*Δ*ctpF*), to be tested in preclinical trials with vaccine fines.

Keywords: *Mycobacterium* TB, ATPases, promoters, transcription, complemented strain

Contenido

	Pág.
Resumen.....	8
Lista de figuras	12
Lista de tablas	14
Lista de Símbolos y abreviaturas	15
Introducción	16
1. Marco teórico	20
1.1 TB.....	20
1.2 <i>Mtb</i>	20
1.3 Vacunas contra la TB.....	21
1.4 Plásmidos	23
1.4.1 Plásmidos replicativos en micobacterias	24
1.4.2 Plásmidos Integrativos en micobacterias.....	24
1.4.3 Complementación de mutantes de <i>Mtb</i>	25
1.5 La proteína Ag85	26
1.6 Promotores	26
1.7 ATPasas	27
1.7.1 ATPasas tipo P.....	28
1.7.2 ATPasas de <i>Mtb</i>	28
2. Justificación.....	30
3. Hipotesis experimental.....	31
3.1 Hipotesis experimental.....	31
3.2 Planteamiento del problema	31
4. Objetivos	32
4.1 Objetivo principal	32
4.2 Objetivos específicos	32
5. Materiales y métodos.....	33
5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	36
5.2 Oligonucleótidos y vectores	37
6. Experimentos	40
6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	40
6.2 Digestión y ligación de ADN con enzimas de restricción	42
6.3 Extracción de ADN genómico de <i>Mtb</i> por método CTAB-NaCl / proteinasa K... 42	42
6.4 Preparación y electroporación de células electrocompetentes de <i>E.coli</i> JM109 43	43
6.5 Complementación de <i>Mtb</i> por electroporación con plásmidos	44
6.6 Extracción de ARN de <i>Mtb</i> por método de Trizol	45
6.7 PCR en tiempo real.....	47
7. Resultados y Discusión.....	48

7.1	Diseño y construcción del vector integrativo pMF1, bajo el control del promotor Ag85	48
7.2	Complementación de las cepas mutantes defectivas en ATPasas con los plásmidos pDSC2 y pMF1	56
7.3	Determinación del nivel de transcripción de los genes integrados en las cepas complementadas de <i>Mtb</i>	59
8.	Conclusiones y recomendaciones	63
8.1	Conclusión General	63
8.2	Conclusiones específicas	63
8.3	Recomendaciones	64
9.	Divulgación en eventos científicos	64
A.	Anexo: Tabla de colonias de <i>E.coli</i> transformada con plásmido pMF obtenido de las ligaciones de proporciones de pACM:promotor Ag85	65
B.	Anexo: Tabla de pools de colonias de <i>E.coli</i> JM109 transformadas con pMF1	66
C.	Anexo: Tabla de colonias <i>E.coli</i> JM109 transformadas con pMF1	67
D.	Anexo: Tabla de resultados esperados de la digestión de plásmidos pACM 1 y pMF1 generada en SNAPGENE	68
E.	Anexo: Tabla de resultados ct de qPCR analizados por el método pfaffl	69
	Bibliografía	70

Lista de figuras

	Pág.
Figura 1-1: Gráfico ilustrativo sobre la pared celular de <i>Mtb</i> tomado de (Rivas-Santiago, 2023).....	20
Figura 1-2-1: Gráfico ilustrativo sobre el desarrollo actual de vacunas contra <i>Mtb</i> tomado de (Li Zhuang, 2023).....	22
Figura 1-3-2: Gráfico general de un plásmido con sus diferentes elementos	23
Figura 1-5-4: Grafico de ATPasa <i>ctpA</i> de <i>Mtb</i> en especies reactivas de nitrógeno y oxígeno tomado de (Marcela López-R, 2023)	29
Figura 5-1-1: Diseño <i>in silico</i> de la inserción del plasmido generado en Biorender	33
Figura 5-2-1: Estrategia experimental desarrollada para la ejecución de los objetivos planteados	35
Figura 7-1-1: Ligación de Ag85A en pACM1. Generado en SNAPGENE	49
Figura 7-2-1: Representación de pMF1 generado en SNAPgene.....	50
Figura 7-3-1: Gráfico de verificación de marco de lectura de Ag85A en el plasmido integrativo pMF1	50
Figura 7-4-1: Representación de la digestión de pDSC1 con la enzima <i>MfeI</i> . Generado con SNAPGENE.	51
Figura 7-5-1 Electroforesis del fragmento de pMF1 amplificado por PCR con los primers promAg85afwd - bol2013 y promag85arev - bol2013: A) Electroforesis <i>in silico</i> de PCR de pMF1 amplificado con promAg85Afwd - Bol2013. B) Arriba: Electroforesis de PCR promAg85Afwd - Bol2013, Abajo Electroforesis de PCR promAg85Arev - Bol2013 C) Ubicación de primers promAg85Afwd, Bol2013, promAg85Arev de plasmido pMF1. MP: Generuler 1kb plus	52
Figura 7-6-1: Cultivos de <i>E.coli</i> JM109 transformado con el plásmido pMF1 ligado en las siguientes proporciones: A) 1:3, B) 1:5, C) 1:10	52
Figura 7-7-1 Electroforesis de PCR de Hervidos de pooles de colonias transformadas con pMF1 en diferentes proporciones amplificados. Arriba: PCR con los primers promAg85Afwd - Bol2013 con los pooles. Abajo PCR con los primers promAg85Arev - Bol2013. Carril (-): Negativo (medio sin colonia). MP: Generuler 1kb plus. Carriles A: pool de colonias 1 a 6, B: pool de 7 a 12, C: pool de colonias de 13 a 18, D: pool de colonias 19 a 24, E: pool de colonias de 25 a 30, F: pool de colonias de 31 a 36 y G: pool de colonias de 37 a 40.....	53
Figura 7-8-1: Electroforesis en gel de agarosa de colonias. A) PCR 1 con los primer promAg85Afwd - Bol2013, PCR 2 con los primer Bol2013 y HSP60, PCR 3 con los primer 27F y 1492R. Carriles: L: pACM1, M: negativo. MP: Generuler 1kb plus. Carriles: A: Colonia 1, B: Colonia 2, C: Colonia 3, D: Colonia 4, E: colonia 5, F: Colonia 6, G: Colonia 37, H: Colonia 38, I: Colonia 39 y J: Colonia 40	54
Figura 7-9-1: Análisis mediante electroforesis del mapeo por restricción con <i>PstI</i> , <i>Sall</i> , <i>MfeI</i> y <i>BamHI</i> de las colonias 2, 5, 37 y 40 de <i>E.coli</i> transformadas con pMF1. A) Digestión <i>In silico</i> generada en SNAPGENE, B) Digestión experimental de las colonias 2, 5, 37 y 40 Carriles: A. plásmido pMF1 sin digerir, B. Digestión con <i>PSTI</i> , C. Digestión con	

Sall, D. Digestión con <i>MfeI</i> , E Digestión con <i>BamHI</i> . MP: Generuler 1kb plus Carril: A: Plasmido pMF1, sin digerir, B: digestión del plasmido pMF1 con <i>PstI</i> , C: digestión del plasmido pMF con <i>Sall</i> , D: digestión del plasmido pMF con, <i>MfeI</i> y E Digestion del plasmido con <i>BamHI</i>	55
Figura 7-10-1: Electroforesis de PCR Comprobación de integración génica de plásmido pDSC2 en cepas mutantes de <i>Mtb</i> defectivas en <i>ctpA</i> carriles. A) A. Negativo B. ADN bacteriano PCR1 de GlyVDir-ExtIntRev, PCR2 de ExtIntRev-LipPRev, PCR3 de <i>ctpA</i> sec1-LipPRev, PCR4 de LipPRev-ProAg85ARev. MP: Generuler 1kb plus. B). Figura descriptiva del plásmido pDSC2 integrado en el genoma de <i>Mtb</i> con los fragmentos de las PCR generado en Biorender	57
Figura 7-11-1: Comprobación de integración génica de plásmido pDMF1 en cepas mutantes de <i>Mtb</i> defectivas en <i>ctpF</i> carriles. A) PCR1 de GlyVDir-ExtIntRev, PCR2 ExtIntRev-LipPRev, PCR3 Bol2013-LipPRev A. Col1, B.Col2, C.Col5, D.pACM1,E.negativo MP: Generuler 1kb plus. B). Figura descriptiva del plásmido pMF1 integrado en el genoma de <i>Mtb</i> con los fragmentos de las PCR generado en Biorender	58
Figura 7-12-1: Expresión relativa de <i>ctpA</i> en cepas de <i>Mtb</i>	60
Figura 7-13-1: A) Expresión relativa de <i>ctpA</i> comparando diferencia entre WT y <i>Mtb</i> H37Ra Δ <i>ctpA</i> : <i>ctpA</i> : <i>pML1</i>	61
Figura 7-14-1: Expresión relativa de <i>ctpA</i> sin estrés oxidativo comparando diferencia entre <i>Mtb</i> H37Ra Δ <i>ctpA</i> : <i>ctpA</i> : <i>pDSC2</i> y <i>Mtb</i> H37Ra Δ <i>ctpA</i> : <i>ctpA</i> : <i>pML1</i>	62

Lista de tablas

	Pág.
Tabla 5-1. Cepas bacterianas utilizadas. Características de las cepas de <i>Mtb</i> y <i>E.coli</i> usadas en el presente trabajo	36
Tabla 5-2. Medios de cultivo	37
Tabla 5-3. Plásmidos usados para el desarrollo de este trabajo.	37
Tabla 5-4. Cebadores usados en la investigación.	38
Tabla 6-1. Tabla de primers usados en PCR.	41
Tabla 6-2. Tabla de qPCR realizadas para cada cepa.	48

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
Ct	Umbral de ciclos o Cycle threshold
dNTP	Desoxinucleotidos trifosfato
DEPC	Diethyl Pirocarbonato
DMSO	Dimetilsulfoxido
Km	Kanamicina
LB	Agar Luria Bertani
<i>Mtb</i>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
OADC	Suplemento de Acido Oleico, Albumina bovina, glucosa y catalasa
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Δ	Célula defectiva
Rpm	Revoluciones por minuto
TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
TB	TB
Tm	Temperatura de fusión
UFC	Unidades formadoras de colonia
Vf	Volumen final

Introducción

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa causada por el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mtb*) que normalmente afecta los pulmones ocasionando la TB pulmonar. La TB también puede ocasionar infección diseminada en diferentes partes del cuerpo (TB extrapulmonar), como son los casos del riñón, meninges y huesos (Zaman, 2010). En el 2022, cerca de 10,6 millones de personas en el mundo contrajeron TB y alrededor de 1.3 millones murieron a causa de esta enfermedad. La OMS propone para el 2030 una reducción del 90% de muertes causadas por TB, superando las metas propuestas para el 2025 (reducción del 75%) y lo sucedido en el 2020, que fue apenas una reducción del 35%, donde uno de los pilares fue el tratamiento esquematizado con los antituberculosos tradicionales (Rein M. Houben, 2016). Para el año 2023 se estimó globalmente una incidencia de 133 nuevos casos por cada 100000 habitantes

En el año 2022, la TB es una de las 10 principales causas de muerte en el mundo y es la segunda causa de muerte por un agente infeccioso después de la COVID-19. Las principales formas *para* controlar la TB son la quimioterapia, el diagnóstico temprano, Y la vacuna BCG la que derivada de *M. bovis* (que produce tuberculosis en bovinos), la que fue descrita hace más de 100 años. (WHO, 2023)

El mecanismo de patogenicidad de *Mtb* se basa principalmente en la capacidad de reprogramar el macrófago después de la infección primaria evitando su propia eliminación. Además, la respuesta del sistema inmune permite la formación de granulomas en el que el patógeno sobrevive en un estado de equilibrio, en el que el *Mtb* muestra capacidad de controlar el metabolismo y replicación produciendo una forma de infección latente, en que el bacilo resiste las defensas y la farmacoterapia. (R. Miggiano, 2020). Aproximadamente

1.700 millones de personas estaban infectadas de TB latente en todo el mundo en el 2023. (WHO, 2023)

La TB es prevenible y curable, cerca del 85% de las personas infectadas pueden superar la enfermedad después de ser tratadas mediante quimioterapia con antibióticos. El esquema típico es un tratamiento conocido como de primera línea que los antibióticos isoniacida, rifampicina, pirazinamida y etambutol durante 56 días, lo que se complementa con isoniacida y rifampicina durante 4 meses adicionales. (Luna, 2003). Entre los mecanismos de resistencia al tratamiento de primera línea se encuentran mutaciones o deleciones del gen *katG*. Este gen codifica para una la enzima catalasa-peroxidasa que cataliza la transformación de Isoniazida en el radical isonicotinoil, el que se une a Nicotinamida Adenin Dinucleótido (NAD⁺) produciendo un aducto que inhibe la actividad del gen *inhA*, de esta forma interfiriendo la síntesis de ácidos micólicos, los que son un componente importante en la envoltura de las micobacterias, y así desencadenando la muerte celular. (Migliori, 2020). Las micobacterias también utilizan bombas de eflujo como mecanismo de resistencia a Pirazinamida, Isoniazida y Etambutol. Las micobacterias que desarrollan este tipo de resistencias generan TB multirresistente (MDR-TB), o TB extremadamente resistente (XDR-TB). Por esta razón se hace necesario utilizar medicamentos de segunda línea como fluoroquinolonas (Levofloxacino y Moxifloxacina), e inclusive cambiar en tratamientos a fármacos como Bedaquilina, Linezolid, Clofazimina, Cicloserina, Amikacina, Estreptomina y Terizidona, siendo estas moléculas farmacológicas la última línea para tratar la TB. (Migliori, 2020). Por lo tanto, se hace relevante el estudio de nuevos medicamentos u otras alternativas que puedan ayudar a combatir esta enfermedad.

Por otra parte, el diseño una vacuna más eficaz que reemplace la actual BCG es prioritario para el control de la TB. La vacuna BCG actualmente ofrece protección que varía contra la TB pulmonar, es decir no protege de manera confiable y puede producir efectos adversos graves en individuos inmunosuprimidos, generando así que sea contraindicada en personas infectadas con VIH. Además, la protección contra BCG disminuye después de aproximadamente 20 años (Mangtani, 2017). el genoma de *M. bovis* BCG en comparación con *Mtb* presenta deleciones de regiones génicas como *RD1* y *ESX*, y de

genes de virulencia que codifican las proteínas ESAT6 y CFP10 , que son muy importantes a nivel inmunomodulador. (Samperio, 2019)

Para superar las limitaciones que tiene BCG se han planteado diferentes estrategias como: 1) mejorar la BCG, 2) diseñar nuevos mutante atenuados, 3) vacunas de subunidades, 4) vacunas de vectores virales, 5) vacunas de ADN, 6) vacunas emergentes de ARNm, Y 7) vacunas basadas en partículas similares a virus (VLP). Específicamente algunas vacunas de células vivas atenuadas actualmente en desarrollo se encuentran en etapas preclínicas o clínicas. (L Zhuang, 2023). Recientemente, nuestro grupo de investigación del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia, ha estudiado el potencial de las ATPasas tipo P como dianas de atenuación para el diseño de posibles mutantes atenuados de *Mtb*, y blanco de nuevos compuestos antituberculosos (L. Novoa, 2014)

Las ATPasas tipo P son proteínas relevantes en la homeóstasis iónica de *Mtb*. Estos transportadores de metales utilizan para el transporte iónico, la energía liberada durante la hidrólisis de ATP. Se ha descubierto que estas ATPasas son necesarias para la virulencia de *Mtb*, toda vez que son importantes para que el bacilo tuberculoso sobreviva al interior del macrófago. Específicamente, la eliminación del genoma de *Mtb* del gen que codifica para la ATPasa CtpC, importante para la desintoxicación de Zn^{+2} , genera bacilos más sensibles a las concentraciones de este metal, afectando su capacidad de crecimiento dentro de los macrófagos. En general, se ha conocido que la eliminación de algunas ATPasas atenúa significativamente el crecimiento de *Mtb* (L. Novoa, 2014).

