



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE
VENEZUELA**

**Facultad de Ciencias
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**CONSTRUCCIÓN DE UNA CEPA
MUTANTE DE *Mycobacterium smegmatis*
QUE CONTENGA EL EPÍTOPE FLAG EN
EL GEN *mfpA***

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la Ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Denisse Guevara Suárez como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología

Tutor: Dra. Aura Falco

Caracas, Venezuela

julio - 2010

1. INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecto-contagiosa que se transmite por vía aérea, que afecta principalmente a los pulmones y cuyo agente causal es una bacteria patógena conocida como *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (Ramaswamy y Musser, 1998). La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que hay aproximadamente 2000 millones de personas infectadas con MTB, lo cual representa un tercio de la población mundial. Cada año hay aproximadamente 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y 2 millones de muertes a nivel mundial (Zhang, 2005). Los factores que han contribuido a que la incidencia de la enfermedad se mantenga estable en el tiempo son: la coinfección con VIH/SIDA, el debilitamiento de los servicios de salud y la emergencia de bacterias resistentes a drogas (Hong y Hopfinger, 2004). Se define que una cepa es resistente a múltiples drogas (MDR-TB), cuando muestra resistencia a dos fármacos de primera línea tales como la isoniazida y la rifampicina (Ramaswamy y Musser, 1998). La aparición de estas cepas multiresistentes ha complicado aún más el control de la TB, por lo que existe la necesidad urgente de encontrar nuevas drogas que erradiquen la enfermedad.

1.1 *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis pertenece a la Familia *Mycobacteriaceae*, Orden *Actinomycetales*, Clase *Actinomycetes*. Es un bacilo delgado de forma recta o ligeramente curva, cuyo tamaño varía entre 0,2-0,6 x 1-10 μm (Forbes, 1998). Este microorganismo se caracteriza por ser inmóvil, aerobio, no formador de esporas y además, manifiesta resistencia intrínseca a una variedad de agentes antimicrobianos. Esta propiedad se debe a la estructura de su pared celular. Los bacilos tuberculosos son difíciles de teñir

con la tinción Gram y se observan como bacilos Gram positivos con tinción irregular. Para poder observar mejor a este microorganismo se emplea la coloración Ziehl-Neelsen, la cual es muy útil para observar las bacterias tanto en muestras clínicas como en cultivos. Esta técnica aprovecha la característica de la envoltura de las micobacterias de resistir la coloración con alcohol ácido, luego de ser sometida a una coloración prolongada con fucsina básica. Por esta razón se denominan bacilos ácido alcohol resistente.

La envoltura de *M. tuberculosis* consiste en tres capas, la más interna es la membrana plasmática, seguida por la pared celular que está constituida por una amplia red de carbohidratos y por último, se encuentra la capa más externa llamada membrana externa, constituida por polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Fig. 1).

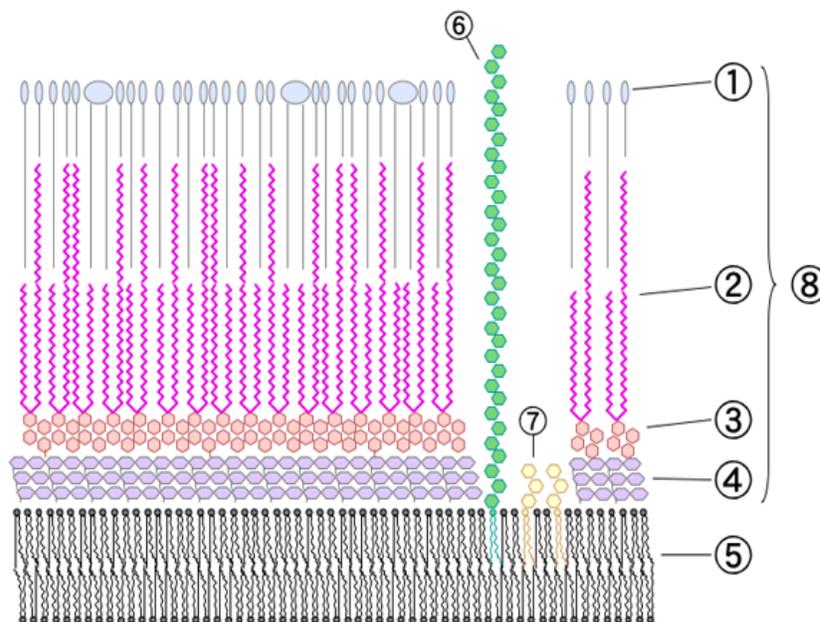


Figura 1. Diagrama de la pared celular de las micobacterias (Tomado de http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png). En la figura se observan: 1. Ácidos micólicos; 2. Lípidos; 3. Polisacáridos (arabinogalactámicos); 4. Peptidoglicano; 5. Membrana plasmática; 6. Lipoarabinomano (LAM); 7. Fosfatidilmionositolmanósido (PIMs).

La pared celular se localiza por debajo de la membrana externa, está separada por un espacio periplásmico y posee un elevado contenido lipídico (60%). Está compuesta por tres macromoléculas unidas covalentemente: el peptidoglicano, el arabinogalactano y los ácidos micólicos. El peptidoglicano está formado por N-Acetil Glucosamina (NAG) unida por enlaces β -1,4 al N-Acetil Ácido Murámico (NAM). Esta capa es el esqueleto que le proporciona a la bacteria su forma y rigidez funcionando como una barrera protectora eficaz que limita el acceso de las drogas a sus blancos. Sin embargo, la constitución de la pared celular no es suficiente para explicar la resistencia intrínseca de estas bacterias a los medicamentos y es por ello que el tratamiento utilizado para las infecciones causadas por las micobacterias, es más complicado que para otras bacterias, pues también son resistentes a diversos compuestos de amonio cuaternario, lo que hace que la prevención de la transmisión del bacilo sea difícil (Hong y Hopfinger, 2004; Brennan y Nikaido, 1995).

La infección con *M. tuberculosis* ocurre cuando un individuo sano se expone a los aerosoles liberados por un paciente cuando tose o habla, proceso que generalmente sucede de forma leve y asintomática (Schaechter, 1994). Existe una alta resistencia por parte del humano a adquirir tuberculosis. De los individuos que entran en contacto con el bacilo tuberculoso, se infectan sólo un 10% aproximadamente. De estos, un 80% entra en período de latencia y el resto (5-10%) desarrollan la enfermedad (García y Gonzáles, 2001).

Luego de la inhalación, los bacilos son fagocitados por los macrófagos alveolares, lo que induce una respuesta local proinflamatoria y la participación de diversos receptores, como los receptores de complemento y de tipo toll (van Crevel y col., 2002;

Ernts, 1998). Una vez que se ha incorporado la bacteria, esta se encuentra en un medio hostil que incluye pH ácido, especies reactivas del oxígeno (IOR) e intermediarios de nitrógeno (IN). Los macrófagos pueden tomar la vía de apoptosis o muerte celular programada para eliminar el bacilo (Smith 2003; Flynn y Chann, 2001).

El bacilo tuberculoso regula la respuesta inmune, lo cual trae como consecuencia un incremento en su sobrevivencia intracelular. Esto lo logra impidiendo la fusión del fagosoma al lisosoma, inhibiendo el procesamiento antigénico, atenuando la acción del interferon gamma y la activación del mecanismo de la proteína quinasa PknG en el macrófago (Tufariello y col., 2003). Estas son las estrategias de sobrevivencia de las micobacterias dentro del huésped y la inducción de estos mecanismos evasivos en *M. tuberculosis* es consecuencia de la adaptación de la bacteria a señales externas.

1.2 Terapia actual contra la tuberculosis

La OMS recomienda una terapia anti-tuberculosa que tiene una duración de seis meses y consiste en una fase inicial de tratamiento con cuatro drogas de primera línea: isoniacida (INH), estreptomina (STR), pirazinamida (PZA) y rifampina (RIF) o etambutol (EMB); seguida por una segunda fase con isoniazida y rifampina durante otros dos meses (Fig. 2). A este tratamiento se le denomina TAES (Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado) y tiene una efectividad del 95%. Sin embargo, no es tan eficiente cuando el paciente está infectado con una cepa de MTB resistente a múltiples drogas (MDR-TB), donde la tasa de cura es apenas 50%. En este caso, se aplica el tratamiento llamado TAES – Plus, que consiste en administrar al paciente drogas de segunda línea como etionamida, cicloserina, FQs (fluoroquinolonas),

kanamicina y se extiende a 24 meses, lo que aumenta los costos y la toxicidad (Zhang, 2005).

La terapia antituberculosa requiere un período largo de exposición a los antibióticos y la resistencia fenotípica que pueden presentar los bacilos, puede deberse a que la mayoría de las drogas antituberculosas son activas contra bacterias en crecimiento pero inefectivas contra bacterias que no se estén replicando.

Se definen 4 estados metabólicos para las micobacterias una vez que han infectado al ser humano: aquellas que crecen activamente que son eliminadas por INH (cuando este antibiótico no funciona, entonces se utiliza RIF, estreptomicina o EMB); aquellas bacterias que crecen con un metabolismo muy activo que son eliminadas por RIF; las que tienen una actividad metabólica baja que son eliminadas por PZA y finalmente, aquellas que se encuentran en estado de latencia que no son eliminadas por ningún agente antimicrobiano (Zhang, 2005).

1.3 Modo de acción de las drogas anti-TB

Las drogas antituberculosas pueden clasificarse con base en su efecto sobre las bacterias como bacteriostáticas o bactericidas. Las drogas estáticas incluyen a EMB, mientras que las bactericidas incluyen a INH, RIF, STR y FQs. Sin embargo, la distinción entre estas drogas es relativa debido a que la terapia con una droga bacteriostática puede llegar a ser bactericida bajo ciertas condiciones como alta concentración del antibiótico, inóculos pequeños o cambios en el estado fisiológico de la bacteria. Por ejemplo, la PZA puede tener actividad bactericida contra una carga baja de bacilos que no estén creciendo, pero muestra actividad estática en bacilos metabólicamente activos.

A su vez, estas drogas pueden agruparse en inhibidores de la síntesis de pared celular, inhibidores de proteínas e inhibidores de la síntesis de ácidos nucleicos (Zhang, 2005).

También pueden clasificarse de acuerdo a la preferencia del tratamiento como drogas de primera línea y segunda línea. Las de primera línea son aquellas que ofrecen una gran efectividad en el tratamiento con el menor número de efectos secundarios y son las más recomendadas debido a su actividad bactericida (INH, RIF, PZA, EMB y STR). Drogas de segunda línea como etionamida, cicloserina, kanamicina y fluoroquinolonas, son usadas como agentes alternativos para el tratamiento de infecciones causadas por cepas resistentes a los medicamentos de primera línea (Ramaswamy y Musser, 1998).

Algunas de las características de las drogas, mecanismo de acción y efectos adversos están resumidas en la tabla II.

ANTIBIÓTICO	ADMINISTRACIÓN	MECANISMO DE ACCIÓN	ACTIVIDAD	EFFECTOS ADVERSOS
IZONIACIDA	Oral	Inhibición de la síntesis de ácido micólicos y de la pared celular	Bactericida, bacilos metabólicamente activos	Hepatitis clínica (0,1% < 30 años) (4% > 65 años) . Polineuritis Periférica
RIFAMPICINA	Oral	Inhibición de la síntesis de ARN	Bactericida, bacilos metabólicamente activos, en estado de latencia y con crecimiento intermitente	Molestias gastrointestinales. Afección Hepática
RIFABUTINA	Oral			Reacciones de Hipersensibilidad, Inducción enzimática
PIRAZINAMIDA	Oral	De de la energía de la membrana	Bactericida, bacilos en estado de latencia en el interior de los macrófagos. Bacteriostático	Hiperuricemia, Hepatotoxicidad
ETAMBUTOL	Oral	Inhibición de la síntesis de la pared celular a nivel de los arabinogalactanos	Bacteriostático, bacilos metabólicamente activos	Neuritis óptica
ESTREPTOMICINA	Intramuscular(IM)	Inhibición de la síntesis de proteínas	Bacilos metabólicamente activos	Alteraciones vestibulares y auditivas
PAS	Oral	Inhibición de la vía de fosfatos y la síntesis de micobactina	Bacilos metabólicamente activos	Intolerancia gastrointestinal
CICLOSERINA	Oral	Inhibición de la síntesis de peptidoglicano	Bacteriostático	Neuropatía Periférica, Alteraciones del SNC, reacciones psicóticas (depresión)
ETIONAMIDA	Oral	Inhibición de la síntesis de ácidos micólicos	Bacteriostático	Intolerancia digestiva. Hepatotoxicidad. Neurotoxicidad
AMIKACINA	IM	Inhibición de la síntesis de proteínas	Bactericida	Ototoxicidad (vestibular y coclear). Nefrotoxicidad
CAPREOMICINA	IM	Inhibición de la síntesis de proteínas	Bactericida	Toxicidad por succinilcolina (depresión respiratoria)
OFLOXACINA	Oral	Inhibición de la síntesis del ADN	Bactericida	Intolerancia gastrointestinal. Alteración del SNC
CIPROFLOXACINA	Oral			Exantema, prurito, urticaria

Tabla I. Resumen de las características de las drogas utilizadas en el tratamiento contra la tuberculosis.

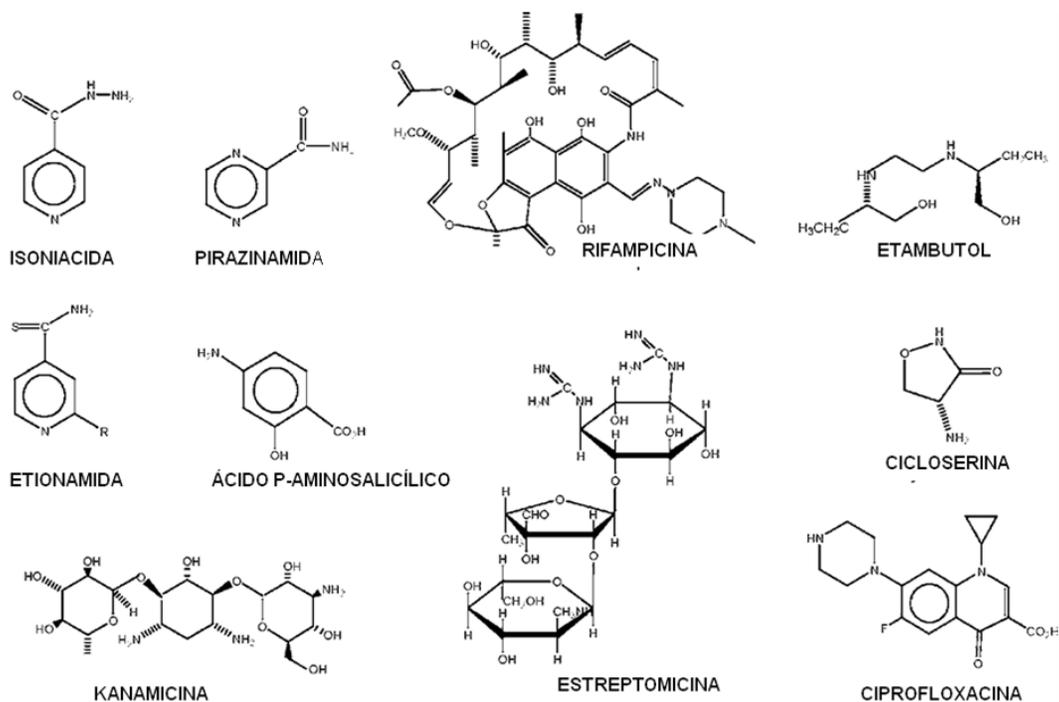


Figura 2. Estructura química de alguna de las drogas antituberculosas de primera y segunda línea (Tomado y modificado de Zhang, 2005).