Durante el estudio de la virulencia de mutantes atenuados de *Mtb* se hace necesario contar con cepas de mutante complementado, a las que se reintroduce una copia natural del gen mutado. (Farahnaz Movahedzadeh, 2011). Sin embargo, en estudios previos con mutantes defectivos de ATPasas tipo P en *Mtb*, se ha evidenciado que al usar plásmidos replicativos con promotores fuertes como el de la proteína *hsp60* de *E. coli*, se producen altos niveles de expresión tóxicos para la cepa complementada (R. Chapman, 2010). Un claro ejemplo es la complementación de mutantes de *Mtb* defectivos en el gen *ctpF* con plásmido de complementación basados pMV261, un plásmido extracromosomal y multicopia. Se observó sobre expresión de CtpF, hasta por lo menos 60 veces respecto a los niveles basales de proteína en la cepa salvaje de *Mtb*. Este comportamiento ha resultado

inconveniente para los estudios de virulencia de modelo animal en ratones BALB/c. (Hoyos M. , 2021)

Estudios previos han demostrado que en la complementación el uso del promotor Ag85 ha resultado de más estabilidad respecto al utilizar el promotor *hsp60*. (Haeseleer, 1994). En el presente trabajo se propone la complementación de mutantes de *Mtb* defectivos en los genes *ctpA* y *ctpF*, con plásmidos recombinantes construidos a partir del plásmido integrativo (no extracromosomal) pMV361 y bajo el control del promotor de la proteína Ag85A, con el objetivo de generar una alternativa viable de complementación, que permita optimizar la recuperación del fenotipo parental en las ATPasas y así comprobar que la atenuación de la cepa mutante es producto de la delección de la ATPasa y no a otros eventos asociados a la experimentación. Por lo tanto, se analizaron los niveles de transcripción en la complementación de mutantes defectivos en CtpA (un transportador de cobre a través de la membrana plasmática de *Mtb*) comparando plásmidos de integración derivados en pMV361 para complementar la proteína CtpA bajo el promotor *hsp60* (derivado de *E. coli*) y el promotor Ag85A proveniente de *Mtb*.

1. Marco teórico

1.1 TB

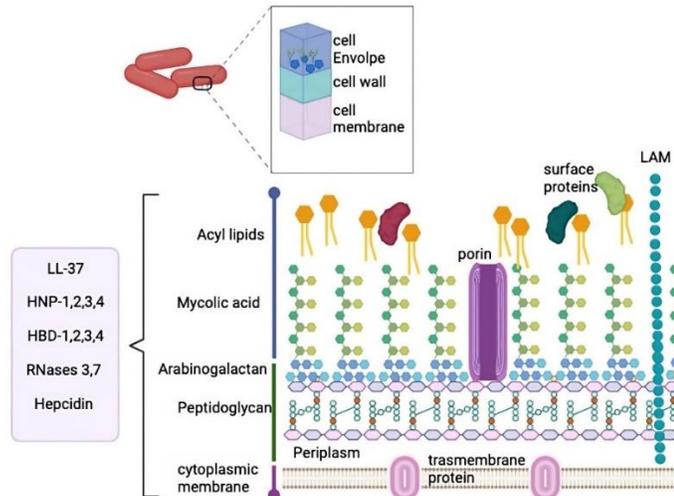
La TB es una de las enfermedades más antiguas que ha acompañado la humanidad, toda vez que se tiene evidencia de la presencia de *Mtb* en restos humanos de más de 9000 años de antigüedad. La TB Puede afectar a personas de cualquier edad, especialmente a personas con sistemas inmunitarios debilitados como pacientes con VIH y pacientes con quimioterapia, dado que el sistema inmunológico de las personas sanas generalmente bloquea la micobacteria. (Sandhu, 2011). Los síntomas de la enfermedad dependen del lugar en que coloniza la micobacteria, usualmente los infectados tiene síntomas como tos, dolor en el pecho, fatiga, fiebre, pérdida de peso y sudoración nocturna. (Zaman, 2010).

1.2 *Mtb*

El complejo *Mtb* incluye aquellas micobacterias que causan TB en humanos y animales, siendo *M. africanum*, y *Mtb* los principales patógenos en humanos, y las especies *M. microti*, *M. pinnipedii*, *M. orygis*, *M. mungii*, *M. caprae* y *M. bovis*, en animales.

Mtb, es un bacilo aerobio, de crecimiento lento, quimioorganotrofo, inmóvil y no formador de esporas. Se puede visualizar a través de la técnica de tinción de Ziehl-Neelsen mediante la cual su pared gruesa y cerosa retiene a los lavados con ácido-alcohol. Adicionalmente en pruebas bioquímicas podemos observar que produce niacina y tiene la capacidad de reducir el nitrato. La pared celular de esta bacteria es la principal diferencia que tiene con respecto a las demás bacterias dado que contiene ácidos micólicos, altamente ramificados, que conforman un complejo que comprende peptidoglicano unido arabinogalactano, a su vez unido a los ácidos micólicos. De esta manera la pared celular le confiere propiedades tales como una relativa impermeabilidad a los antibióticos e inmunomodulación conferida por lipoarabinomananos, sulfolípidos y dimcitocerosato de tiocero. (S. Gordon, 2018)

Figura 1-1: Gráfico ilustrativo sobre la pared celular de *Mtb* tomado de (Rivas-Santiago, 2023)



1.3 Vacunas contra la TB

Las vacunas han realizado cambios significativos en la salud pública, dado que explotan la capacidad del sistema inmunológico humano altamente evolucionado para responder encuentros con antígenos patógenos (A. Pollard, 2021). Sin embargo, hoy en día existe la necesidad de comprender las bases inmunológicas de la vacunación en patógenos difíciles de atacar como *Mtb*. Dado que la vacuna actual BCG ha tenido limitaciones con respecto a la protección a lo largo del tiempo, no es tan eficaz contra la forma más común de TB (pulmonar) y adicionalmente está contraindicada en pacientes con VIH (L Zhuang, 2023).

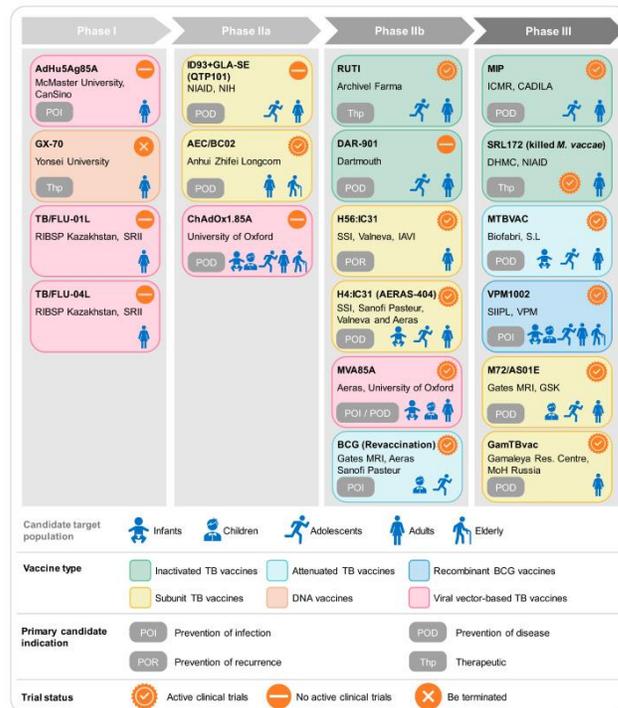
De esta manera se ha planteado que las vacunas para reemplazar BCG deben tener por lo menos tres componentes: 1) la prevención de la infección primaria y la enfermedad después de la exposición, 2) la prevención de la reactivación de la infección latente y 3) un adyuvante del tratamiento estándar para la recuperación del paciente. Las nuevas vacunas incluyen vacunas inactivadas, vacunas de células vivas atenuadas, vacunas de BCG recombinantes, vacunas de subunidades, vacunas de vectores virales y vacunas de ADN. Actualmente existen por lo menos 19 vacunas contra la TB en estudios clínicos (L Zhuang, 2023). (Figura 1-1-1)

Las vacunas inactivadas usan formas lisadas completas o fragmentadas de *Mtb*. Estas vacunas inducen respuesta humoral, sin embargo, tiene como desventaja un tiempo de

inmunización corto generando la necesidad de múltiples dosis (L Zhuang, 2023). BCG recombinante también se ha mostrado como alternativa de vacuna mediante la inserción de genes Ag85A, Ag85B y TB10.4 (Triccas, 2009); sin embargo, algunas vacunas como rBCG30 y AERAS-422 se han suspendido debido a problemas de eficacia y seguridad deficientes. (Ohara N., 2001).

Las vacunas de células atenuadas se construyen eliminando algunos genes de virulencia en *Mtb*. Se trata de una estrategia que presenta ventajas respecto a otras vacunas, como la activación de respuestas inmunitarias complejas y diversas, puesto que las cepas inoculadas son similares a las de una infección natural ofreciendo protección a largo plazo. Sin embargo, tienen algunos riesgos como la recuperación de la virulencia. Algunas de estas vacunas como es el caso de *MTBVAC* ya se encuentran en estudios clínicos. (L Zhuang, 2023)

Figura 1-2-1: Gráfico ilustrativo sobre el desarrollo actual de vacunas contra *Mtb* tomado de (L Zhuang, 2023)



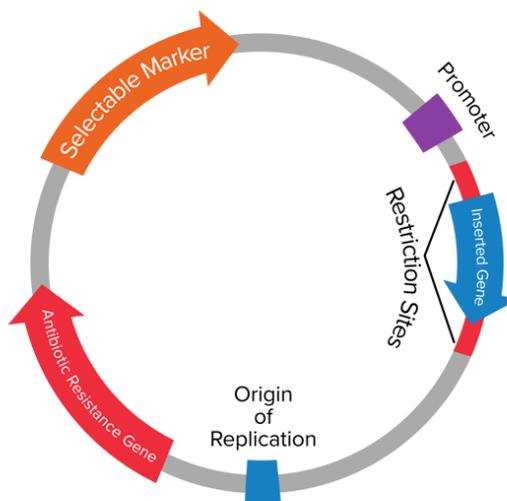
MTBVAC es una vacuna basada en la deficiencia de gen *pho-fadD26*, para desactivar la expresión de factores de virulencia. Esta vacuna está dirigida a principalmente recién

nacidos y ha demostrado mayor seguridad frente a BCG, adicionalmente es la primera vacuna de células vivas que ingresa en estudios clínicos. (L Zhuang, 2023)

1.4 Plásmidos

Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosomal (episomales) es decir son independientes del cromosoma. Se trata de moléculas pequeñas respecto al ADN genómico que pueden ser circulares o lineales. Estas moléculas pueden contener información genética que puede conferir ventajas selectivas a las bacterias en ciertos ambientes.

Figura 1-3-2: Gráfico general de un plásmido con sus diferentes elementos



Los plásmidos se pueden clasificar según grupos de funciones: conjugativos, de resistencia, de virulencia y metabólicos. Los plásmidos conjugativos pueden dirigir la formación de pili sexuales que unen a una célula que contiene un plásmido con otra que carece del plásmido. Los de resistencia contienen genes de resistencia a antibióticos o toxinas, en estos plásmidos se pueden encontrar típicamente genes que codifican enzimas capaces de destruir o modificar las moléculas que generan toxicidad en la bacteria. Los de

virulencia que puede incrementar la capacidad de la bacteria de infectar o colonizar un organismo, como la adherencia a antígenos, la generación de enterotoxinas y resistencia a mecanismos de la respuesta inmune. Finalmente, los metabólicos pueden contener genes para la degradación de lactosa, tolueno y nitrógeno, entre otras moléculas. (Sherwood, 2008)

Los plásmidos también pueden integrarse en el cromosoma (integrativos) y desde allí ser replicados durante los procesos de división celular, donde existe la posibilidad de perderse, toda vez que no siempre son repartidos equitativamente en las células hijas.

1.4.1 Plásmidos replicativos en micobacterias

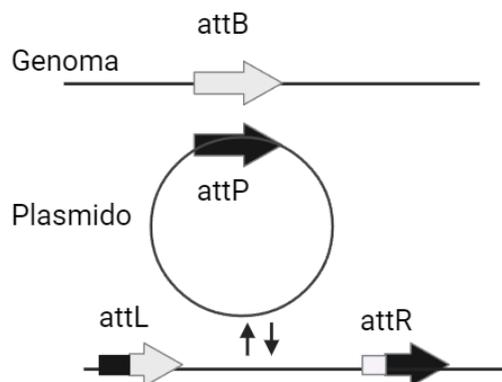
La primera generación de vectores replicativos entre *E.coli* y *Mtb*, incluían fagos y plásmidos temperados, y se usaron para demostrar la viabilidad de transformar el ADN en *M. smegmatis* y BCG. Sin embargo, se encontró que a partir del plásmido pAL5000 (aislado de *M. fortuitum*) se podía realizar una segunda generación de vectores extracromosomales. de aquí se origina pMV261, en el que al eliminar sitios indeseables de restricción generó un vector con mayor estabilidad. pMV261 es un vector replicativo, multicopia, extracromosomal, que contiene un gen que codifica para resistencia a Kanamicina y tiene un origen de replicación *E. coli* (oriE), también tiene un origen de replicación de micobacteria (oriM), un sitio múltiple de clonación y un terminador transcripcional. La expresión de proteínas en este vector está bajo el control del promotor *hsp60* o Proteína de choque térmico. Sin embargo, se ha reportado problemas en la expresión de proteínas utilizando este vector (C. K. Stover, 1991).

1.4.2 Plásmidos Integrativos en micobacterias

Los plásmidos integrativos contienen en su estructura sitios de inserción y adhesión a cromosoma que les permite incorporarse al cromosoma de la célula hospedadora, e

insertar genes de interés. En términos de laboratorio, estos plásmidos pueden ser diseñados para proliferar entre dos especies diferentes de células.

Figura 1-4-3: Gráfico ilustrativo sobre inserción de plásmido integrativo en el genoma generado por Biorender



En el caso específico de las micobacterias a partir del plásmido replicativo pMV261, se construyó el plásmido integrativo pMV361, reemplazando la región *oriM* (origen de replicación de micobacterias) con un fragmento de ADN que contiene un sitio de unión *attP* y el gen de la integrasa *int* del micobacteriófago L5 (Figura 1-4-3). Esto le confiere la capacidad de integración sitio específica con el sitio *attB* del cromosoma micobacteriano (B. Saviola, 2004).

1.4.3 Complementación de mutantes de *Mtb*

La complementación consiste en reintroducir una copia del gen tipo salvaje en una cepa mutante. Se trata de un fenómeno natural en el que por ejemplo dos cepas de un microorganismo con mutaciones diferentes recombinan sus genomas y se recupera el fenotipo salvaje.

En *Mtb* se han diseñado mecanismos para complementar mutantes defectivos utilizando plásmidos replicativos y plásmidos integrativos, con el fin de estudiar la función de los genes mutados. Existe gran variedad de mutantes de *Mtb* construidos mediante

recombinación homóloga, con fenotipos que van desde mutantes altamente atenuados hasta cepas virulentas. Estos requieren confirmación mediante cepas de complementación, donde se reintroduce la copia natural de un gen en la cepa mutante.

En la complementación de la cepa mutante, se debe garantizar que el fenotipo mutante se debe al gen reintroducido y no a mutaciones que puedan haber surgido durante la creación de la cepa mutante (Farahnaz Movahedzadeh, 2011), más cuando se realizan estudios en modelo animal y celular.

1.5 La proteína Ag85

El complejo antigénico Ag85 es importante en la patogenicidad de *Mtb*, y está formado por tres proteínas: Ag85A, Ag85B y Ag85C. Su función está involucrada en el ensamblaje de la pared celular, el mantenimiento de la envoltura bacteriana y la catálisis de la unión de ácidos micólicos al arabinogalactano. Por otra parte, se ha encontrado que Ag85A es importante para el crecimiento de la bacteria en condiciones de estrés nutritivo y adicionalmente se ha comprobado que es relevante durante el proceso de infección en la inhibición de la maduración del fagosoma y en el reconocimiento celular. (Babaki, 2017). El uso del promotor de la proteína Ag85 en la complementación de mutantes de *Mtb* ha mostrado mayor control en la expresión de las proteínas complementadas (Farahnaz Movahedzadeh, 2011).

1.6 Promotores

Un promotor es una secuencia corta de ADN que oscila entre 100 a 1000 pb. Por lo general, se encuentra directamente corriente arriba (extremo 5') del sitio de inicio de la transcripción, y le indica a la ARN polimerasa el sitio de inicio de la transcripción. Los promotores generalmente indican la direccionalidad de la transcripción (Yeh, 2019), y son muy importantes toda vez que regulan y controlan la expresión genética de los microorganismos. (Guglielmo C, 2016).