La situación actual de la tuberculosis a nivel mundial refleja que las estrategias utilizadas para su control no están siendo tan efectivas como al principio de su aplicación. Debido a que, en los últimos años ha habido un aumento en la selección de cepas resistentes a drogas de primera línea, lo cual se puede considerar como una señal de ineficiencia en el tratamiento estándar (TAES), principalmente en aquellas zonas donde la incidencia de tuberculosis multidrogo resistente (TB-MDR) es alta (Chopra, 2003; Ginsberg y Spigelman, 2007). Otro problema es la adherencia del paciente al tratamiento, pues el cumplimiento de un esquema tan largo es difícil, a pesar de la vigilancia estricta por parte del personal médico (Chopra, 2003).

La situación con respecto a la resistencia merece una atención especial y esto se ve representado en un estudio realizado por Zignol en el año 2006, donde se estimó

que de los casos de TB-MDR en 184 países, el 46% de los casos fue consecuencia de la poca adherencia al tratamiento. Además, recientemente se ha reportado un nuevo grupo llamado tuberculosis extremadamente resistente (TB-XDR), constituida por cepas resistentes a isoniazida, a rifampicina, a todas las fluoroquinolonas y al menos, a una de tres drogas inyectables como capreomina, kanamicina y amikacina. Este tipo de casos se ha encontrado en todas las regiones del mundo, pero con mayor incidencia en Rusia y Asia (Ginsberg y Spigelman, 2007).

Debido a esta tendencia y a las estadísticas que maneja la OMS, se ha declarado la Tuberculosis como un problema de salud pública a nivel mundial. La propagación de los clones de *M. tuberculosis* resistentes a agentes antimicrobianos ha sido la principal causa que ha impedido disminuir el impacto de la TB en el siglo XXI, sugiriéndose la necesidad de intervenir en los programas de tratamiento. En tal sentido, es necesario ofrecer nuevas alternativas terapéuticas para tratar estos casos y evitar su propagación.

1.4 Antimicrobianos

Los antimicrobianos son sustancias químicas naturales (biosintetizadas por hongos o bacterias), capaces de inhibir el desarrollo de otros microorganismos cuando son bacterioestáticos; o son capaces de matarlo, si es bactericida (Brock y Madigan, 1993).

La clasificación más empleada para agrupar a los antibióticos está basada en el blanco de acción o en los procesos fisiológicos que inhibe o modifica. A cada grupo le corresponde un mecanismo molecular específico, distinguiéndose los siguientes (Jehl y col., 2004):

- Beta-Lactámicos, Glicopéptidos y Fosfopéptidos: antibióticos activos sobre la pared bacteriana.
- Gramicidinas y Polimixinas: antibióticos activos sobre la membrana citoplasmática.
- Antibióticos activos sobre los procesos localizados en el citoplasma bacteriano:
 - a. Síntesis protéica: aminoglucósidos, tetraciclina, macrólidos, estreptograminas, rifampicina y cloranfenicol.
 - b. Inhibidores de vías metabólicas: sulfamidas y trimetropim.
 - c. Replicación del ADN: Quinolonas.

1.5 Las quinolonas

Las quinolonas son agentes bactericidas que inhiben la síntesis de ADN. El agente más antiguo de esta familia es el ácido nalidíxico (NAL), obtenido de forma natural en 1962 y cuya estructura se ha ido modificando a tal punto que para el año 1997, se propuso una nueva clasificación para las quinolonas que más adelante se fue ampliando con la aparición de nuevos compuestos. Convencionalmente han sido agrupadas por generaciones de acuerdo a la época de su incorporación en el mercado, a su estructura química y al espectro antibacteriano, siendo el hecho más destacable la incorporación de un átomo de flúor en el carbono 6, lo que dio origen a las fluoroquinolonas (FQs) (Ginsburg y colaboradores, 2003).

En el año 2000, King y colaboradores realizaron una clasificación de estos agentes según las variaciones introducidas:

1.5.1. Quinolonas de primera generación

Se caracterizaron por presentar un espectro reducido de actividad antimicrobiana, motivo por el cual sólo fueron útiles frente a ciertas especies de bacterias y no sobre otras de relevancia clínica como *Pseudomonas*, cocos Gram-positivos y anaerobios, razón por la cual tuvo una aplicación limitada para el tratamiento de infecciones de las vías urinarias. Está representado por el ácido nalidíxico, el ácido oxolínico, la cinoxacina, la pipemidina, entre otras (King y col., 2000).

1.5.2. Quinolonas de segunda generación

Una década posterior al descubrimiento del ácido nalidíxico, se sintetizó un nuevo grupo llamado fluoroquinolonas (FQ) que incluye la norfloxacin, la ciprofloxacina, la ofloxacina, la pefloxacina, la enoxacina, la fleroxacin, la tomafloxacina, la lomefloxacina (también clasificada como quinolona de tercera generación) y la difloxacina, entre otros (King y col, 2000). Este grupo fue empleado durante el período comprendido entre 1980 y 1990, llegándose a afirmar que han sido probablemente los antimicrobianos más importantes en la quimioterapia antibacteriana durante dicho período. Estructuralmente difieren de sus análogos anteriores en dos aspectos. El primero de ellos es la presencia de un átomo de flúor en posición 6 (Fig. 3), el cual permite aumentar tanto la afinidad por sus blancos (topoisomerasas tipo II), como la capacidad de penetración al interior de la célula bacteriana hasta setenta veces con respecto a las quinolonas que no tienen flúor en esa posición (Sumano, 1998). El segundo, es que poseen un sustituyente piperazinil o pirrolidinil (diamida cíclica) en la posición 7 del núcleo quinolónico (Taléns-Visconti y col, 2002).

Clínicamente presentan un amplio espectro antimicrobiano, mayor potencia, inmejorables propiedades farmacocinéticas, son menos tóxicos y tienen escasos efectos secundarios. Este grupo presenta actividad frente a *Pseudomonas aeruginosa*, algunas bacterias Gram positivas como *Staphylococcus aureus* y determinadas especies de micobacterias, clamidias y riquetsias, permitiendo así el tratamiento de infecciones sistémicas. Sin embargo, su actividad frente a *Acinetobacter sp.* y *Stenotrofomona maltophilia* es moderada, mientras que es escasa frente a *Stenotrofomona pneumoniae* y a otras especies de *Streptococcus* (King y col., 2000).

1.5.3. Quinolonas de tercera generación

Las quinolonas de tercera generación como esparfloxacina, levofloxacina, gatifloxacina, moxifloxacina y grepafloxacina, se caracterizan por presentar una mayor complejidad estructural que sus predecesores, pues contienen sustituyentes fluorados adicionales y otros cambios en las posiciones 1, 7 y 8 (Fig. 3), mejorando algunas propiedades farmacocinéticas y el espectro antimicrobiano frente a sus análogos de segunda generación y presentando una mayor actividad ante cocos Gram-positivos (King y col., 2000). Algunas de ellas han sido retiradas del mercado después de aprobada su comercialización o se ha restringido su uso por sus efectos tóxicos (esparfloxacina, grepafloxacina) (Taléns-Visconti y col., 2002).

1.5.4. Quinolonas de cuarta generación

En la actualidad, se vienen sintetizando nuevos compuestos derivados de los señalados anteriormente, que poseen nuevas propiedades como las de presentar actividad sobre anaerobios, abriendo la posibilidad de su uso en infecciones mixtas

(King y col., 2000). Por otro lado, algunas de ellas poseen actividad antitumoral, según se ha demostrado en animales de experimentación, lo cual posibilita su futura aplicación en el tratamiento de ciertos procesos tumorales (Tálens-Visconti, y col., 2002). Sin embargo, estos compuestos siguen siendo polémicos y motivo de una intensa investigación, por lo que se refiere a su aplicación clínica en el tratamiento de enfermedades infecciosas. Entre los representantes de este grupo, se señala a la clinafloxacin, la trovafloxacin (retirada del mercado), la difloxacin, la gemifloxacin, la sitafloxacin y la tosufloxacin. Las nuevas moléculas desarrolladas mejoran discretamente su actividad frente a Enterobacterias y bacilos Gram negativos no fermentadores; aún cuando la ciprofloxacina sigue considerándose la fluoroquinolona de elección frente a *P. aeruginosa*.

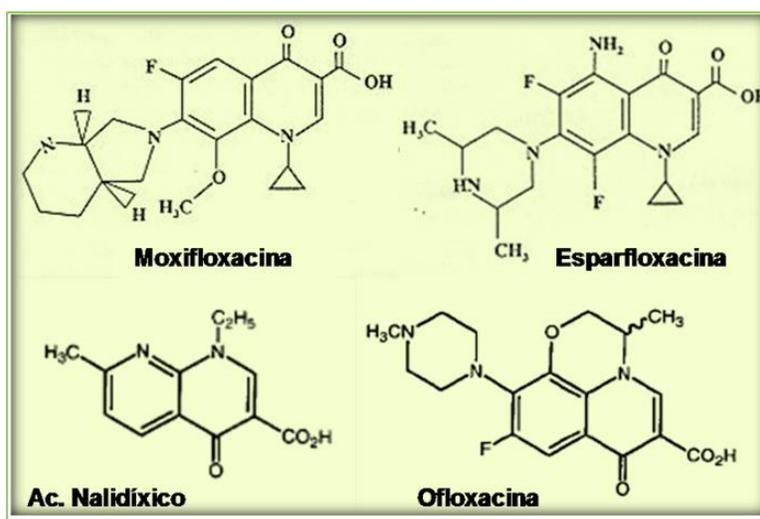


Figura 3.- Estructura del ácido nalidíxico y sus derivados (Tomado de Blanchard, 1992).

En la tabla II se señala las concentraciones mínimas inhibitorias de diferentes FQs. La CMI está definida como la concentración mínima de un antibiótico (expresada en µg/ml) que inhibirá el crecimiento de una población bacteriana. Las FQs de nueva

generación como la esparfloxacina, la gatifloxacina y la moxifloxacina tienen menores concentraciones mínimas inhibitorias (CMI) que la levofloxacina, la ciprofloxacina y la ofloxacina (tabla II) (Ginsburg y col., 2003).

Tabla II. CMI de fluoroquinolonas contra *M. tuberculosis* (Ginsburg y col., 2003)

Fluoroquinolona	CMI ($\mu\text{g/ml}$)
Ácido Nalidíxico	32
Ciprofloxacina	0.5-4.0
Ofloxacina	1.0-2.0
Levofloxacina	1.0
Esparfloxacina	0.2-0.5
Gatifloxacina	0.2-0.25
Moxifloxacina	0.12-0.5

Con el propósito de reducir la prevalencia de la tuberculosis, se han realizado estudios preclínicos importantes empleando fluoroquinolonas como gatifloxacina y moxifloxacina.

La gatifloxacina fue ensayada para ser administrada en combinación con la isoniacida, rifampicina y pirazinamida en un régimen de 4 meses de dosis diarias, seguido por dos meses de gatifloxacina, isoniacida y rifampicina tres veces a la semana. Los estudios se realizaron en pacientes de África y consistió en monitorear la posibilidad de recaídas durante los dos primeros años post-tratamiento. Estos estudios arrojaron resultados exitosos aunque con un incremento en el riesgo de desordenes

del metabolismo de glucosa, que impide el uso de esta alternativa de tratamiento en pacientes diabéticos (Chopra, 2003; Ginsberg y Spigelman, 2007).

La otra fluoroquinolona ensayada fue moxifloxacin. Esta droga ha sido evaluada bajo el siguiente esquema de tratamiento:

Sustitución de la isoniacida por moxifloxacin en el tratamiento estándar TAES en ratones (Nuremberger, 2004).

Estos estudios sugieren que la actividad de moxifloxacin puede depender de los fármacos con los que se utiliza. En un ratón modelo tratado con las drogas antituberculosas, la sustitución de la isoniazida por moxifloxacin resultó mucho más potente que la adición de moxifloxacin al tratamiento estándar (isoniacida, rifampicina y pirazinamida). Cuando Nuremberger sustituyó la isoniazida por moxifloxacin se redujo el tratamiento a 4 meses.

1.6 Blanco de acción de las fluoroquinolonas

El blanco de las quinolonas son las topoisomerasas tipo II, que son enzimas que mantienen el DNA en un estado adecuado de enrollamiento tanto en las regiones cromosómicas que se están replicando como en las que están sin actividad de replicación (Blanchard, 1992).

La ADN girasa pertenece al grupo de topoisomerasas II, siendo esta un heterotetrámero compuesto por 2 subunidades (A_2 , B_2) codificadas por los genes *gyrA* (2625 pb) y *gyrB* (2413 pb), respectivamente en micobacterias (Blanchard, 1992). El

sitio activo de la ADN girasa se encuentra en la subunidad A_2 y se estima que aproximadamente unas 30-35 pb de ADN en forma B, ocupan el sitio de activo de la enzima (Vetting y col., 2006). Esta enzima es esencial para la viabilidad celular, pues está involucrada en diversos procesos celulares (Reece y Maxwell, 1991; Aleixandre y col, 1991; Zechiedrich y col, 2000) y su principal función consiste en catalizar el superenrollamiento negativo del ADN circular de la bacteria (Taléns-Visconti y col., 2002). Las reacciones de superenrolamiento negativo son dependientes de ATP y requieren al catión divalente Mg^{2+} (Reece y Maxwell, 1991).

Couturier y colaboradores en el año 1998, propusieron un modelo molecular de la acción de la girasa de *E. coli* (Fig. 4), llamado modelo de dos puertas. Este propone que la girasa pasa un segmento de ADN doble cadena, denominado segmento T o transporte; a través de otro segmento de ADN doble cadena momentáneamente roto, llamado segmento G o puerta (Levine y col., 1998). En la figura 4 se puede observar que la girasa se une a un segmento de ADN (azul claro y blanco) en forma de tetrámero, constituido por dos subunidades de GyrA (azul oscuro) y dos subunidades de GyrB (amarillo), mientras que el dominio catalítico del dímero de GyrA (color rojo) está involucrado en las reacciones de ruptura-religación tal como se indica en el complejo mostrado entre paréntesis. Cuando el ATP se une a los dominios N-terminal de las subunidades de GyrB, promueven su dimerización y forman la primera puerta llamada N que captura al segmento T. Concomitantemente, se produce una ruptura transitoria en el segmento G y los extremos 5' del mismo permanecen unidos covalentemente al residuo de tirosina 122 de GyrA a través de un enlace fosfotirosina. Luego, el segmento T es transportado a través del segmento G roto, y este a su vez es

religado. Durante este proceso se forma la segunda puerta proteica llamada C, formada por las subunidades de GyrA, por donde el pasa el segmento T. La religación del ADN roto resulta en la introducción de dos vueltas negativas, mientras que la hidrólisis del ATP promueve un cambio conformacional que re-abre la puerta N y devuelve a la enzima a su estado inicial (Couturier y col., 1998; Levine y col., 1998).