De acuerdo al funcionamiento, tipo y nivel de expresión genética observada, los promotores se pueden dividir así en: 1) promotores constitutivos, los cuales se expresan sin necesidad de regulación adicional a la interacción entre ARN polimerasa y el promotor, y que se caracterizan por su alta expresión dado a su estabilidad. 2) promotores inducibles, estos pueden activarse mediante diferentes estímulos, como señales químicas y físicas, o bajo condiciones de experimentos controlados en laboratorio. 3) Promotores sintéticos o quiméricos, los cuales se basan en la modificación de la reorganización, números de copia y distancia, Y permiten el control coordinado de múltiples genes. (Petolino, 2013)

En micobacterias, el uso de promotores como *hsp60* o promotor de la proteína de choque térmico, se puede inducir por aumento de la temperatura (G Batoni, 1998). Por otra parte, el promotor Ag85A usando en la construcción de plásmidos integrativos, es constitutivo y controla una de las familias de proteínas secretadas más importantes de *Mtb* (Farahnaz Movahedzadeh, 2011).

1.7 ATPasas

Las ATPasas son una familia de proteínas de membrana que cataliza la hidrólisis del adenosin trifosfato (ATP) en adenosin monofosfato (ADP) y fosfato con la consecuente generación de energía que es aprovechada por la célula. las ATPasas juegan un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis iónica, dado que median la generación de gradientes electroquímicos utilizados para el transporte activo secundario de algunos metabolitos. También se encargan del transporte de iones inorgánicos esenciales para el desarrollo de diferentes funciones fisiológicas, el control del volumen celular mediado por la osmolaridad del K^+ , además del exporte de toxinas y desechos celulares. (Futai, 2004)

Las ATPasas se agrupan en 4 tipos distintos que se diferencian en su función, estructura y el tipo de iones que transportan: ATPasas tipo F , que median la síntesis de ATP usando un gradiente de protones generado durante la oxidación de ciertos factores, las ATPasas tipo V que catalizan la hidrólisis de ATP para transportar protones al interior de algunos organelos y disminuir su pH respecto al del citoplasma, las ATPasas tipo P que utilizan la energía proporcionada por la hidrólisis del ATP para el transporte de una gran variedad

de iones y lípidos a través de la membrana biológica en contra del potencial electroquímico y los transportadores ABC (por sus siglas en inglés cassette de unión a ATP) los cuales transportan una variedad de sustratos como aminoácidos, múltiples drogas y otros xenobióticos acoplado a la hidrólisis de ATP. (Futai, 2004)

1.7.1 ATPasas tipo P

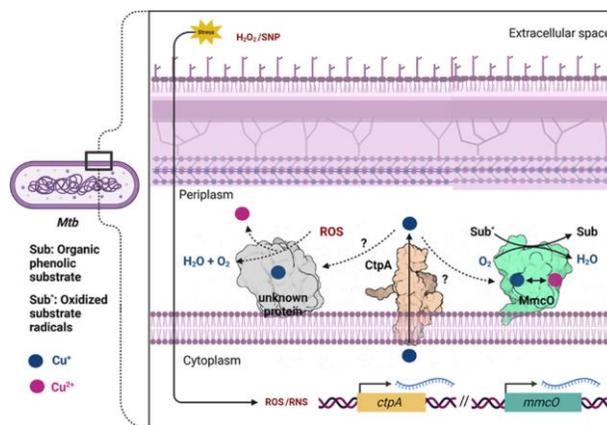
Son una superfamilia ampliamente distribuida esenciales para toda forma de vida dado que interconvierten la energía metabólica en gradientes electroquímicos aprovechados en la captación de nutrientes, median la señalización celular, proveen los ligandos de las metaloenzimas, permiten mantener la compartimentalización celular en eucariotas (Palmgreen, 2011) y protegen la célula de las condiciones medioambientales hostiles, de especial interés en los procariontes. Su denominación tipo P se debe a la particularidad de estas enzimas a formar durante el ciclo catalítico un intermediario fosforilado en un residuo de aspartato dentro del motivo altamente conservado DKTGTLT. (Pedersen, 2007)

En el caso específico de las micobacterias, una vez es fagocitado el bacilo tuberculoso por el macrófago, se debe enfrentar a una serie de mecanismos que buscan su eliminación, entre los que se destacan: soportar la falta nutrientes vitales para el desarrollo del patógeno, la exposición directa a un ambiente tóxico con hidrolasas ácidas provenientes de los lisosomas, péptidos antimicrobianos, especies reactivas tóxicas de nitrógeno y oxígeno y el envenenamiento con iones metálicos pesados como Cu^{2+} o Zn^{2+} , lo que puede ser mediado por ATPasas tipo P (Pludderman, 2011)

1.7.2 ATPasas de *Mtb*

Mtb tiene ATPasas que le permiten sobrevivir en el ambiente intrafagosomal, encargadas del transporte de metales alcalinos/alcalinotérreos y pesados como: zinc, hierro, calcio, magnesio, cobalto, cobre y manganeso. Los genes de *Mtb* que codifican para estas ATPasas son: *ctpA*, *ctpB*, *ctpC*, *ctpD*, *ctpE*, *ctpF*, *ctpG*, *ctpH*, *ctpI*, *ctpJ* y *ctpV*.

Figura 1-4-4: Grafico de ATPasa *ctpA* de *Mtb* en especies reactivas de nitrógeno y oxígeno tomado de (M. López-R, 2023)



Se ha descubierto recientemente que CtpA es una ATPasa tipo P que tiene sensibilidad al estrés redox (M. López-R, 2023) y que esta proteína puede estar involucrada en la detoxificación de cobre en micobacterias (Torres A.L., 2015).

En otro estudio se encontró que el gen *ctpF* es una ATPasa que puede ser necesaria para mantener los niveles de calcio intracelular. Lo cual podría ser un objetivo potencial de atenuación para la obtención de vacunas de células vivas atenuadas, dado que afectar este mecanismo podría afectar la supervivencia de *Mtb* al interior de los macrófagos (M. Hoyos, 2022).

2. Justificación

El tratamiento de la TB suele ser complejo y prolongado, por lo tanto, requiere una adherencia estricta por parte de los pacientes. Se estima que entre 2000 y 2016 cerca de 53 millones de personas se curaron de la TB gracias a los tratamientos actuales, sin embargo, no deja de preocupar que 10 millones de personas contrajeron la enfermedad Y se produjeron más de 1 millón de muertes por TB en 2022 (WHO, 2023). Entre los desafíos para desarrollar nuevos tratamientos están la complejidad de la enfermedad, la farmacocinética y la aparición de resistencia a los fármacos diseñados contra *Mtb*. (J. Ernest, 2021)

A pesar de que existen 19 candidatos a vacunas antituberculosas, ninguno ha logrado demostrar una capacidad real para eliminar la enfermedad. Por lo tanto, se hace relevante elucidar como *Mtb* es un patógeno intracelular tan efectivo y así tener mejores estrategias para el control eficaz de la TB. (L Zhuang, 2023). Los mutantes atenuados de *Mtb* son una alternativa poderosa como candidatos a vacunas para reemplazar la BCG, toda vez que estas cepas conservan epítomos antigénicos que pueden producir respuestas inmunitarias prolongadas.

Algunos estudios sugieren que las ATPasas tipo P, son blancos promisorios para la atenuación, dado que aportan supervivencia de la micobacteria al interior del macrófago y a su vez servir de base para la construcción de candidatos a vacunas antituberculosas.

EL objetivo del presente es desarrollar una herramienta para la complementación de mutantes de *Mtb* utilizando plásmidos integrativos bajo el control de promotor de la proteína Ag85A, y de esta manera superar problemas observados por la expresión inadecuada de la proteína complementadas en mutantes de *Mtb* al desarrollar estudios en modelo celular y animal.

3. Hipotesis experimental

3.1 Hipotesis experimental

El uso de un sistema de complementación integrativo que permite la expresión de ATPasas tipo P bajo el control del promotor del Ag85 producirá una mejor recuperación del genotipo silvestre en la complementación de mutantes de *Mtb*.

3.2 Planteamiento del problema

Estudios previos han demostrado que la complementación de mutantes *Mtb* defectivos en ATP tipo P mediante el uso de plásmidos extracromosomales bajo el control del promotor de la proteína *hsp60* de *E. coli*, ha producido un aumento elevado de la transcripción génica en comparación con los niveles basales de proteínas que se dan en las cepas silvestres. Por lo tanto, se afecta la recuperación de los fenotipos silvestres en eventos de infección *in vitro* e *in vivo* y con ello la utilidad de estos sistemas para la evaluación de mutantes de *Mtb* con potencial uso vacunal.

Una alternativa es el uso de plásmidos integrativos que permita la expresión de las ATPasas tipo P con una mayor estabilidad en la expresión génica. Lo anterior plantea las siguientes preguntas de investigación:

- ¿Es posible complementar *Mtb* defectiva de ATPasas con un plásmido integrativo basado en el vector pMV361?
- ¿El uso de promotor Ag85A resultara más favorable que el promotor *hsp60* en un sistema de complementación integrativo de cepas mutantes defectivas en ATPasas tipo P de *Mtb*?

4. Objetivos

4.1 Objetivo principal

- Construcción de dos plásmidos integrativos para complementación de cepas mutantes de *M. tuberculosis* defectivas en ATPasas tipo P

4.2 Objetivos específicos

- Diseño y construcción de dos vectores de integración basados en el plásmido pMV361 que incluya los promotores auto inducibles *Ag85* y *hsp60* respectivamente.
- Clonación en los vectores construidos de los genes *ctpF* y *ctpA* que codifican para ATPasas transportadoras de Ca^{2+} y Cu^{+} de la membrana plasmática de las micobacterias.
- Complementación con los plásmidos recombinantes obtenidos de cepas mutantes de *M. tuberculosis* defectivas en las ATPasas CtpF y CtpA, y comprobación genotípica de la integración de los genes en el genoma.
- Determinación del nivel de transcripción de los genes integrados en las cepas de *Mtb* complementadas.

5. Materiales y métodos

Para llevar a cabo la presente investigación se desarrolló la siguiente metodología:

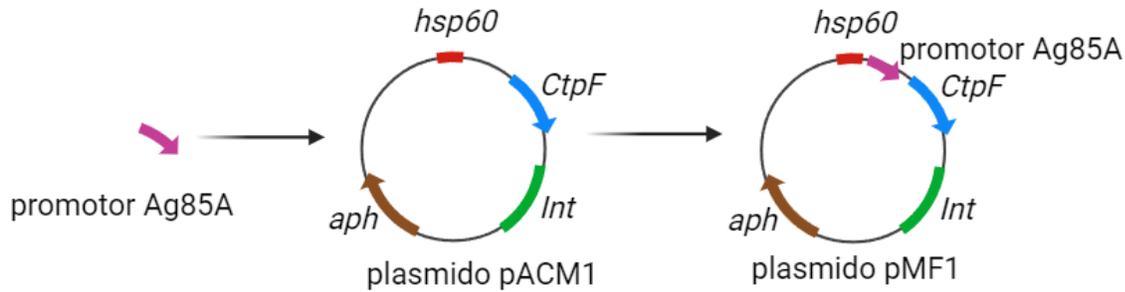
Primero, se revisaron los plásmidos integrativos desarrollados en trabajos previos de nuestro grupo de investigación con el objetivo de conocer su estado y viabilidad funcional. Dado que se planteó como objetivo la construcción de plásmidos integrativos para complementación de mutantes de *Mtb* defectivos en las proteínas CtpA y CtpF de *Mtb*, se desarrolló un plásmido integrativo partiendo del vector lanzadera pMV361 (*E. COLI* – MICOBACTERIA) y bajo el control del promotor Ag85A.

En un trabajo previo, el promotor de Ag85A se clonó en el vector de clonación de productos de PCR, pGEMTeasy, dando como resultado el plásmido recombinante pDSC1. El promotor amplificado fue extraído de pDSC1 mediante digestión con la enzima *MfeI* y se ligó en el vector pMV361 (plásmido integrativo de micobacterias), de esta manera se obtuvo el nuevo plásmido recombinante pDSC2, al que se le insertó el gen que codifica la proteína CtpA DE *Mtb*. pDSC2, y que contiene los siguientes elementos génicos: el promotor de la proteína Ag85A, el gen de resistencia a Km, el gen *ctpA*, un origen de replicación de *E.coli*, un sitio de *attP*, el gen *Int* del micobacteriófago L5 y un sitio múltiple de clonación, (Gomez, 2021). En este trabajo se utilizó este sistema para la complementación de *Mtb* defectivo en el gen *ctpA*.

Con base en lo anterior se planteó la estrategia experimental (Figura 5-2-1)

Por otra parte, mediante análisis *in silico* con el software SNAPGENE se diseñó un plásmido integrativo basado en pMV361 insertando el gen de la ATPasa *ctpF* bajo el control del promotor de la proteína Ag85A. Para lo cual se tomó como base el plásmido pACM1, el que contiene el gen *ctpF* en el plásmido integrativo pMV361, desarrollado en nuestro grupo de investigación (Cruz, 2021). (Figura 5-1-1)

Figura 5-1-1: Diseño *in silico* de la inserción del plasmido generado en Biorender



Por lo tanto, en el componente experimental del presente trabajo, el promotor de Ag85A se extrajo del plásmido pDSC1 mediante corte con la enzima *MfeI*, Y se ligó en el vector recombinante pACM1 cortado con la misma enzima, obteniendo así un nuevo plásmido, pMF1, bajo el control del promotor Ag85.

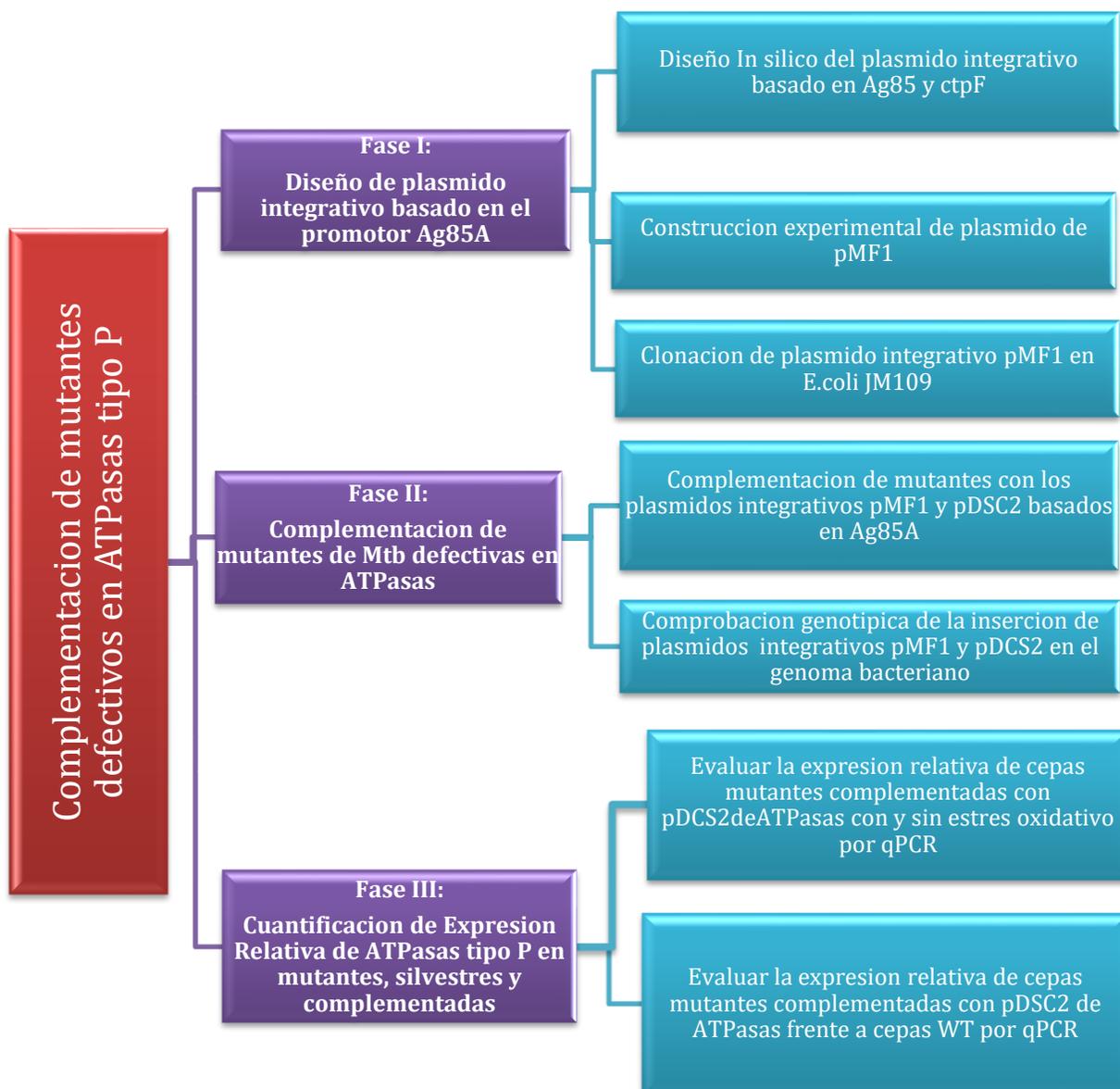
pMF1 se transformó en *E. coli* JM109, y mediante PCR de colonia se tamizaron colonias transformadas con el vector donde el promotor estuviera orientado en la direccionalidad correcta. A partir de las colonias seleccionadas se prepararon stocks glicerizados, que se mantuvieron a -80°C hasta su uso.