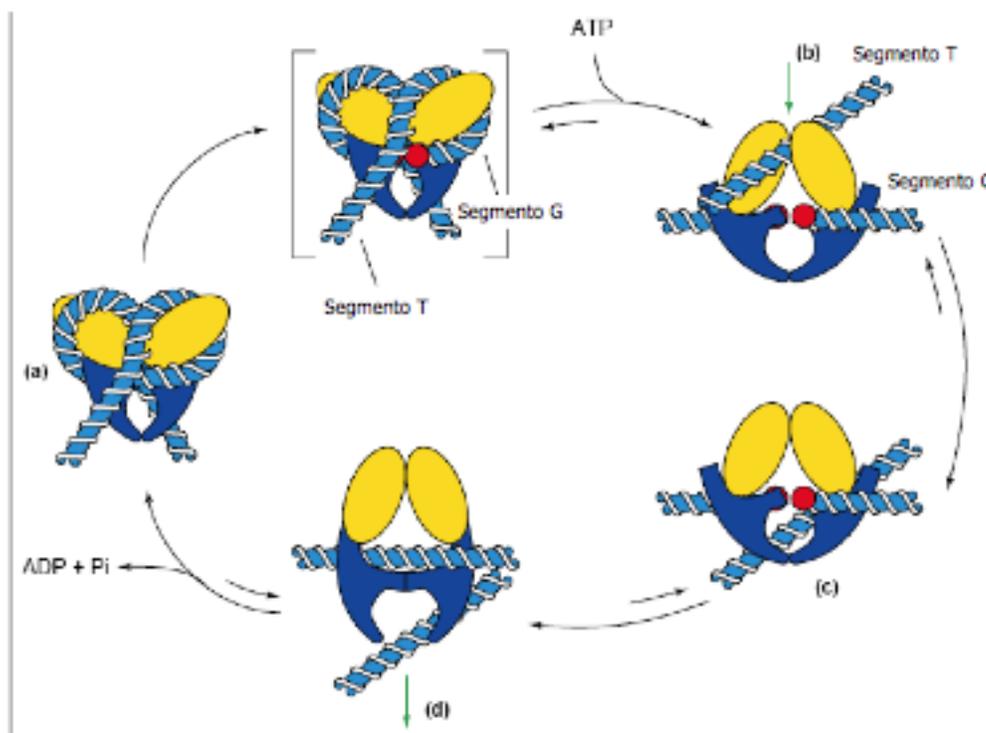


Figura 4. Mecanismo de acción de la ADN girasa (Tomado de Couturier y col., 1998).

Las FQs se unen reversiblemente al complejo de ruptura ADN-girasa (Fig. 5) inhibiendo el religamiento de las hebras y liberando el ADN roto, cuya acumulación puede ocasionar la muerte celular (Vetting y col., 2006).

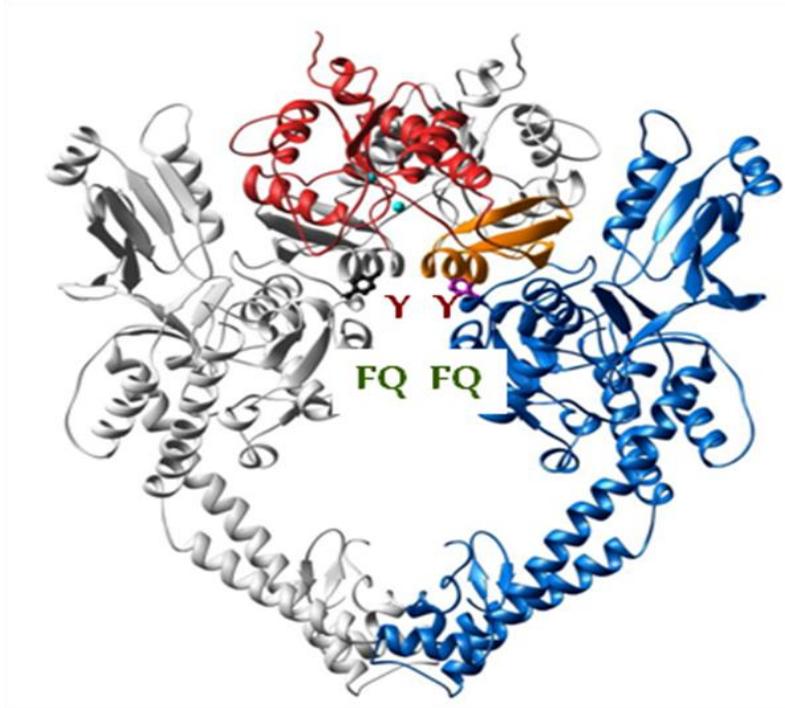


Figura 5.- Interacción de la fluoroquinolonas con la ADN girasa (Tomado de <http://mcb.berkeley.edu/labs/berger/structures.html>, 2009).

Se han reportado que mutaciones en el gen *gyrA* confieren resistencia a las FQs y que la ADN girasa es la diana funcional y los monómeros de GyrA, las dianas primarias. En la actualidad y debido al aislamiento de mutantes *gyrB* resistentes a las quinolonas, se ha cuestionado que la subunidad GyrA sea la única diana primaria de unión de las quinolonas (Wolfson y Hooper, 1989; Hooper, 1999).

Se han descrito 2 mecanismos implicados el desarrollo de resistencia a FQs en MTB: mutaciones en el blanco y bombas de eflujo.

Si bien la resistencia a las FQs en aislados clínicos de MTB se debe a mutaciones en la región QRDR de *gyrA*, no todos los pacientes que presentan resistencia a estos antibióticos, poseen mutaciones en esta región. Por el contrario, para el gen *gyrB* no se han reportado aislados clínicos de MTB resistentes a las FQs, aún cuando en aislados de laboratorios se han reportado mutaciones para este gen (Ginsburg y col., 2003). Esto implica que deben haber otros mecanismos involucrados en la resistencia a FQs que pudieran incluir: mutaciones fuera de la región QRDR de los genes *gyrA* o *gyrB*, disminución de la permeabilidad de la pared celular a la droga, sistemas de transporte activo de la droga hacia el exterior celular y por último, un posible mecanismo que involucra a una proteína perteneciente a la Familia de los Pentapéptidos Repetidos llamada MfpA (Ginsburg y col., 2003).

1.7.2 Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son un grupo grande y heterogéneo de proteínas que cumplen diversas funciones. Pueden realizar la exportación de varias sustancias sin relación entre sí, incluyendo moléculas tóxicas producidas por el organismo hospedador. Esto indica que podrían tener un papel primordial en la sobrevivencia de las bacterias en su nicho ecológico. Otra de las funciones que se le atribuyen a las bombas de eflujo es la de mediar la resistencia a antibióticos (Piddock, 2006).

Se ha reportado que los antibióticos pueden servir como inductores en la regulación de la expresión de bombas de eflujo. A su vez, los transportadores también pueden ser sobre expresados como resultado de mutaciones en genes reguladores y por lo tanto, pueden desempeñar un papel importante en la resistencia intrínseca a drogas (De Rossi y col., 2006).

1.7.2.1 Bombas de eflujo en Bacterias Gram-positivas y Gram- negativas.

Las bombas de eflujo en bacterias Gram-positivas extruyen los sustratos a través de la membrana interna y están constituidas por una sola proteína. En bacterias Gram-negativas, las bombas se organizan en estructuras complejas de tres componentes, las cuales atraviesan tanto la membrana interna como la externa. Su estructura cuaternaria consiste en un transportador localizado en la membrana citoplasmática, un canal de membrana externa y una proteína de unión ubicada en el periplasma, la cual sirve de puente entre el transportador y la proteína externa. Típicamente los genes que codifican para los sistemas de eflujo en bacterias Gram-negativas se organizan como un operón, como por ejemplo: *acrAB* y *tolC* y *mexXY-oprM* de *Pseudomonas aeruginosa* (Pidcock, 2006).