A continuación, a partir de un cultivo en Lb-Km de la cepa recombinante (*E. coli* JM109::pMF1), en fase logarítmica se recuperó el plásmido pMF1. Con el cual se procedió a realizar la transformación de bacterias de *MtbH37Ra* Δ *ctpF* electrocompetentes. La integración del vector en el genoma de la cepa mutante se verificó por PCR haciendo uso de un oligonucleótido que anilla en la región del genoma corriente arriba o abajo del locus de integración y otro que anilla en la región interna del gen *ctpF* integrado en el genoma bacteriano. Por otra parte, siguiendo un procedimiento similar con el plásmido pDSC2 se realizó la complementación del mutante defectivo en la ATPasas tipo P *ctpA* (*Mtb H37Ra* Δ *ctpA*).

Con el fin de comparar el efecto de los promotores *Hsp60* y Ag85 en la transcripción de los genes complementados en de mutantes defectivos de Mtb EN ATPasas tipo P, mediante RT-qPCR se cuantificaron los niveles relativos de *ctpA* en las cepas complementadas *Mtb H37Ra* Δ *ctpA*::pDSC2 y *Mtb H37Ra* Δ *ctpA*::pML13 (Lopez-Ruiz 2023) sometidas a un estrés previo a la extracción de RNA con H_2O_2 4Mm para inducir la expresión de *ctpA*

Finalmente se realizó un análisis estadístico usando el programa GraphPad Prism 9.0. Para determinar si existía significancia estadística entre los grupos experimentales se usó un análisis t student de muestras independientes, $P < 0,05$.

Figura 5-2-1: Estrategia experimental desarrollada para la ejecución de los objetivos planteados



5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Las células usadas tanto de *E. coli* como *Mtb* se conservaron con glicerol con una concentración de 20% v/v a -80°C. Los medios de cultivo y el material de vidrio para el desarrollo de los experimentos se esterilizaron en autoclave a 121°C por 15 min, adicionalmente los antibióticos se filtraron empleando jeringas de 10mL y filtros de membrana con conexión luer lock con poro de 0.22 µm.

E.coli JM109 se cultivó en agar LB (LURIA-BERTANI) o caldo LB durante 24 horas a 37°C en una incubadora con agitación a 80 RPM. Para seleccionar las células según cada paso de la metodología se adicionaron previamente en los medios los siguientes antibióticos: Ampicilina a 100 µg/mL (Amp), Kanamicina a 5 µg/mL (Kan) y higromicina a 100 µg/mL de (Hyg).

Tabla 5-1. Cepas bacterianas utilizadas. Características de las cepas de *Mtb* y *E.coli* usadas en el presente trabajo

Cepa	Características	Referencia/Fuente
<i>E. coli</i>		
JM109	recA- y endA lo cual minimiza la recombinación y confiere alta calidad del ADN plasmídico, alta eficiencia de clonación 108 ufc/ug (Hanahan, 1985)	Promega
<i>Mtb</i>		
H37Ra	<i>Mtb</i> atenuada de referencia, Amp ^R , Chx ^R	ATCC25177
H37Ra:pJV53	Cepa de recombineria (transformada con pJV53), Kan ^R	(Hoyos M. , 2021)
H37Ra:pJV53Δ <i>ctpF</i>	Mutante del gen <i>ctpF</i> (reemplazado por casete de Hyg), contiene el plásmido pJV53, Kan ^R , Hyg ^R	(Hoyos M. , 2021)
H37RaΔ <i>ctpF</i>	Mutante del gen <i>ctpF</i> (reemplazado por casete de Hyg ^R),	(Hoyos M. , 2021)
H37RaΔ <i>ctpA</i>	Mutante del gen <i>ctpA</i> (reemplazado por casete de Hyg ^R),	
H37Ra:pML13Δ <i>ctpA::ctpA</i>	Mutante complementado con el plásmido pML13 (pmv361 + <i>ctpA</i>), Hyg ^R , Kan ^R	(Lopez, 2019)
H37Ra:pDSC2Δ <i>ctpA::ctpA</i>	Mutante complementado con el plásmido pDSC2 (pmv361+ promotor Ag85a + <i>ctpA</i>), Hyg ^R , Kan ^R	Este estudio
H37Ra:ACM1Δ <i>ctpF::ctpF</i>	Mutante complementado con el plásmido pACM1 (pmv361 + <i>ctpF</i>), Hyg ^R , Kan ^R	(Cruz, 2021)

H37Ra.pMF1 Δ ctpF::ctpF	Mutante complementado con el plásmido pMF1 (pmv361+ promotor Ag85a + ctpF), Hyg ^R , Kan ^R	Este estudio
--------------------------------	---	--------------

Los cultivos de *Mtb* se realizaron en medio Middlebrook 7H9 y 7H10 suplementados con 0.5% de glicerol y 10% OADC (25 μ g/mL ácido oleico, 0,5 % albumina, 0,2 % dextrosa y 0,004 % catalasa) o OAD (25 μ g/mL ácido oleico, 0,5 % albumina y 0,2 % dextrosa) dependiendo el caso. Adicionalmente se suplemento con antibióticos según selección ciclohexamida 10ug/mL, amp 100 ug/mL, kan 20 ug/mL y/o 50ug/mL de Hyg .

Para la preparación del medio de cultivo Middlebrook se usó frascos de vidrio con tapas plásticas resistentes a temperaturas de esterilización a 121°C por 15 min. En cuanto a la suplementación con OADC se usó solubilización en bajas temperaturas de -20°C y se filtró este suplemento con jeringa de 10 mL y filtros de membrana de 0.22 μ m, posteriormente se adicono el suplemento en una cabina de flujo laminar.

Tabla 5-2. Medios de cultivo

Medio	Características	Referencia
Middlebrook 7H9 y 7H10	Sulfato de amonio, 0,50, Fosfato disódico, 2,50, Fosfato monopotásico, 1,00, Citrato de sodio, 0,10, Sulfato de magnesio, 0,05, Cloruro de calcio, 0,0005, Sulfato de zinc, 0,001, Sulfato de cobre, 0,001, Citrato férrico de amonio, 0,04, L-Ácido glutámico, 0.50, Piridoxina, 0.001, Biotina, 0.0005	Sigma Aldrich
LB Luria-Bertani	10 g de triptona, 5 g de extracto de levadura, 10 g de NaCl	Sigma Aldrich

5.2 Oligonucleótidos y vectores

Los vectores previamente obtenidos y los construidos en el presente trabajo, se relacionan en la tabla 5-3. Los plásmidos se extrajeron de *E. coli* usando el Kit Plasmid Extraction MiniKit (Favorgen) y se cuantificaron en un NanoDrop™ One^C (Thermo Scientific). Los oligonucleótidos utilizados en los experimentos de PCR se encuentran en la tabla 5-4.

Tabla 5-3. Plásmidos usados para el desarrollo de este trabajo.

Plásmido	Características	Referencia
pJV53	Vector derivado de pLAM12 con los genes 60 y 61 de Che9c clonados bajo el promotor acetamidasa, OriM, Kan ^R	Unizar, (van Kessel and Hatfull, 2007)
pML13	Vector pMV361 con el gen de la ATPasa ctpA bajo regulación del promotor <i>HSP60</i> . Resistencia a Kanamicina.	(Lopez, 2019)
pDSC1	Promotor de la proteína Ag85A clonado en pGEMT-Easy. Resistencia a Ampicilina.	(Gomez, 2021)
pDSC2	Vector pMV361 con el gen de la ATPasa ctpA bajo regulación del promotor de la proteína Ag85A. Resistencia a Kanamicina.	(Gomez, 2021)
pACM1	Vector pMV361 con el gen de la ATPasa ctpF bajo regulación del promotor <i>HSP60</i> . Resistencia a Kanamicina.	(Cruz, 2021)
pMF1	Vector pMV361 con el gen de la ATPasa ctpF bajo regulación del promotor de la proteína Ag85A. Resistencia a Kanamicina	En este estudio

Los cebadores u oligonucleótidos usados para PCR fueron diseñados teniendo en cuenta un tamaño entre 18-27pb, el porcentaje de guanina citocina entre 50-60% y la temperatura de fusión (T_m) entre 57-63°C. (Tabla 5-4)

Tabla 5-4. Cebadores usados en la investigación.

Oligonucleotidos	Secuencia (5'-3')
Comp-int_dir	GGACCGTACGAAGATGAACAA

Bol2013	CGAAGCGTTCTAGTCGTTGG
pMVcomp_down	TATTTGATGCCTGGCAGTCG
ctpF-interno-dir	CTATGCACCCGACGTCCT
pMVcomp_up	CAGCGAGGACAACCTTGAGC
ctpF-interno-rev	GAACCTGGTATCACGTTTTTCG
<i>GlyV - dir</i>	GCGGGCGTAGCTCAATGG
promAg85Afw	TTTTACAATTGAGCCGGCACTAG
promAg85Arev	TTTTCAATTGGCTCCCTCATCCT
Ext_int Dir	TTACCGCCTTTGAGTGAGCT
Ext_int Rev	GGTTGACGTATGAGGCTTGG
LipP_rev	CCTTGATGTCAGGCTGATTC
<i>HSP60 Dir</i>	CGACCATTTACGGGTCTTGT
27F	AGAGTTTGATCCTGGCTCAG
1492R	GGTTACCTTGTTACGACTT

6. Experimentos

6.1 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Para los experimentos de PCR se utilizó la enzima Superhot Taq polimerasa, que corresponde a una mezcla optimizada de taq adn polimerasa y anticuerpos monoclonales, útil para evitar productos no específicos y dímeros de primer. Los amplímeros más extensos se obtuvieron con Polimerasa Dream Taq

Las PCRs se realizaron a volumen final de 25 μ l, conteniendo: buffer, 1 μ M de oligonucleotidos, dNTPS 100 μ M, 10 a 100 nanogramos de ADN molde, 1 unidad de polimerasa y agua desionizada estéril.

Se estableció como condiciones de PCR para cada ciclo: desnaturalización a 94° por 10 min, luego 35 ciclos que incluían desnaturalización (94 °C, 30 s), anillaje (T_m dependiendo el oligonucleótido entre 50-60°C, 30 s) y extensión (72 °C, 1 min por cada 1000 pb) y después una extensión final a 72 °C por 10 min y finalmente un enfriamiento a 4 °C.

Para la realización de PCR de hervido (directamente de colonias sin previa purificación de ADN), se resuspendió la colonia en un eppendorf conteniendo 100 μ l de agua estéril desionizada, se agito, se selló con Parafilm y se calentó entre 84-85°C durante 40 min Posteriormente se centrifugo a 15000 rpm por 5 min para recuperar el pellet celular. Después se lavó con 500 μ l de agua estéril, se centrifugó y se resuspendió con 50 μ l de agua estéril previo a la reacción de PCR.

Luego de la reacción de PCR, los amplímeros obtenidos se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y 2% (dependiendo del tamaño del fragmento en buffer 1X TAE (40 mM Tris Acetato, 1 mM ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 8,0), suplementado con HydraGreen™ para identificar bandas. El tamaño de las bandas se identificó con ayuda de los marcadores de peso molecular 1 Kb ó 100 pb (SM0311 o SM0241; Thermo Scientific) Y (Generuler de 1 Kb), dependiendo del tamaño del amplímero.

Tabla 6-1. Tabla de primers usados en PCR.

Producto para comprobación	Molde	Iniciadores	Amplimer o (pb)	35 ciclos			Elongación
				Desnt.	Anilla	Elong	
Direccionalidad adecuada de Ag85A	pACM1 y A	promAg85Afw d - Bol2013	377pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 10min
Direccionalidad incorrecta de Ag85A	pACM1	promAg85Arev - Bol2013	377pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 10min
Confirmación de 16S <i>E.coli</i>	ADN de <i>E.coli</i>	27F -1492R	1500 pb	94°C 30 seg	55°C 30 seg	72°C 1'30 min	72°C 10min
Comprobación de ctpF, Ag85A y HSP60	pACM1	HSP60Dir-Bol2013	735 pb	94°C 30 seg	57°C 30 seg	72°C 30 seg	72°C 10min
Comprobación de dirección de plásmido integrativo en genoma	ADN Mtb H37Ra:pMF1ΔctpF: :ctpF y H37Ra:pDSC2Δctp A:ctp:A	GlyVdir-ExtIntDir	512pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 40 seg	72°C 10min
Comprobación de dirección de plásmido integrativo en genoma	ADN Mtb H37Ra:pMF1ΔctpF: :ctpF y H37Ra:pDSC2Δctp A:ctp:A	ExtIntrev-LipPrev	302pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 40 seg	72°C 10min
Comprobación de dirección de plásmido integrativo en genoma	ADN Mtb H37Ra:pMF1ΔctpF: :ctpF	Bol2013-LipPrev	2300pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 2'10 min	72°C 10min
Comprobación de dirección de plásmido integrativo en genoma	AND Mtb H37Ra:pDSC2Δctp A:ctp:A	LipPrev-ctpASec1	2409pb	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 2'30 min	72°C 10min
Comprobación de dirección de plásmido integrativo en genoma	ADN Mtb H37Ra:pDSC2Δctp A:ctp:A	LipPrev-ProAg85ARev	2160	94°C 30 seg	58°C 30 seg	72°C 2'0 min	72°C 10min

Los controles negativos fueron los medios de cultivo principalmente sin presencia de bacteria o ADN. En cuanto a los controles positivos, se usó plásmidos que ya se conocían sus fragmentos por PCR.

6.2 Digestión y ligación de ADN con enzimas de restricción

Para el análisis de la integridad de los plásmidos se realizó su digestión con las enzimas de restricción *PstI*, *Sall*, *MfeI* y *BamHI*. Las reacciones se realizaron a un volumen final de 20 μ l, conteniendo 2 μ l de Fast Digest 10X, 10 μ l de plásmido 1500ng/ μ L, 1 μ L de la enzima de restricción de interés a 10mg/mL y 7 μ l de agua destilada estéril. Estas reacciones se incubaron a 37 °C durante 35 min o 1 hora con 35 min dependiendo la enzima de restricción. Los fragmentos de la digestión se verificaron con electroforesis en gel de agarosa al 1 %.

Para las ligaciones, se configuro una rampa de temperatura en termociclador de la siguiente manera: 16°C por 90 min, 21°C, por 30 m, 22°C por 45 min, 23°C por 30 min y temperatura de finalización de 16°C. Realizando este ciclo durante 16 horas

6.3 Extracción de ADN genómico de *Mtb* por método CTAB-NaCl / proteinasa K

10 mL de cultivo hasta fase logarítmica (Verificado en NanoDrop™ One^C, con densidad ocular OD₆₀₀ entre 0.5 y 1), se centrifugaron a 15000 rpm por 15 min a temperatura ambiente y se descartó el sobrenadante. Luego se lavó el pellet celular con 10 mL de agua desionizada estéril, nuevamente se centrifugo a 8500 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante. Se resuspendio el pellet celular en 50 μ l de buffer 1X TE (25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA, pH 8,0), se transfirió a un eppendorf y se calentó a 85°C durante 30 min. Posteriormente se añadieron 50 μ l de lisozima a una concentración de 10 mg/mL, se mezcló suavemente y se dejó incubar a 37°C por 4 h.

Para la remoción de proteínas y ARN, se añadieron 80 μ l del tensoactivo dodecil sulfato de sodio (SDS) y se mezcló con suavidad. Después se adicionaron 30 μ l de proteinasa K a 10 mg/ml, se mezcló por inversión y se incubo a 65°C por 1 hora. Luego se adicionaron 125 μ l de NaCl 4M, y se agregaron 100 μ l de CTAB/NaCl precalentado a 65°C. Se mezclo

por inversión hasta obtener una suspensión blanca y se incubó a 65°C por 45 min. Posteriormente para la separación de fases se adicionaron 500 µl de cloroformo: alcohol isoamílico 24:1, y se mezcló por inversión. Se centrifugo a 13000 rpm durante 10 min. La fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo y se adicionaron 100 µl de buffer TE 1X. Se adicionaron 2 µl de ARNasa a 20mg/mL y se dejó incubando a 37°C durante 15 min. Se repitió la extracción con cloroformo: alcohol isoamílico adicionando 500 µl de este a la fase acuosa tratada con ARNasa, se mezcló por inversión, se centrifugo a 13000 rpm durante 10 minutos y se transfirió a un nuevo microtubo.

El ADN se precipito añadiendo 100 µl de Acetato de sodio 3M al microtubo tratado con ARNasa, y 1 volumen de Isopropanol. Se homogeneizo por inversión y se dejó incubar a -20°C durante 2 h. Posteriormente se centrifugo a 13000 rpm a 4°C por 15 min y se descartó el sobrenadante. Al pellet resultante se le adiciono 1 mL de etanol absoluto y se dejó encubar a -20°C por una hora. Se centrifugo a 13000 rpm 4°C por 15 min y se descartó el sobrenadante. Se adiciono al pellet 1mL de Etanol al 70% para lavar el ADN, se agito mediante vortex y se centrifugo a 13000 rpm a 4°C por 15 min. Se dejo secar el pellet y se descartó el sobrenadante, se secó a 37°C por 30 min. Se resuspendio el pellet de ADN en 200 µl de buffer TE 1X y se encubo a 37°C por 10 min para disolver el pellet. Finalmente se midió concentración en NanoDrop™ One y se verifico integridad por electroforesis en gel de agarosa 1%.

6.4 Preparación y electroporación de células electrocompetentes de *E.coli* JM109

5 mL de un cultivo en fase logarítmica de *E.coli* JM109 se inocularon en 40 mL de LB, el que se incubó a 37°C hasta fase logarítmica (4 h aproximadamente). Luego se centrifugo a 4°C por 15 min a 8500 rpm. Se descartó el medio a 4°C, se resuspendio en 40 mL de agua desionizada a 4°C y nuevamente se centrifugo a 4°C por 15 min a 8500 rpm. Se resuspendio el pellet resultante en 20 mL de glicerol a 10%, se descartó el sobrenadante, y se resuspendio 5 veces mas hasta terminar de lavar .Las células finalmente se resuspendieron en 1 ml de glicerol al 10%. Se utilizaron 50 µl de suspensión celular para electroporación en microtubos preenfriados a 4°C, a la suspensión celular se le añadieron

3 μ l de reacción de la ligación, y la electroporación se realizó mediante un pulso de 25 μ F, 2.5 kv y 200 Ω . Las células electroporadas se incubaron a 37°C con agitación (80 rpm), Y finalmente se plaquearon 200 mL de las células electroporadas en agar LB.

6.5 Complementación de *Mtb* por electroporación con plásmidos

A partir de stocks glicerinados se necesitaron obtener inicialmente células electrocompetentes de las cepas mutantes de *Mtb* defectivas en los genes *ctpA* y *ctpF* (sin pJV53). Para ello, 50 mL de cultivo de micobacterias en Middlebrook 7H9 -OADC se incubaron a 37°C con agitación (80 rpm) por 3-4 semanas. Una vez se alcanzó un OD₆₀₀ de 0,8- 1, se realizó la activación del cultivo añadiendo 6 mL de Glicina al 2M, y se mantuvo a 37°C y agitación (70 rpm) durante 10 a 24 horas más.

Bajo condiciones estériles, el cultivo fue transferido a tubos de centrifuga y las células fueron colectadas por centrifugación a 8500 rpm por 15 min; el sobrenadante fue descartado cuidadosamente. A continuación, las células se lavaron de forma consecutiva con glicerol al 10% en agua desionizada con 1x, 1/2x, 1/4x, 1/8x, 1/10x y 1/25x del volumen inicial de cultivo, centrifugando a 8500 rpm entre cada lavado para recuperar el pellet celular. Seguidamente, la suspensión celular se transfirió a un microtubo y se centrifugo a 10000 rpm, se descartó el sobrenadante y se resuspendió en 1 mL de glicerol al 10%. A partir del cual, se realizaron alícuotas de 100 μ L de la suspensión celular que se usaron inmediatamente, o se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

Para la transformación por electroporación, una alícuota de la suspensión celular previamente obtenida, se mezclaron con 4 μ L del ADN plasmídico. La mezcla se transfirió al fondo de la cubeta de electroporación de 1 mm de diámetro y se insertó en el electroporador. Seguidamente, se permitió el paso de un pulso controlado de corriente de 25 μ F, 2,5 kV y 1000 Ω entre 25 ms, e inmediatamente se agregó a la cubeta 1 mL de medio de cultivo 7H9-OADC. Luego, toda la suspensión celular se transfirió a un tubo de centrifuga estéril de 15 mL, y se incubo a 37°C por 24h. A continuación, 100- 200 μ L del producto de transformación se plaqueó en una caja de cultivo con medio solido 7H10-

OADC suplementado con el antibiótico de selección Km. Finalmente, las cajas de cultivo se incubaron a 37 °C hasta por 3-4 semanas hasta que se obtuvieron colonias visibles. Como control de transformación se utilizaron un control negativo, utilizando agua desionizada en lugar de ADN, y como control positivo un plásmido no replicativo de *Mtb* con casete de resistencia a Km (pML01).

6.6 Extracción de ARN de *Mtb* por método de Trizol

Con el fin de evitar la degradación del ARN, el protocolo de extracción descrito a continuación se realizó en una cabina de flujo laminar, durante todo el procedimiento se utilizó tapabocas, guantes y bata. Previamente, las superficies y el exterior de todo el material a usar se limpiaron con NaOH 0,4 M, y en la medida de lo posible se utilizaron puntas con filtro nuevas, libres de RNAsas. Todo el material se esterilizó con dos ciclos de autoclave.

Inicialmente, a partir de un cultivo de 10 mL de las cepas micobacterianas requeridas crecido hasta fase logarítmica, se inocularon por separado 300 mL de 7H9-OADC que se incubó a 37°C y 70 rpm hasta llegar a fase estacionaria (OD_{600} 0.6-0.8). Luego, por centrifugación a 7600 rpm durante 15 min a temperatura ambiente se recuperó el total del pellet celular dividido en dos alícuotas. Con el fin de retirar los restos de albumina, cada una de las alícuotas del pellet se lavó tres veces con 15 mL de 7H9, y se resuspendieron en el mismo volumen de 7H9-OAD. Seguidamente, en una de las alícuotas se adicionó, en condiciones estériles, H_2O_2 a una concentración final de 4 mM, y en la otra alícuota en lugar del agente de estrés se adicionó el mismo volumen de agua desionizada. Los cultivos se transfirieron a botellas de vidrio estériles de 50 mL y se incubaron por 3h a 37°C y agitación de 70 rpm.

A continuación, para precipitar el ARN total, el pellet celular de cada cultivo se recuperó por separado mediante centrifugación a 7600 rpm a 4°C por 15 min. Las células se resuspendieron en 10mL de agua con dietilpirocarbonato (DEPC) y posteriormente se centrifugaron a 7600 rpm a 4°C por 15 min, se descartó el sobrenadante y se repitió el

lavado. Una vez se recuperó el pellet, se resuspendió en 1 mL de agua con DEPC y se transfirió a un microtubo, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 10 min y se descartó el sobrenadante. Luego el pellet se resuspendió en 1 mL de Trizol (tiocianato de guanidina, acetato de sodio y fenol) con 0.5 uL de Inhibidor de RNAasa (Thermo Scientific). Se adicionaron 100 uL de agua-DEPC, y el volumen total se transfirió a dos tubos O-Ring con 500 uL de perlas de zirconio. Seguidamente, la lisis celular se realizó mediante 6 pulsos de 1 min a máxima velocidad, intercalados por periodos de 1 min a 4°C tras cada pulso. La suspensión resultante, se centrifugó a 13000 rpm a 4°C por 10 min, y el sobrenadante se transfirió a un microtubo nuevo y rotulado según la cepa y la condición de estrés sometido previo a la lisis. A continuación, a cada microtubo se adicionaron 300 uL de cloroformo, los cuales se mezclaron con vortex durante 30 seg, y se incubaron durante 10 min a 4°C. Luego, se hizo una centrifugación a 13000 rpm durante 10 min a 4°C, y la fase acuosa se transfirió a un nuevo microtubo. Finalmente, se adicionó un volumen de Isopropanol y se incubó a -20°C por 8 horas.

Posteriormente, para lavar el ARN, cada muestra se centrifugó a 13000 rpm a 4°C durante 20 min, y se desechó el sobrenadante. Al pellet se le adicionaron 1 mL de etanol al 80% en agua DEPC, y se mezcló por vortex. Luego se hizo una centrifugación a 13000 rpm a 4°C durante 10 minutos, y se descartó el sobrenadante. Con el fin de asegurar la completa evaporación del etanol en la muestra, el pellet se dejó secar a temperatura ambiente dentro de la cabina de flujo laminar durante 10-20 minutos. Seguidamente, el pellet se resuspendió en 30 uL de agua DEPC, a partir del cual se tomó una alícuota de 2 uL para cuantificar en un NanoDrop™ OneC (Thermo Scientific) la concentración aproximada de ARN, el volumen restante de la muestra de ARN se almacenó a -80°C hasta su uso.

Por otro lado, con el fin de eliminar posibles contaminaciones de ADN genómico en las muestras de ARN, se le realizó un tratamiento con DNasa. Para ello, a 2000 µg de ARN extraído se les adicionaron 2 µL de buffer de reacción 10X y se completó a un volumen de 18 µL con agua DEPC. Luego, se agregó a la mezcla de reacción 2 µL de DNasa I (1 U/µL, Thermo Scientific). La mezcla se incubó a 37°C por 30 min, posteriormente se adicionaron 2 µL de EDTA (thermo Scientific) 25mM y se incubó a 65°C por 10 min.

Finalmente, para la síntesis de cDNA se utilizó el kit usando el kit RevertAid First Strand

cDNA Synthesis (Thermo Scientific), según las indicaciones del proveedor. Brevemente, el protocolo consistió en adicionar a 10 uL de ARN previamente tratado con DNAsas I, 1 uL de oligonucleótidos aleatorios 0.2 ug/mL, mezcla que se incubó a 65°C durante 5 min, y se colocó inmediatamente en hielo. Posteriormente, se adicionaron por muestra 9 uL de una mezcla compuesta por: 2 uL de agua DEPC, 4 uL de buffer 5X, 2uL de dNTPs 10mM y 1 uL de transcriptasa reversa. Finalmente, todo el contenido se mezcló con vortex por 10 s, y se incubó durante 10 min a 30°C. El ADNc se cuantificó, y almaceno a -20°C hasta su uso.

6.7 PCR en tiempo real

Estudios recientes han mostrado que la proteína CtpA, tiene actividad frente a estrés oxidativo, por lo cual se expusieron las cepas a peróxido de hidrogeno 4mM (M. López-R, 2023). Se realizó PCR en tiempo real en el equipo CFX96™ Real-Time PCR Detection System (BioRad) usando el software Bio-Rad CFX Manager Versión 1,6. Se mezclaron 1µL de ADNc (de 16ng/mL, 2,5 µL de Express SYBR® Green ER™ Universal (Invitrogen), 0,25 µL de cada primer (5 µM) y 1 µL de agua DEPC para completar un volumen de 5 µL de reacción. El programa de reacción incluyo: 95°C por 5 min, 40 ciclos de 95°C por 10 seg, 58°C por 10 seg y 72°C por 15 seg. Al final de cada reacción de PCR se realizó una curva de fusión de 72°C a 95°C con incrementos de 0,5°C cada 5 seg (rampa ajustada automáticamente por el equipo).

Las cuantificaciones de las PCR se realizaron por triplicado de la muestra y se incluye un control negativo (sin cADN/ADN por duplicado). Las curvas de eficiencia de reacción de los genes de estudio se verificaron en estudios previos (Hoyos M. , 2021). Los cADN se llevaron a una concentración similar para garantizar que se parte de la misma cantidad.

Luego, se cuantificaron los niveles de transcripción de los genes 16sARN (normalizador), y *ctpA* en las muestras de cADN descritas en la tabla 6-2, y se calcularon los valores de expresión relativa empleando el método Pfaffl (Pfaffl, 2019). Las cuantificaciones se

realizaron por triplicado en NANODROP e incluyeron un control negativo (sin adicionar cADN).

Tabla 6-2. Tabla de qPCR realizadas para cada cepa.

Cepa H37Ra	Condición de estrés	Concentración de cDNA ng/ul
<i>Mtb WT</i>	Sin condición	16.0
<i>Mtb WT</i>	4mM de H ₂ O ₂	16.0
<i>Mtb Δ ctpA::ctpA::pML13</i>	Sin condición	16.3
<i>Mtb Δ ctpA::ctpA::pML13</i>	4mM de H ₂ O ₂	16.2
<i>Mtb Δ ctpA::ctpA::pDSC2</i>	Sin condición	16.0
<i>Mtb Δ ctpA::ctpA::pDSC2</i>	4mM de H ₂ O ₂	16.1

- La eficiencia de 16S es 96% y la eficiencia de ctpA es 104%

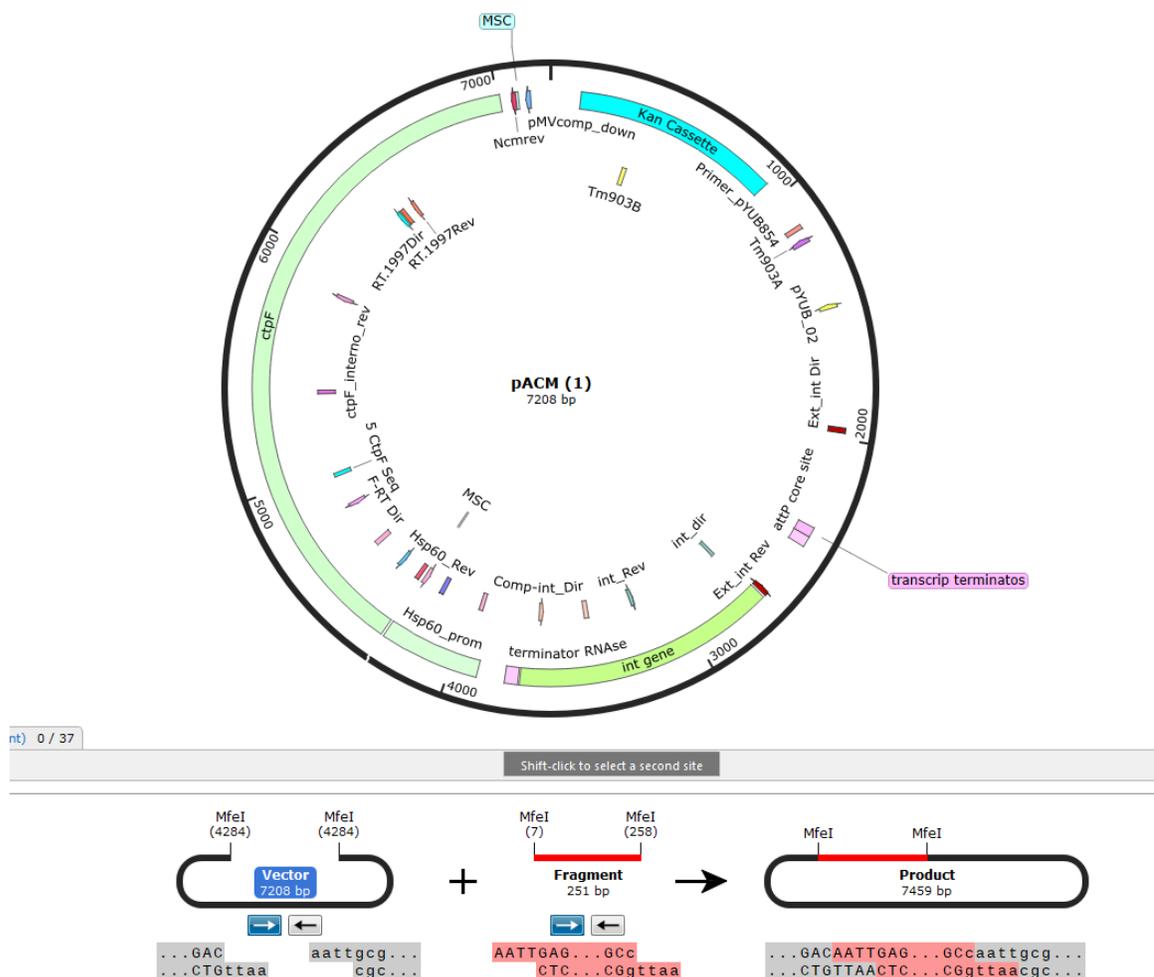
7. Resultados y Discusión

A continuación, se muestran los resultados obtenidos basados en los objetivos específicos planteados