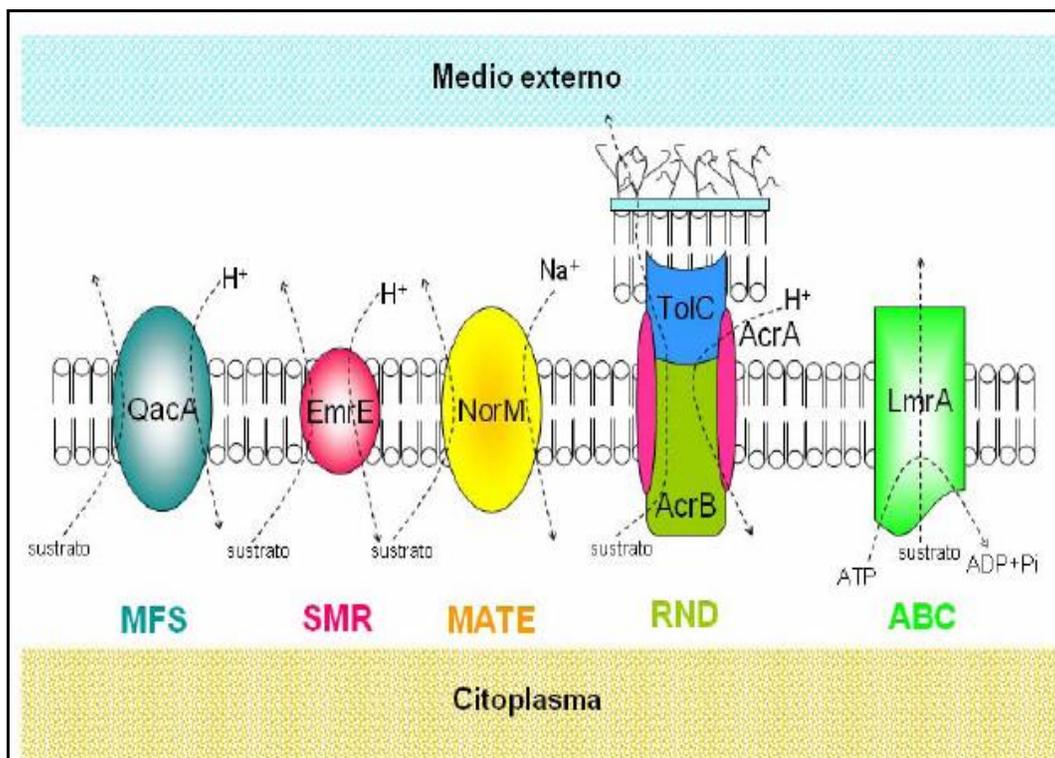


Figura 7. Clasificación de los transportadores involucrados en la resistencia a antibióticos (Tomado de Pidcock, 2006).

Existen cinco familias de bomba de eflujo que se asocian con la multidrogo resistencia, las cuales se enumeran a continuación:

- ABC (**ATP Binding Cassette**)
- MFS (**Major Facilitators Superfamily**)
- MATE (*Superfamily **Multidrug And Toxic-compound Extrusion***)
- SMR (*Family **Small Multidrug Resistance***)
- RND (*Family **Resistance Nodulation Division***)

Estas familias se distinguen entre sí por el número de subunidades que forman parte de la bomba (simple o múltiple), el número de regiones transmembrana, la fuente de energía que utilizan y el tipo de sustrato que reconocen. A continuación se describen las características de cada una de las familias de las bombas de flujo (Piddock, 2006).

1.7.2.1.1 Super familia de transportadores ABC:

Transportan diversas moléculas como iones, aminoácidos, péptidos, drogas, antibióticos, lípidos, polisacáridos, proteínas, entre otros. Estas bombas utilizan ATP como fuente de energía (Schmitt y Tampé, 2002). Además, son factores de virulencia en bacterias, ya que están involucrados en la secreción de toxinas y antibióticos (Davidson y Chen, 2004). Estos transportadores tienen al menos 4 dominios, dos de estos son dominios transmembrana llamados MSD ("**Membrane-Spanning Domains**"), con regiones hidrofóbicas organizadas en seis segmentos transmembrana que constituyen la vía por la cual el sustrato cruza la membrana; y 2 dominios de unión a nucleótidos NBD ("**Nucleotide- Bindings Domains**"), que se encuentran adosados a la

membrana del lado citoplasmático donde el ATP es hidrolizado, permitiendo así la translocación del sustrato (De Rossi y col., 2006).

1.7.2.1.2 Superfamilia de los facilitadores mayores

Transporta azúcares simples, oligosacáridos, inositoles, drogas, aminoácidos, nucleósidos, ésteres organofosforados, metabolitos del ciclo de Krebs y una gran variedad de aniones y cationes inorgánicos (Saier y col., 1999) Las proteínas de este grupo pueden funcionar como uniportes, simportes o antiportes. Se han reportado que en bacterias, los MFS median la resistencia a diversos antibióticos (Poelarends y col., 2002; Wigfield y col., 2002; Godreuil y col., 2003; Bannam y col., 2004). Existen un gran número de estos transportadores caracterizados para *Staphylococcus aureus* como por ejemplo NorA, QacA y QacB, entre otros (Littlejohn y col., 1992).

QacA proporciona un alto nivel de resistencia a diversos compuestos orgánicos tóxicos como bromuro de etidio y una serie de antisépticos y desinfectantes como cetrimida, cloruro de benzalconio y clorhexidina. Así, *S. aureus* parece haber encontrado una forma de eludir la acción de los antisépticos y desinfectantes del medio hospitalario mediante un sistema bien adaptado para la exportación de dichos compuestos (Mitchell y col., 1999, Brown y col., 2001).

1.7.2.1.3 Familia MATE:

Transporta carbohidratos, aminoácidos, nucleósidos e inositol y utilizan el gradiente de protones como fuente de energía para sacar colorantes catiónicos y fluoroquinolonas. En éste grupo encontramos proteínas como NorM de *Vibrio parahaemolyticus* y YdhE de *E. coli*.

1.7.2.1.4 Familia SMR:

Está conformado por sistemas homo-oligomérico (proteínas idénticas) ó hetero-oligoméricos (proteínas diferentes). Las subunidades de estos sistemas están compuestas por 100 ó 120 residuos de aminoácidos. Los miembros de esta familia se caracterizan por tener un sistema de transporte de tipo antiporte (Jack y col., 2001). Un ejemplo de una bomba perteneciente a esta familia es EmrE de *E. coli*, tiene capacidad para conferir resistencia a bromuro de etidio (Yerushalmi y col., 1995 Li y col., 2003).

1.7.2.1.5 Familia RDN:

Están constituidas por 12 TMS y su función está relacionada con en el transporte de moléculas lipofílicas y cationes tóxicos divalentes. Todos los miembros de esta familia catalizan el flujo del sustrato a través de mecanismos de transporte de tipo antiporte. Se encuentran principalmente en bacterias, el mejor ejemplo de esta familia lo constituye AcrAB-TolC de *E coli* y MexAB-OprM de *P. aeruginosa*. En bacterias Gram-positivas, los sistemas RDN son más simples, sólo tienen un componente situado en la membrana citoplásmica al igual que las bombas de la MFS.

1.7.2.2 Bombas de eflujo identificadas en micobacterias

A partir de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* en 1998, Cole y colaboradores determinaron que este posee un cromosoma en forma circular que contiene $\sim 4.4 \times 10^6$ pb de longitud y un alto contenido de G+C aproximadamente entre (65 y 70 %) (Daffé y Drapper, 1998). El genoma contiene ~ 4.400 genes, clasificados en 11 grupos funcionales. Hasta el momento, un 52% de estos genes se les ha atribuido

una función precisa o putativa, mientras que el 48% restante no tienen función específica (Camus y col., 2002; Cole y col., 2002; Smith, y col., 2003) y se estima que es el 2,5 % del genoma del mismo está constituido por transportadores del tipo ABC (Braibant y col., 2000).

El papel de los transportadores ABC en la resistencia intrínseca a FQs en *M. tuberculosis* empezó a atraer la atención de la comunidad científica a partir del año 2002. Justamente durante ese año, Choudhuri y colaboradores caracterizaron funcionalmente el operón putativo denominado *drrAB* en *M. tuberculosis*. DrrA es una proteína de unión a ATP, mientras que DrrB es una proteína integral de membrana. La expresión de estos genes en *M. smegmatis* confiere resistencia a un amplio rango de antibióticos como etambutol, norfloxacin y estreptomycin. Se cree que el papel fisiológico de las proteínas Drr en *M. tuberculosis* puede ser la exportación de complejos lipídicos al exterior celular.

En ese mismo año se demostró que la resistencia a ofloxacin en una cepa de laboratorio mutante de *M. smegmatis* está relacionada con los altos niveles de transcripción y con la amplificación del gen *pstB* que codifica para una subunidad de unión a nucleótido putativa que forma parte de un sistema de transporte del tipo ABC específico para fosfato. Cuando el gen *pstB* es inactivado, disminuye la entrada de fosfato al interior celular y hay una hipersensibilidad a ofloxacin. Esto sugiere que el sistema PstB, además de estar involucrado en el transporte de fosfato, está relacionado con la salida activa de esta fluoroquinolona (Bhatt y col., 2000).

En *M. tuberculosis* existe un gen homólogo a *pstB*, llamado Rv0820, que también está involucrado en la incorporación de fosfato hacia el interior celular cuando

hay condiciones de agotamiento del mismo, lo cual pone de manifiesto que podrían existir transportadores involucrados en la salida activa de FQs y transporte de fosfato en *M. tuberculosis* (De Rossi y col., 2006).

En este sentido Pasca y colaboradores en el año 2004, realizaron la caracterización funcional de un operón compuesto por los genes: Rv2686c-2687c-2688c en *M. tuberculosis*. Estos genes codifican para proteínas que conforman un transportador de tipo ABC que confiere resistencia a fluoroquinolonas como ciprofloxacina, norfloxacina y esparfloxacina cuando es clonado y sobreexpresado en un plásmido multicopia en *M. smegmatis*. El nivel de resistencia a FQs disminuye en presencia de tres inhibidores de bombas de flujo como reserpina, CCCP (carbonilcianuro de m-clorofenilhidrazona) y verapamil.

El análisis de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* realizado por De Rossi y colaboradores en el año 2002, permitió la identificación de 16 marcos de lectura que codifican para presuntas bombas de eflujo pertenecientes a la familia de transportadores MSF. Una de estas bombas está codificada por el gen Rv1634, la cual incrementa la resistencia a varias FQs como norfloxacina y ciprofloxacina cuando se sobre expresa en *M. smegmatis*.

La primera bomba de tipo MSF identificada en *M. smegmatis* y capaz de transportar FQs hidrofílicas hacia el exterior celular fue LfrA ("Low-level Fluoroquinolone Resistance") (Takiff y col., 1994). Sin embargo, no hay un gen homólogo a LfrA en el genoma de *M. tuberculosis*, así que deben existir otras bombas de eflujo que estén involucradas en la resistencia a FQs en este microorganismo (De Rossi y col., 2006).

En *M. smegmatis* se ha reportado que la proteína LfrA confiere bajos niveles de resistencia a FQs, pero sólo si es sobre expresada. Dos posibles mecanismos pueden dar lugar a un mayor nivel de expresión de LfrA, pueden ser:

1. Mutaciones a nivel de un gen que codifica para una proteína reguladora que permita la expresión constitutiva del gen *lfrA*.

2. La inducción transitoria de esta bomba por sustratos (Sander y col., 2000).

En el año 2006, De Rossi y colaboradores reportaron que la interrupción del gen *lfrA* disminuyó la CMI para ciprofloxacina, lo cual parece indicar que desempeña un papel importante en la resistencia intrínseca a esta FQ.

La evaluación de la secuencia ubicada hacia el extremo 5' del gen *lfrA* en *M. smegmatis* demostró la presencia de un marco de lectura abierto de 570 pb que codifica para una proteína de 195 aminoácidos llamada LfrR, que pertenece a una familia de reguladores transcripcionales. Se comprobó que la delección de este gen aumenta la expresión de *lfrA*, lo cual trae como consecuencia el aumento de la resistencia a ciprofloxacina, norfloxacina y acriflavina, demostrando así que *lfrA* está controlado por el regulador transcripcional LfrR (Li y col., 2004).

1.7.3 Familia de los Pentapéptidos Repetidos (PRPs)

En el año 2001, Montero y colaboradores reportaron una proteína perteneciente a la Familia de los Pentapéptidos Repetidos, llamada MfpA por "*Mycobacterial Fluoroquinolone Resistance Protein*", involucrada en la resistencia intrínseca de *M. smegmatis*. Esta proteína tiene un 67% de homología con MfpA de MTB (MtMfpA), que

también pertenece a la familia de pentapéptidos repetidos (Hedge y col, 2006; Montero y col, 2001).

La Familia de los Pentapéptidos Repetidos está compuesta por 500 miembros entre los Dominos Bacteria y Eucaria que se caracterizan por tener dominios de aminoácidos repetidos en tanda, cuya secuencia consenso es [S, T, A, V] [D, N] [S, T, R] [G]. En el año 1995, Black y col., reportaron la primera proteína que ahora se conoce posee motivos de pentapéptidos repetidos, llamada HgIK. Esta proteína posee 727 aminoácidos, 36 motivos de pentapéptidos repetidos en tanda (rico en leucina y alanina [ADLSG]) y fue aislada de *Anabaena* sp. Esta cianobacteria es capaz de formar heterocistos cuando no hay disponibilidad de las formas reducidas de nitrógeno. La mutagénesis química de la cepa PCC 7120, permitió la identificación de mutantes incapaces de formar la capa externa de glicolípidos. Mediante un análisis de complementación de funciones, se identificó que el gen *hgIK* era el responsable de restituir el fenotipo mutante. Esta proteína tendría como función el transporte o el ensamblaje de glicolípidos en el heterocisto y cuatro dominios transmembrana, los cuales podrían estar involucrados en el anclaje de la proteína a la membrana del mismo (Black y col., 1995).

En 1998, Martínez y colaboradores reportaron una proteína con 218 residuos de aminoácidos llamada QnrA ("Quinolone-Resistance"), codificada en un plásmido conjugativo (pMG252) aislado de una cepa de *Klebsiella pneumoniae* resistente a FQs en EUA. Se demostró que dicha proteína está involucrada en el aumento de la resistencia a ácido nalidíxico y ciprofloxacina. Desde entonces, no sólo se han encontrado plásmidos transferibles que confieren la resistencia a FQs en *K.*

pneumoniae en los Estados Unidos, sino que también se han encontrado genes *qnr* en aislados de otras Enterobacterias resistentes a FQ en China, Hong-Kong, Korea, Francia, Alemania y Egipto (Vetting y col., 2006).

La proteína Qnr fue caracterizada por Tran y Jacoby en el año 2002. Ellos demostraron que *in vitro* dicha proteína protegía tanto a la ADN girasa como a la topoisomerasa IV de *E.coli* de los efectos inhibitorios de las FQs. Más recientemente demostraron que Qnr compite con el ADN para unirse a la ADN girasa (Tran y col., 2005). Sugirieron que la proteína consistía en 218 residuos de aminoácidos con 40 dominios de pentapéptidos que se repiten en tanda. Estos investigadores evaluaron la habilidad de Qnr para revertir la inhibición de la actividad de la girasa ocasionada por las FQs, demostrando así que la proteína protege a la ADN girasa de *E. coli* de la inhibición por ciprofloxacina.