7.1 Diseño y construcción del vector integrativo pMF1, bajo el control del promotor Ag85

El diseño del plásmido integrativo pMF1 se realizó utilizando el software SNAPGENE. Esta herramienta permitió incorporar la secuencia del promotor de la proteína Ag85A de forma semidirigida en el sitio de corte *MfeI* del plásmido pACM1 (previamente descrito, (Cruz, 2021), obteniendo se un plásmido de 7408 pb, que se denominó pMF1. El promotor *Ag85A* se insertó en sentido 5'-3' entre la secuencia del gen *CtpF* y el promotor *Hsp60*. No fue posible diseñar un plásmido eliminando el promotor *Hsp60*, toda vez que las posibilidades de corte con enzimas digerían el vector en varios fragmentos. (Figura 7-1-1)

Figura 7-1-1: Ligación de Ag85A en pACM1. Generado en SNAPGENE



Una vez obtenido el plásmido se evidenció que el promotor de Ag85A podría quedar en sentido 5'-3' o 3'-5' en el plásmido pMF1, esto debido a la inserción semidirigida homóloga, ya que los extremos del promotor *Ag85A* son iguales al realizar el corte con *MfeI*, lo que podría generar vectores con el promotor en la dirección contraria, y de esta manera la no

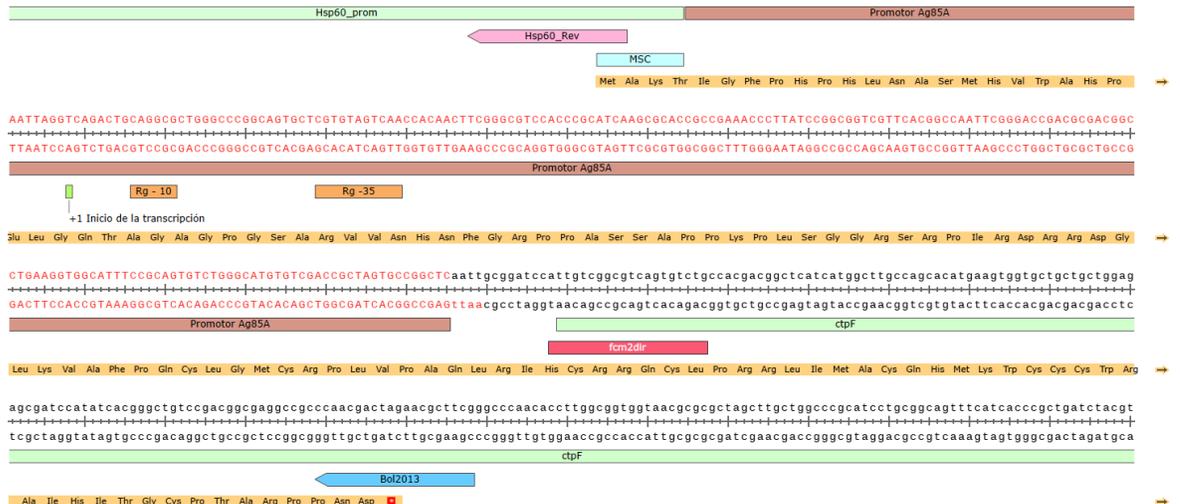
expresión de la proteína recombinante CtpF o la expresión de una proteína incorrecta en sentido contrario. (Figura 7-2-1)

Figura 7-2-1: Representación de pMF1 generado en SNAPgene



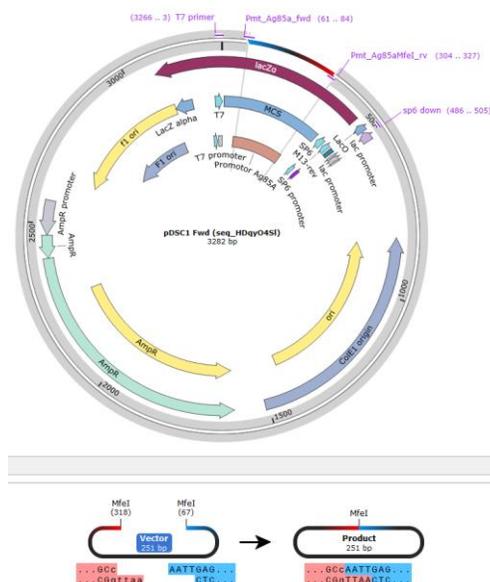
Por este motivo, se verifico de manera cuidadosa que el promotor *Ag85* quedara en marco de lectura con respecto al sitio +1 de la transcripción del plásmido para que la proteína recombinante se exprese en la dirección correcta. (Figura 7-3-1)

Figura 7-3-1: Gráfico de verificación de marco de lectura de *Ag85A* en el plasmido integrativo pMF1



Una vez generado el plásmido pMF1 *In silico*, el promotor *Ag85A* se extrajo desde el plásmido pDSC1 (previamente descrito (Gomez, 2021) mediante corte con la enzima de restricción *MfeI* (figura 7-4-1), y se ligó en los mismos sitios del plásmido integrativo pACM1 (previamente descrito, (Cruz, 2021), probando las relaciones vector:inserto: 1:3; 1:5 y 1:6.

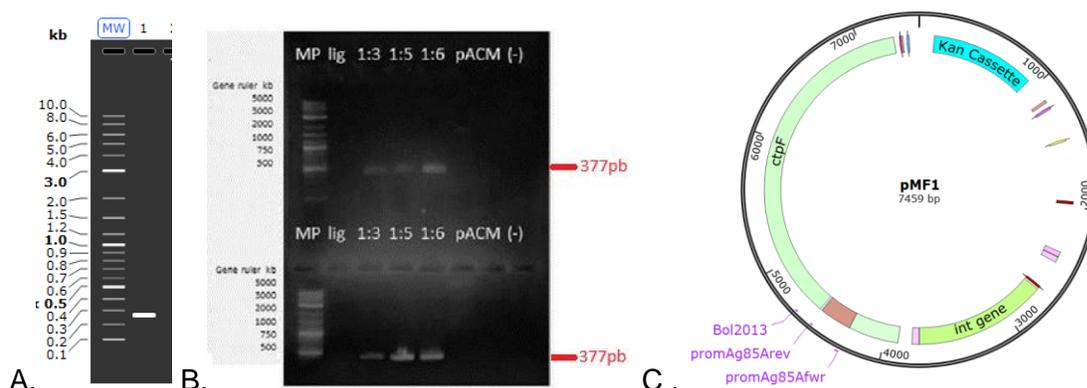
Figura 7-4-1: Representación de la digestión de pDSC1 con la enzima *MfeI*. Generado con SNAPGENE.



Antes de la transformación de las ligaciones en *E. coli*, la presencia en la ligación del vector con la dirección correcta del promotor *Ag85* se verificó mediante PCR del producto de la

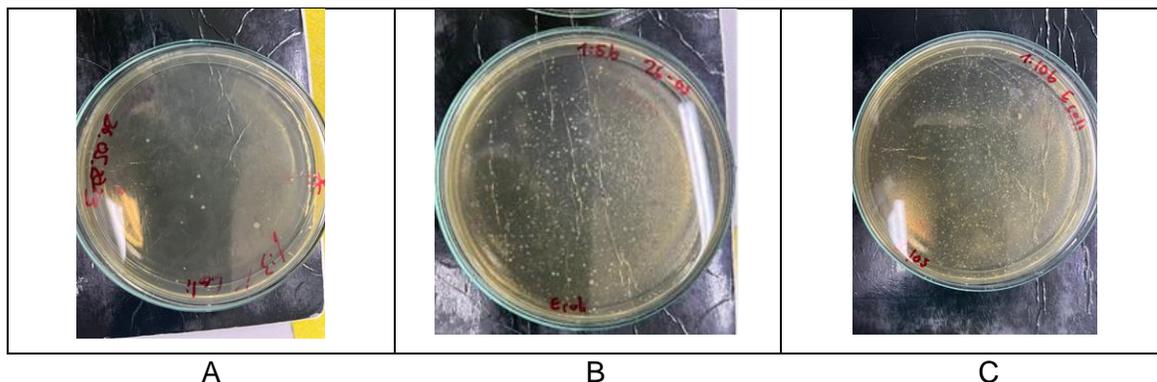
ligación utilizando los primer promAg85Afwd - Bol2013 y promAg85Arev - Bol2013, en las condiciones descritas de la Tabla 6-1. Los análisis *In silico* indican que en esa PCR se debía obtener un fragmento de 377 pb (Figura 7-5-1A). En todos los casos se obtuvo fragmentos cercanos a 400 pb, lo que resulta inconveniente por que sugiere que el promotor de la proteína Ag85A estaría presente en ambas direcciones en el plásmido integrativo pMF1, lo cual podría afectar durante la clonación y posterior transformación celular, dado que los fragmentos de la electroforesis con los dos juegos de primer son de los mismos tamaños, por lo que no se podría diferenciar (Figura 7-5-1B). Para lo cual se diseñaron primer para dirección correcta (promAg85Afwd - Bol2013) y dirección contraria (promAg85Arev - Bol2013).

Figura 7-5-1 Electroforesis del fragmento de pMF1 amplificado por PCR con los primers promAg85afwd - bol2013 y promag85arev - bol2013: A) Electroforesis *in silico* de PCR de pMF1 amplificado con promAg85Afwd - Bol2013. B) Arriba: Electroforesis de PCR promAg85Afwd - Bol2013, Abajo Electroforesis de PCR promAg85Arev - Bol2013 C) Ubicación de primers promAg85Afwd, Bol2013, promAg85Arev de plasmido pMF1. MP: Generuler 1kb plus



Se decidió transformar pMF1 en células electrocompetentes de *E.coli* JM109 utilizando las ligaciones de las relaciones vector:inserto 1:3, 1:5, 1:6 y 1:10. A partir de las placas de agar LB suplementado con Km, se seleccionaron 40 colonias recombinantes por sus características físicas como: color beige, forma redondeada de la colonia y rugosidad aparente. (Figura 7-6-1)

Figura 7-6-1: Cultivos de *E.coli* JM109 transformado con el plásmido pMF1 ligado en las siguientes proporciones: A) 1:3, B) 1:5, C) 1:10

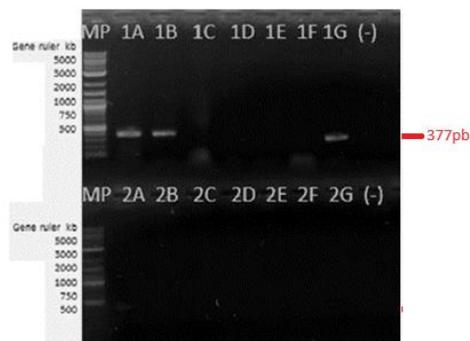


Dado que eran demasiadas colonias para analizar, se realizaron “pooles” de 6 colonias, los que se sometieron a hervidos de colonia (Anexo B). Los pooles lisados se analizaron mediante PCR con los oligonucleótidos promAg85Afwd - Bol2013 y oligonucleótidos promAg85Arev - Bol2013, con el objetivo de identificar colonias transformadas con el vector con el promotor en la dirección correcta (Figura 7-7-1)

Para saber la dirección correcta de la inserción de *ctpA* se usaron los primer promAg85Afwd - Bol2013, quienes debían dar una banda de 377pb, lo cual fue evidenciado para las colonias A B y G.

Para determinar si la dirección era incorrecta se usaron los primer promAg85Arev - Bol2013, los cuales no debían dar ninguna banda, porque si daba una banda significaría la dirección incorrecta, lo cual fue evidenciado en todas las colonias.

Figura 7-7-1 Electroforesis de PCR de Hervidos de pooles de colonias transformadas con pMF1 en diferentes proporciones amplificados. Arriba: PCR con los primers promAg85Afwd - Bol2013 con los pooles. Abajo PCR con los primers promAg85Arev - Bol2013. Carril (-): Negativo (medio sin colonia). MP: Generuler 1kb plus. Carriles A: pool de colonias 1 a 6, B: pool de 7 a 12, C: pool de colonias de 13 a 18, D: pool de colonias 19 a 24, E: pool de colonias de 25 a 30, F: pool de colonias de 31 a 36 y G: pool de colonias de 37 a 40.



Después de seleccionar los pools con la direccionalidad correcta del promotor Ag85A en el plásmido pMF1, se procedió analizar las colonias contendidas en esos pools por separado (Anexo C), mediante una PCR utilizando los primers promAg85Afwd - Bol2013 para evidenciar en las colonias tenían el sistema integrativo en el sentido correcto, en cuanto al promotor Ag85A en la dirección de marco de lectura.

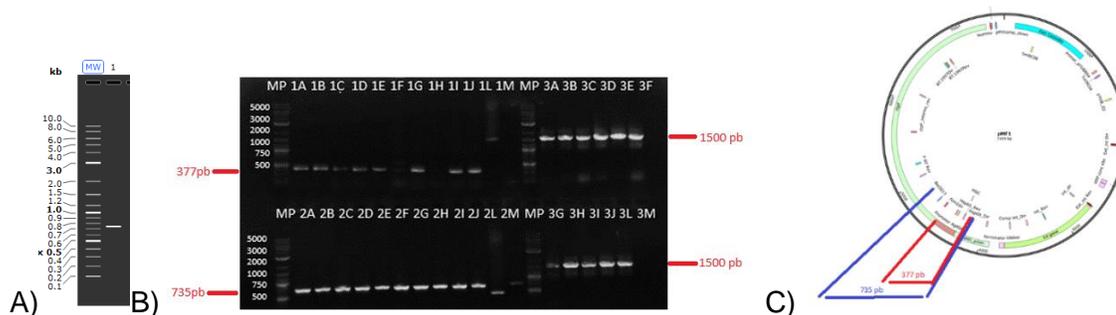
Posteriormente se identificaron las colonias 2, 5, 37 y 40 como que presentan las siguientes características: tienen un fragmento amplificado cercano a 400 pb haciendo referencia a la direccionalidad correcta del promotor Ag85A en el plásmido pMF1.

Además, se flanqueo una región flanqueando *ctpF* y el promotor *Hsp60* que debía dar *735pb*. Se evidencio un fragmento amplificado de aproximadamente 700 pb haciendo alusión a este fragmento, lo que confirma la inserción del promotor Ag85A en el plásmido pMF1 (Figura 7-8-1C).

Finalmente se diseñó una PCR para saber si se trataba de *E.coli* y no de falsos positivos, por lo cual se flanqueo el gen 16S de *E.coli* con los primer *27F* y *1492R*, los cuales dan una banda de 1500 pb cuando se trata de *E.coli*, se observa que todas las colonias presentan una banda alrededor de 1500 pb que significaría que se trata de *E.coli* al amplificar, esto no se puede ver con el plásmido porque es una región conocida del genoma de *E.coli*. Razón por la cual fueron seleccionadas las colonias 2, 5, 37 y 40. (Figura 7-8-1 A-C)

Figura 7-8-1: Electroforesis en gel de agarosa de colonias. A) PCR 1 con los primer promAg85Afwd - Bol2013, PCR 2 con los primer Bol2013 y HSP60, PCR 3 con los primer 27F y 1492R. Carriles: L: pACM1, M:

negativo. MP: Generuler 1kb plus. Carriles: A: Colonia 1, B: Colonia 2, C: Colonia 3, D: Colonia 4, E: colonia 5, F: Colonia 6, G: Colonia 37, H: Colonia 38, I: Colonia 39 y J: Colonia 40

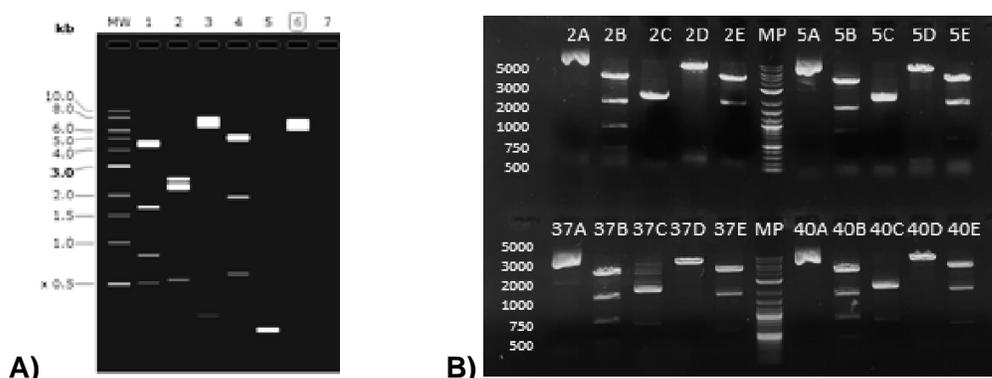


Se realizó un mapeo con las enzimas de restricción *PstI*, *Sall*, *MfeI* y *BamHI*. A las colonias 2, 5, 37 y 40 transformadas con pMF1, con el objetivo de corroborar la integridad de los plásmidos recombinantes seleccionados (Figura 7-9-1A). En el mapeo con *Sall* se esperaban bandas de 2261/2258/2168/772pb, sin embargo, se dificultaba el análisis toda vez que las 3 primeras bandas eran muy cercanas.

En cuanto a la digestión con *MfeI* se esperaban dos bandas correspondientes a 7208pb y 251pb (anexo D), se evidencio que todas las colonias tenían estas dos bandas por lo que no fue útil para seleccionar. Las colonias 5 y 40 se observaron bandas por encima de 3000 pb, que corresponde a un fragmente inesperado. En cuanto a *BamHI*: se obtuvieron tres bandas correspondientes a aproximadamente 5000pb, 2000 pb y 700 pb en todas las colonias (Figura 7-9-1B).

Se encontró que las bacterias recombinantes 2 y 37 mostraron los patrones esperados al cortar con *PstI* (Anexo D). Por lo tanto, se seleccionó finalmente la colonia 37 de *E. coli* JM109 transformada con pMF1 por que cumplía las características del plásmido y se descartó la colonia 2.

Figura 7-9-1: Análisis mediante electroforesis del mapeo por restricción con *PstI*, *Sall*, *MfeI* y *BamHI* de las colonias 2, 5, 37 y 40 de *E. coli* transformadas con pMF1. **A)** Digestión *In silico* generada en SNAPGENE, **B)** Digestión experimental de las colonias 2, 5, 37 y 40 Carriles: A. plásmido pMF1 sin digerir, B. Digestión con *PSTI*, C. Digestión con *Sall*, D. Digestión con *MfeI*, E Digestión con *BamHI*. MP: Generuler 1kb plus Carril: A: Plasmido pMF1, sin digerir, B: digestión del plasmido pMF1 con *PstI*, C: digestión del plasmido pMF con *Sall*, D: digestión del plasmido pMF con *MfeI* y E Digestion del plasmido con *BamHI*



7.2 Complementación de las cepas mutantes defectivas en ATPasas con los plásmidos pDSC2 y pMF1

Con el objetivo de contar con una complementación exitosa, inicialmente se procedió a remover el plásmido pJV53 de la cepa mutante *Mtb* H37Ra:pJV53 Δ *ctpF*, debido que este plásmido posee una resistencia antibiótica a la km. La resistencia antibiótica con km interferiría con el tamizaje de las cepas complementadas con pMF1, toda vez que este plásmido integrativo también contiene un gen de resistencia con este antibiótico para su selección, el que en el proceso de compensación se integra en el genoma de la cepa mutada. Para ello, se realizaron 5 pases seriados de *Mtb* H37Ra:pJV53 Δ *ctpF*. En medio de cultivo hasta obtener la cepa *Mtb* H37Ra Δ *ctpF*, utilizando selección con los antibióticos Kanamicina y Hygromicina contenidos en pJV53.

Obtenidas las bacterias defectivas en *ctpA* y *ctpF* desprovistas de pJV53, se procedió a realizar la complementación con el plásmido integrativo pDSC2 en el genoma de *Mtb* H37Ra Δ *ctpA* para obtener *Mtb* H37Ra:pDSC2 Δ *ctpA*:*ctpA*. Se utilizó la PCR con los primers GlyVDir-ExtIntRev para comprobar la integración génica (Figura 7-10-1B).

Para verificar la inserción sitio específica en el sitio attB de la bacteria, se buscaba flanquear a un fragmento de GlyV en el cual ocurre la inserción sitio específica del plásmido en la mico bacteria por recombinación homóloga de extremos en el cromosoma bacteriano.

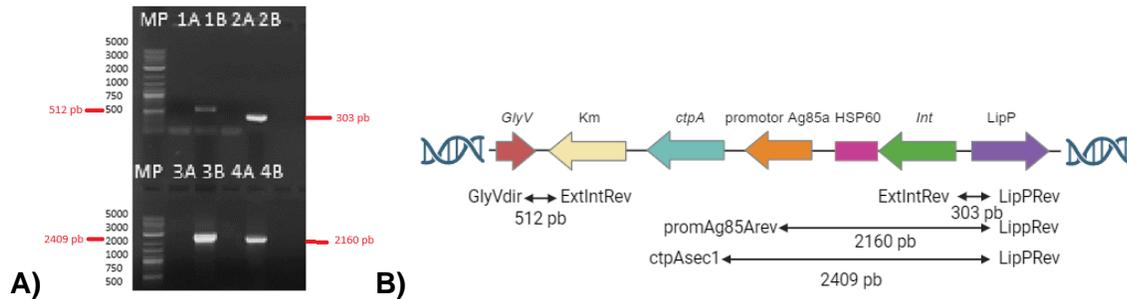
La recombinación homóloga ocurre entre los sitios *attP* del plásmido integrativo pMF1 y *attB* de la micobacteria *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*. En la figura 7-10-1A, se puede ver el fragmento de 512 pb obtenido con los primer GlyVDir-ExtIntRev que flanquean a GlyV y el gen *Int*, observando la direccionalidad correcta del plásmido y confirmando su inserción.

Al lado derecho del genoma en sentido 5'-3' se forma el sitio attL, donde está el gen de la lipasa P y el el gen *Int* del plásmido integrativo pMF1 (Figura 7-10-1), razón por la cual se buscó flanquear el gen con primers ExtIntRev-LipPRev, obteniendo un fragmento de 303 pb, el cual se puede ver observado en el carril 2B de la figura 7-10-1.

Para determinar si existía la inserción del gen *ctpA* en el genoma de *Mtb*, se desarrolló una PCR flanqueando con los fragmentos de *ctpA* y la lipasa P con los primers *ctpA*sec1-LipPRev, evidenciando un fragmento en el carril 3B de la electroforesis, el cual hace referencia a lo planteado con una extensión de 2409 pb (Figura 7-10-1B).

Finalmente se realizó una PCR que flanquea al promotor Ag85 A y la lipasa P, para corroborar la inserción del promotor en el genoma, esto se realizó con los primers LipPRev-ProAg85ARev para observar si en el genoma también resulto la inserción del promotor Ag85A, evidenciando una banda de 2160 pb, confirmando así que el plásmido contiene la direccionalidad correcta y esta insertado en el genoma bacteriano, dando como resultado la cepa complementada *Mtb* H37Ra:pDSC2 Δ *ctpA*:*ctpA*.

Figura 7-10-1: Electroforesis de PCR Comprobación de integración génica de plásmido pDSC2 en cepas mutantes de *Mtb* defectivas en *ctpA* carriles. A) A. Negativo B. ADN bacteriano PCR1 de GlyVDir-ExtIntRev, PCR2 de ExtIntRev-LipPRev, PCR3 de *ctpA*sec1-LipPRev, PCR4 de LipPRev-ProAg85ARev. MP: Generuler 1kb plus. B). Figura descriptiva del plásmido pDSC2 integrado en el genoma de *Mtb* con los fragmentos de las PCR generado en Biorender

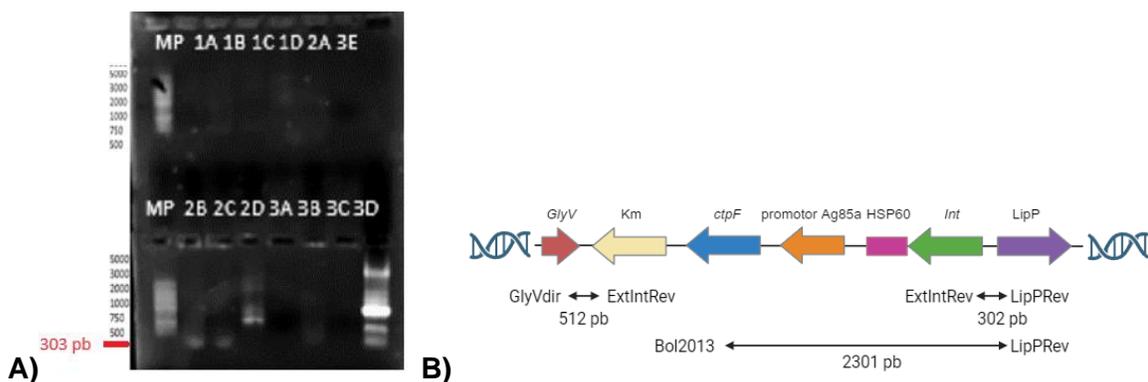


Por otra parte, en cuanto a la complementación de la cepa defectiva en *ctpF*, se realizó una electroporación con el plásmido integrativo pMF1, en el genoma de Mtb H37Ra Δ *ctpF* para obtener Mtb H37Ra:pMF1 Δ *ctpF*:*ctpF*, su comprobación se realizó mediante PCR (figura 7-11-1A).

Primero se diseñó una PCR que flanqueaba el fragmento *GlyV* y al fragmento *Int*, sin embargo, no se observó ninguna banda. Posteriormente se ejecutó una segunda PCR flanqueando el fragmento *Int* con la lipasa P del cromosoma bacteriano con los primers ExtIntRev – LipPRev, para flanquear el fragmento de Lipasa P con el gen *int*, obteniendo un fragmento de 303 pb, confirmando así la inserción.

Finalmente se diseñó una tercera PCR flanqueando un fragmento de *ctpF* con el primer Bol2013 y la Lipasa P con el primer LipPRev, Sin embargo, no se observó ninguna banda, por lo que se debe optimizar esta PCR, No obstante, la PCR de *Int* con la selección con *Km* sugieren que el plasmido fue insertado y puede producir resistencia a *Km*

Figura 7-11-1: Comprobación de integración génica de plásmido pDMF1 en cepas mutantes de *Mtb* defectivas en *ctpF* carriles. A) PCR1 de GlyVDir-ExtIntRev, PCR2 ExtIntRev-LipPRev, PCR3 Bol2013-LipPRev A. Col1, B.Col2, C.Col5, D.pACM1,E.negativo MP: Generuler 1kb plus. B). Figura descriptiva del plásmido pMF1 integrado en el genoma de Mtb con los fragmentos de las PCR generado en Biorender



7.3 Determinación del nivel de transcripción de los genes integrados en las cepas complementadas de *Mtb*

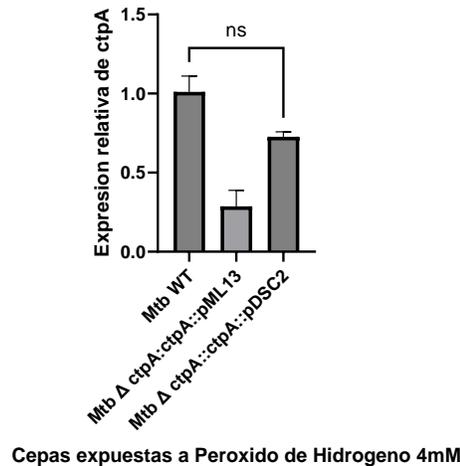
Por medio de PCR en tiempo real se verifico la expresión de los genes *16S* y *ctpA* en la cepa complementada *Mtb* H37Ra:pDSC2Δ*ctpA*:*ctpA*. Para lo cual primero se realizó extracción de ARN y posteriormente se sintetizo cADN siguiendo el procedimiento 6.8, obteniendo los Ct descritos en el anexo E. Posteriormente se realizó un análisis estadístico para comparar la transcripción de *ctpA* bajo el control de los promotores *ag85a* y *hsp60* a partir de la integración de los plásmidos pMF1 y pDSC2 en *Mtb* H37RaΔ*ctpA*:*ctpA*

Se observo que existe una recuperación significativa de la transcripción de *ctpA* respecto al genotipo silvestre al exponer las bacterias *Mtb* H37RaΔ*ctpA*:*ctpA*:pDSC2 y *Mtb* H37Ra WT a peróxido de hidrogeno 4 mM, como lo podemos ver en la figura 7-12-1

Según los resultados al ser analizados por una prueba t student de muestras independientes no existe diferencia significativa entre las medias de la transcripción relativa de *ctpA* de *Mtb* H37RaΔ*ctpA*:*ctpA*:pDSC2 con respecto a *Mtb* H37Ra WT (valor P 0.0543). Es decir, en un 95% de los escenarios no hay diferencias significativas entre los datos de transcripción del gen CTPA entre cepas. Este mismo comportamiento fue observado en un trabajo anterior donde se complementa el gen *dosR*, usando una

integración sitio específica de con el plásmido pMF209 bajo regulación del promotor Ag85 (Farahnaz Movahedzadeh, 2011).

Figura 7-12-1: Expresión relativa de *ctpA* en cepas de *Mtb*.

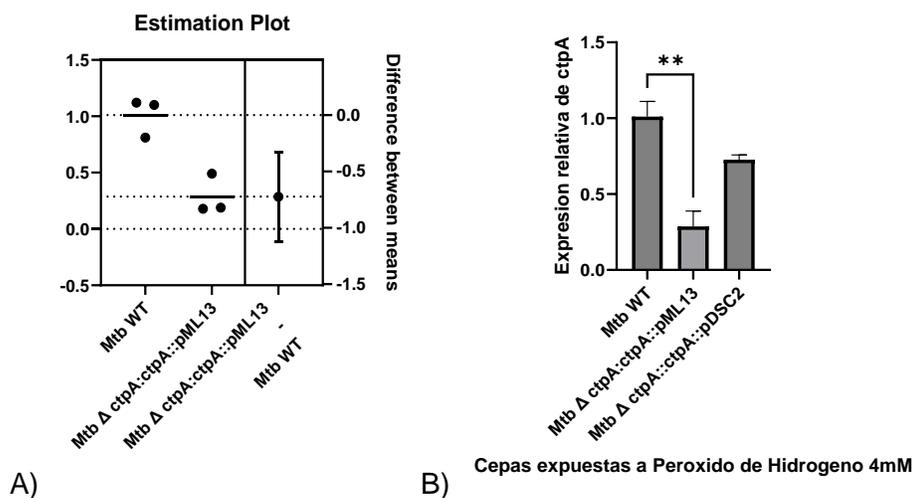


Este sistema de integración bajo control del promotor *Ag85A* puede ser muy útil por diferentes motivos. La integración de *Int* al genoma bacteriano y posteriormente la recombinación homóloga entre los sitios *attP* del plásmido integrativo y *attB* de la micobacteria, dando finalmente dos sitios, uno *attR* y otro *attL* con la integración completa del plásmido (D. K. Armianinova, 2022). Este evento que ocurre justo en el extremo 3' del gen *tRNA^{Gly}* de *attB* sin afectarlo, lo que todavía no es del todo claro por qué el mico bacteriófago L5 haya adquirido el uso de genes *tRNA* como sitio de integración. Algunos estudios han sugerido que se comparten funciones de la integrasa y del ARNt, manteniendo la integridad completa del gen *tRNA* sin afectarlo. Además, ayudándose por el superenrollamiento de ADN que ocurre en la recombinación integrativa, que le genera mayor estabilidad (Peña, 1996). Específicamente *Int* en otros plásmidos integrativos no replicantes como pMH94 y pGL1 generan interacciones de siete sitios tipo núcleo y transforman eficazmente *M. smegmatis* (Peña M. H., 1997). Por lo que sugiere una introducción del plásmido completa y exitosa generando respuesta a estrés oxidativo, sin afectar el gen *tRNA*, como ocurrió en el estudio de la inserción del regulador DosR (Farahnaz Movahedzadeh, 2011).

Al comparar la expresión relativa de *ctpA* inducida con peróxido de hidrogeno 4mM entre *Mtb* WT y *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*::*ctpA*::pML13 figura 7-13-1A, se sugiere que no se recupera el genotipo silvestre dado que la transcripción de *ctpA* con un plásmido integrativo bajo

regulación del promotor *hsp60* en este estudio fue por lo menos 3 veces menor al comparar con respecto a la cepa silvestre, (Figura 7-13-1B). Esto también se ha observado en estudios previos (M. Al-Zarouni, 2002) que a pesar de que *hsp60* es un promotor fuerte, muestra un nivel de expresión más débil, esto debido a que existe una alta proporción de deleciones en el genoma entre las células transformadas con la integración de plásmidos basados únicamente en *hsp60* en el genoma bacteriano de BCG. Un motivo probable es la inducción durante la electroporación. Otro estudio utilizando el plásmido integrativo pNIV2137 (no regulado por el promotor *hsp60*), mostró mayor estabilidad en la integración que el plásmido pNIV2119 (bajo regulación de *hsp60*) al insertar *CSP* o proteína de circumsporozoito en el genoma bacteriano de BCG (Haeseleer, 1994). También se ha reportado algunos problemas cuando se expresa LacZ con este promotor, donde nuevamente se reportan rearrreglos y deleciones, causando dos problemas, primero los niveles de expresión y la tendencia del promotor a reorganizarse (Nicola Casal, PhD tesis, 1998).

Figura 7-13-1: A) Expresión relativa de *ctpA* comparando diferencia entre WT y *Mtb* H37Ra Δ *ctpA::ctpA::pML1*



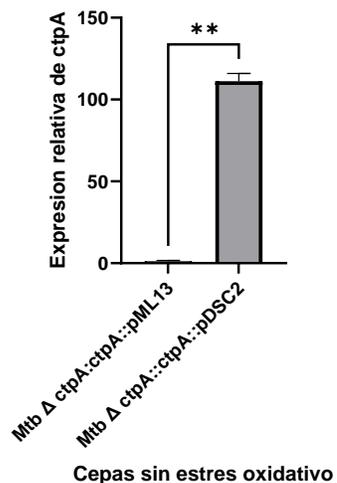
El presente estudio sugiere que el uso de vectores integrativos bajo regulación tanto con el con el promotor *Ag85A* no causa la sobre expresión de la proteína complementada en este caso *CtpA*. No obstante, al comparar los promotores, usar plásmidos integrativos bajo regulación del promotor *Ag85A* podría resultar más conveniente en experimentos de

infección para evaluar la virulencia de los mutantes delecionados dado que se recupera el genotipo silvestre.

Una estrategia similar al diseño y construcción de los plásmidos estudiados en esta investigación, fue usar el gen de la proteína antigénica Ag85B completo justo después del promotor *hsp60*, en el plasmido pMV361-Ag85B-IFN- γ , dado que se requería complementar un nuevo recombinante de BCG para evaluar la respuesta inmune en ratones C57BL/6, encontrando que se podría mejorar la respuesta inmune con cepa rBCG::Ag85B-IFN- γ transformada con el plasmido pMV361-Ag85B-IFN- γ , ofreciendo una alternativa vacunal (W. Liu, 2017).

No fue objeto del estudio, sin embargo, existía la pregunta si el promotor *Ag85A* era autoinducible. Se encontró actividad basal de *ctpA* sin estimulación con peróxido de hidrogeno, al normalizar la expresión relativa de *ctpA* entre *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*:*ctpA*:pML13 y *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*:*ctpA*:pDSC2, los cuales eran los blancos del estudio de qPCR, lo que podría inferir que el promotor antigénico *Ag85A* es un promotor auto inducible, puesto que no tenía ninguna condición de estrés. Mientras que la expresión bajo *hsp60* sin estrés oxidativo es casi nula. Encontrando que la proteína se expresa por lo menos unas 100 veces más sin estrés que con *hsp60* (Figura 7-14-1). Al momento de realizar esta tesis no se ha encontrado estudios de la actividad basal del promotor *Ag85A*. Puede que esto sea debido a la experiencia del experimentador, sin embargo, se ha relevante estudiar más a profundidad esta Hipotesis.

Figura 7-14-1: Expresión relativa de *ctpA* sin estrés oxidativo comparando diferencia entre *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*:*ctpA*:pDSC2 y *Mtb* H37Ra Δ *ctpA*:*ctpA*:pML1



8. Conclusiones y recomendaciones

8.1 Conclusión General

Los resultados obtenidos permiten concluir que se pueden realizar complementaciones de cepas defectivas en ATPasas diseñando y construyendo plásmidos integrativos basados en el promotor Ag85A.

8.2 Conclusiones específicas

- Los plásmidos pMF1 y pDSC2, pueden ser útiles para la complementación de cepas mutantes de *Mtb* defectivas en ATPasas tipo P como CtpA y CtpF.

- La complementación de *Mtb* defectiva en *ctpA* con el plasmido pDSC2 bajo el control del promotor Ag85A obtuvo una expresión relativa similar a la cepa silvestre
- La complementación de *Mtb* defectiva en *ctpA* con el plasmido pML13 bajo el control del promotor *hsp60* mostro una expresión relativa menor a la cepa silvestre.

8.3 Recomendaciones

- Se recomienda evaluar la expresión de la ATPasa *ctpF* con el promotor Ag85A y el plásmido pMV361, dado que esta ATPasa ha sido objeto de estudio en la elaboración de células atenuadas con potencial vacunal.
- Se recomienda estudiar a mayor profundidad la actividad del promotor Ag85A

9. Divulgación en eventos científicos

- **Manuel Figueroa Castillo**, Danna Sofia Camelo, Gina Marcela Lopez y Carlos Y. Soto. SLAMTB “complementation of p-type atpase-defective *Mycobacterium tuberculosis* mutants: construction of integrative plasmids based on the ag85a promoter” presentación en modalidad de poster, en el V C2B2 y la XI Reunión de la Sociedad Latinoamericana de Tuberculosis y otras Micobacteriosis (SLAMTB) en la ciudad de Bucaramanga, del 8 al 10 de noviembre del 2023.

A. Anexo: Tabla de colonias de *E.coli* transformada con plásmido pMF obtenido de las ligaciones de proporciones de pACM:promotor Ag85

Colonia	Proporción pACM: promotor Ag85A	Colonia	Proporción pACM: promotor Ag85A
1	1:3	21	1:5
2	1:3	22	1:5
3	1:3	23	1:5
4	1:3	24	1:5
5	1:3	25	1:5
6	1:3	26	1:5
7	1:3	27	1:5
8	1:3	28	1:5
9	1:6	29	1:5
10	1:10	30	1:5
11	1:10	31	1:10
12	1:10	32	1:10
13	1:10	33	1:10
14	1:10	34	1:10
15	1:10	35	1:6
16	1:10	36	1:6
17	1:10	37	1:10
18	1:10	38	1:10
19	1:10	39	1:10
20	1:5	40	1:5

B. Anexo: Tabla de pooles de colonias de *E.coli* JM109 transformadas con pMF1

Literal	Colonias
A	1-6
B	7-12
C	13-18
D	19-24
E	25-30
F	31-36
G	37-40

C. Anexo: Tabla de colonias *E.coli* JM109 transformadas con pMF1

Literal	Colonias
A	1
B	2
C	3
D	4
E	5
F	6
G	37
H	38
I	39
J	40

D. Anexo: Tabla de resultados esperados de la digestión de plásmidos pACM 1 y pMF1 generada en SNAPGENE.

Plásmido	<i>PstI</i>	<i>Sall</i>	<i>MfeI</i>	<i>BamHI</i>
pACM1	4443/1926/836	2779/2261/2168	7208	4951/1633/624
pMF1	4443/1758/839/ <u>419</u>	2261/2258/2168/ <u>772</u>	7208/ <u>251</u>	4951/ <u>1884</u> /624

E. Anexo: Tabla de resultados ct de qPCR analizados por el método pfaffl

Expresión relativa de ctpA		
Mtb WT	Mtb Δ ctpA::ctpA::pML13	Mtb Δ ctpA::ctpA::pDSC2
0,81	0,49	0,67
1,1	0,19	0,73
1,12	0,18	0,78

Bibliografía

- A. L.-Torres, L. N.-A. (2015). CtpA, a putative *Mycobacterium tuberculosis* P-type. *Biometals*.
- Andrew J. Pollard, E. M. (2021). A guide to vaccinology: from basic principles to new developments. *Nature Reviews Immunology*, 83-100.
- B. Saviola, W. R. (2004). Method to integrate multiple plasmids into the mycobacterial chromosome. *Nucleic Acids Res*, 1-4.
- Babaki, M. S. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* immunogene: Biology, immune-pathogenicity, applications in diagnosis, and vaccine desing. *Microbial Pathogenesis*, 20-29.
- C. K. Stover, V. F. (1991). New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*, 456-460.
- Cruz, A. (2021). Complementación de un mutante de *Mycobacterium tuberculosis* defectivo en CtpF, una ATPasa tipo P transportadora de Ca²⁺. *Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología*, Tesis de Pregrado.
- D. K. Armianinova. (2022). Genetic Engineering in Mycobacteria. *BACTERIAL GENOME EDITING*, 900-912.
- Farahnaz Movahedzadeh, R. F. (2011). A two-step strategy for the complementation of *M. tuberculosis* mutants. *Genetics and Molecular Biology*, 286-289.
- Futai, M. &. (2004). *Handbook of ATPases: Biochemistry, Cell Biology, and pathophysiology*. Weinheim: Willey.
- G Batoni, G. M. (1998). Analysis of the *Mycobacterium bovis* hsp60 promoter activity in recombinant *Mycobacterium avium*. *FEMS Microbiology Letters*, 117-124.
- Gomez, C. (2021). Obtención de útiles génicos que permitan la complementación de mutantes de *Mycobacterium tuberculosis* defectivos en ATPasas tipo P. *Universidad Nacional de Colombia, Sede Bogotá, Facultad de Ciencias, Departamento de Biología*, Tesis de Pregrado.
- Guglielmo C, F. D. (2016). Principales promotores utilizados en la transformación genética de plantas. *Rev. colomb. biotecnol vol. 18 no.2*.
- Haeseleer. (1994). Structural instability of recombinant plasmids in mycobacteria. *Res Microbiol*, 683-687.
- Hanahan, D. G. (1985). *DNA Cloning, Vol. 1*. IRL Press.

- Hoyos, M. (2021). *ATPasas tipo P como blancos para la atenuación de Mycobacterium tuberculosis*. Bogota. Tesis de doctorado: Universidad Nacional de Colombia.
- Hoyos, M. M. (2021). *ATPasas tipo P2 como blancos para la atenuación de Mycobacterium tuberculosis*. Bogota: Universidad Nacional de Colombia.
- J. P. Ernest, N. S. (2021). Development of New Tuberculosis Drugs: Translation to Regimen Composition for Drug-Sensitive and Multidrug-Resistant Tuberculosis. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 495-516.
- L. Kremer, A. B. (1994). Analysis of the Mycobacterium tuberculosis 85A Antigen Promoter Region. *American Society for Microbiology*.
- Li Zhuang, 1. Z. (2023). Next-Generation TB Vaccines: Progress, Challenges, and Prospects. *Vaccines (Basel)*, 1-56.
- Lopez, M. (2019). Evaluación de la virulencia de un mutante de Mycobacterium tuberculosis defectivo en el transporte iónico mediado por una ATPasa tipo P, en modelos experimentales de infección.
- Lorena Novoa-Aponte, C. Y. (2014). Mycobacterium tuberculosis P-type ATPases: possible targets for drug or vaccine development. *Biomed Res Int*.
- Luna, J. A. (2003). *Guía de la tuberculosis para médicos especialistas*. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease.
- Mangtani, P. (2017). Observational study to estimate the changes in the effectiveness of bacillus Calmette-Guérin (BCG) vaccination with time since vaccination for preventing tuberculosis in the UK. *Health Technol Assess*, 1-54.
- Mansour Al-Zarouni, w. J. (2002). Expression of foreign genes in Mycobacterium bovis BCG strains using different promoters reveal instability of the hsp60 promoter for expression of foreign genes in Mycobacterium bovis BCG strains. *Tuberculosis*, 283-291.
- Marcela López-R, M. M.-H.-T.-C. (2023). The copper P-type ATPase CtpA is involved in the response of Mycobacterium tuberculosis to redox stress. *Biochimie*.
- Maya Hoyos, D. M.-E.-T.-V.-P.-C.-P. (2022). The ctpF Gene Encoding a Calcium P-Type ATPase of the Plasma Membrane Contributes to Full Virulence of Mycobacterium tuberculosis. *International Journal of Molecular Sciences*, doi: 10.3390/ijms23116015.
- Migliori, G. B. (2020). MDR/XDR-TB management of patients and contacts: Challenges facing the new decade. The 2020 clinical update by the Global Tuberculosis Network. *International Journal of Infectious Diseases*, S15 - S25.

- Murphy, a. S. (2018). ORBIT: a New Paradigm for Genetic Engineering of Mycobacterial Chromosomes. *American society for microbiology*.
- Ohara N., Y. T. (2001). Recombinant BCG vaccines. *Vaccine*, 4089–4098.
- Palmgreen, M. &. (2011). P-type ATPases. *Annu Rev Biophys*, 243-266.
- Pedersen, P. (2007). Transport ATPases into the year 2008: a brief overview related to types, structures, functions and roles in health and disease. *J Bioenerg Biomembr*, 349-355.
- Peña, J. E. (1996). Positions of Strand Exchange in Mycobacteriophage L5 Integration and Characterization of the attB Site. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, 5533-5536.
- Peña, J. S. (1998). Mycobacteriophage D29 integrase-mediated recombination: specificity of mycobacteriophage integration. *Gene* 225, 143-151.
- Peña, M. H. (1997). Characterization of the Mycobacteriophage L5 Attachment Site, attP. *JMB*, 76-92.
- Petolino, J. &. (2013). Designed transcriptional regulators for trait development. *Plant Sci*, 128-136.
- Pfaffl. (2019). 'Quantification Strategies in Real-time Polymerase Chain Reaction'. *Polymerase Chain Reaction: Theory and Technology*.
- Pludderman, A. M. (2011). Innate immunity to intracellular pathogens: macrophage receptors and responses to. *Immunology Review*, 11-24.
- R. Hernández Pando a, L. A. (2006). The use of mutant mycobacteria as new vaccines to prevent tuberculosis. *Tuberculosis*, 203-210.
- Rein M. G. J. Houben, P. J. (2016). The Global Burden of Latent Tuberculosis Infection: A Re-estimation Using Mathematical Modelling. *PLOS MEDICINE*.
- Riccardo Miggiano, M. R. (2020). Mycobacterium tuberculosis Pathogenesis, Infection Prevention and Treatment. *Pathogens*, 385-386.
- Rivas-Santiago, Y. M.-D.-C. (2023). Mycobacterium tuberculosis cell-wall and antimicrobial peptides: a mission impossible? *Front. Immunol*.
- Rosamund Chapman, G. C.-L. (2010). Recombinant Mycobacterium bovis BCG as an HIV vaccine vector. *Curr HIV Res.*, 282-98.
- Samperio, P. M. (2019). Desafíos y oportunidades actuales para las candidatas a vacunas de reemplazo del bacilo de Calmette-Guérin. *Revista escandinava de inmunología*, Volumen 90, Número 4.

-
- Sandhu, G. K. (2011). Tuberculosis: Current Situation, Challenges and Overview of its Control Programs in India. *J Glob Infect Dis*, 143-150.
- Sherwood, L. &. (2008). *Prescott, Harley, and Klein's Microbiology*. J.M. Willey 7 Ed.
- Soto Valenzuela, J. O. (2018). Caracterización bioquímica y molecular de bacterias asociadas a nódulos de cuatro leguminosas en la provincia de Santa Elena, Ecuador. *Ciencia Ergo Sum*, Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=10453975006>.
- Stephen V Gordon, T. P. (2018). Microbe Profile: Mycobacterium tuberculosis: Humanity's deadly microbial foe. *Microbiology (Reading)*, 437-439.
- Torres A.L., L. N.-Y. (2015). CtpA, a putative Mycobacterium tuberculosis P-type ATPase, is stimulated by copper (I) in the mycobacterial plasma membrane. *Biometals*, 713-724.
- Triccas, J. A. (2009). Recombinant BCG as a vaccine vehicle to protect against tuberculosis. *Bioeng Bugs.*, 110-115.
- Wei Liu, Y. x. (2017). Recombinant Bacille Calmette-Guérin coexpressing Ag85B-IFN- γ enhances the cell-mediated immunity in C57BL/6 mice. *EXPERIMENTAL AND THERAPEUTIC MEDICINE*, 2339-2347.
- WHO. (2023). *Organizacion Mundial de la salud. Global Tuberculosis Report 2023*. Geneva.
- Yeh, N. Q.-Y. (2019). Classifying Promoters by Interpreting the Hidden Information of DNA Sequences via Deep Learning and Combination of Continuous FastText N-Grams. *Front. Bioeng. Biotechnol. Sec. Computational Genomics*.
- Zaman, K. (2010). Tuberculosis: A Global Health Problem. *J Health Popul Nutr*, 111-113.