Tres años más tarde se encontró un gen homólogo a *qnr* que codifica para una proteína llamada QnrS, en un asilado clínico resistente a múltiples drogas en *Shigella flexneri* en Japón. Se comprobó que tiene un 59% de identidad con QnrA y que confiere resistencia a quinolonas en *E. coli* cuando el plásmido es transferido por conjugación (Hata y col., 2005). Otra proteína perteneciente a la familia Qnr, encontrada en Enterobacterias como: *Citrobacter koseri*, *Escherichia coli*, *K. pneumoniae* en Estados Unidos e India es QnrB, hallándose que esta conserva un 40% de indentidad con QnrA (Nordmann y Poirel, 2005).

Dentro de esta familia también se encuentran la proteína McbG, (Enterobacterias) y MfpA de MTB (Actinomicetes), que se caracterizan por unirse a la

ADN girasa bacteriana y ser capaz de conferir resistencia a ciertas drogas como la microcinaB17 y a las FQs, respectivamente (Jacoby y col., 2003).

La proteína McbG en conjunto con McbE y McbF son las responsable de la resistencia a microcinaB17 en *Escherichia coli*. Las microcinas son una clase de proteínas inhibitorias con un tamaño menor a 10 kDa, presentan el mismo blanco de acción que las FQs. Se ha reportado que McbEFG confiere un bajo nivel de resistencia a fluoroquinolonas como esparfloxacina (Jacoby y col., 2003).

Las mutaciones que confieren resistencia a microcinaB17 recaen en el gen *gyrB*, a diferencia de las FQs, donde ocurren las mutaciones comúnmente en *gyrA*. El gen *mbcG* se encuentra hacia el extremo 3' de los genes *mbcE* y *mbcF* y se cree que en conjunto, exportan la microcinaB17 en desde el citoplasma hacia el exterior celular *E.coli* (Montero y col., 2001).

Un cuarto miembro perteneciente a la Familia de Pentapéptidos Repetidos identificado por Montero y colaboradores en el año 2001, fue la proteína MfpA ("*Mycobacterial Fluoroquinolone Resistance Protein*"), codificada por el gen cromosomal *mfpA* de *M. smegmatis*. Se seleccionó esta cepa resistente a bajas concentraciones de FQs, y se pudo identificar un gen, que expresado en un plásmido multicopia, era responsable del incremento de 2 a 8 veces en los valores de la CMI para ciprofloxacina y esparfloxacina. Este gen codifica para una proteína de 192 aminoácidos, consiste en 32 pentapéptidos repetidos en tanda. El papel de esta proteína se confirmó mediante la delección del gen *mfpA*, demostrándose que esta cepa mutante fue de 2 a 4 veces más sensible a ciprofloxacina y esparfloxacina (Montero y col, 2001).

Por otro lado, en *M. tuberculosis* se encontró un gen llamado Rv3361, que codifica para una proteína de 183 aminoácidos designada como MtMfpA (Fig. 8), que tiene un 67% de identidad con MfpA de *M. smegmatis* (Hedge y col, 2006). La cristalización, expresión y purificación de MtMfpA permitió determinar que esta exhibe características similares al ADN en cuanto a forma, tamaño y carga, generando así una β -hélice, cuyos extremos C-terminales interactúan para formar un dímero. Además, la disposición de los motivos es uno sobre el otro lo que le da la apariencia de cuadrilátero a la estructura adquiriendo así 4 caras que representan a los pentapéptidos repetidos: F1, F2, F3, F4 (Fig. 8). Así mismo, se tiene evidencia de que MtMfpA es capaz de unirse a la girasa, lo que aparentemente la protege del efecto de las FQs (Vetting y col 2006).

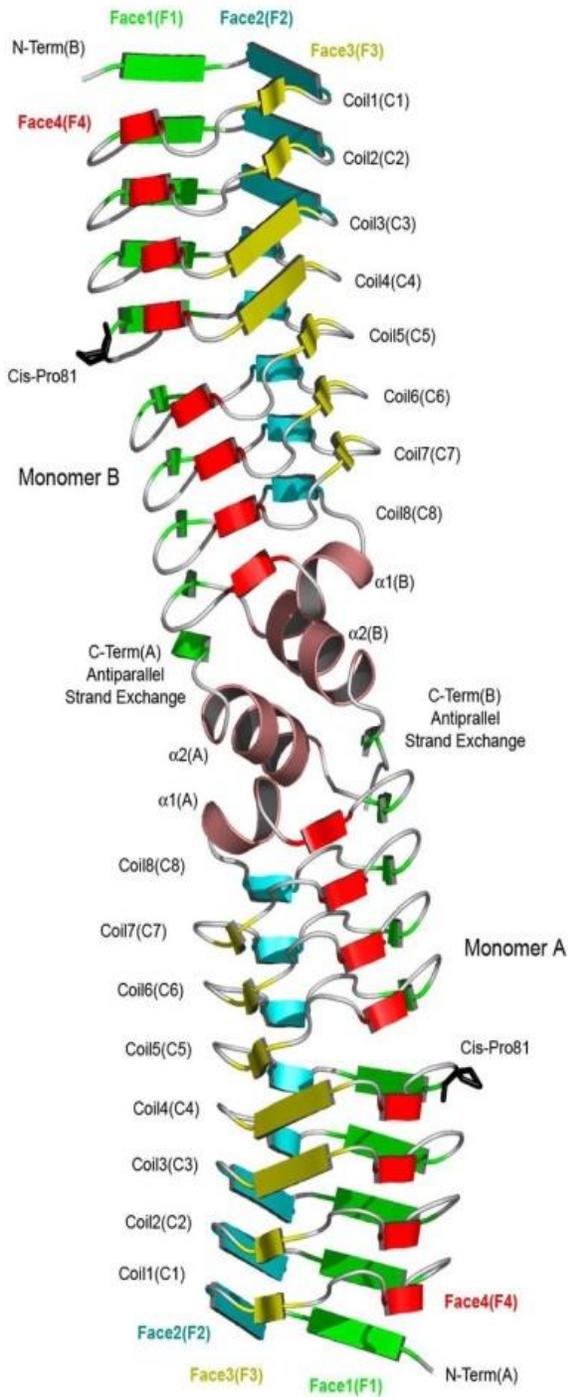


Diagrama del dímero MfpA de *Mycobacterium tuberculosis*. El monómero tiene 8 vueltas completas con 4 lados equivalentes dándole una apariencia de cuadrilátero. Los lados del cuadrilátero están constituidos por una unidad de pentapéptidos repetidos. Cada espiral está compuesta por 4 unidades que se apilan unos sobre los otros, motivo por el cual la proteína adquiere 4 caras. Codifica para una β -hélice, cuyos extremos C-terminal interaccionan para formar un dímero.

Los últimos 20 residuos de aminoácidos ubicados en el extremo C-terminal forman hélices con 2 ($\alpha 1$) y 3 ($\alpha 2$) vueltas, respectivamente.

Figura 8. Estructura tridimensional del pentapéptido repetido MtMfpA (Tomado de Vetting y col, 2006).

La unión de este pentapéptido a la girasa (Fig. 9), permitiría explicar cómo MfpA puede contribuir con la resistencia intrínseca de este organismo a las FQs. MtMfpA es capaz de unirse al dímero GyrA, lo cual podría explicar su actividad inhibitoria sobre la ADN girasa. Se sugiere que esta proteína podría competir con el ADN por la girasa, porque es una hélice con tamaño, forma y distribución de cargas que mimetiza al ADN en forma B. Debido a que las FQs se unen sólo cuando se ha formado el complejo ADN- girasa, la unión de MtMfpA a la misma, podría evitar la formación de dicho complejo, y al mismo tiempo, podría explicar el fenotipo de resistencia (Vetting y *col*, 2005).

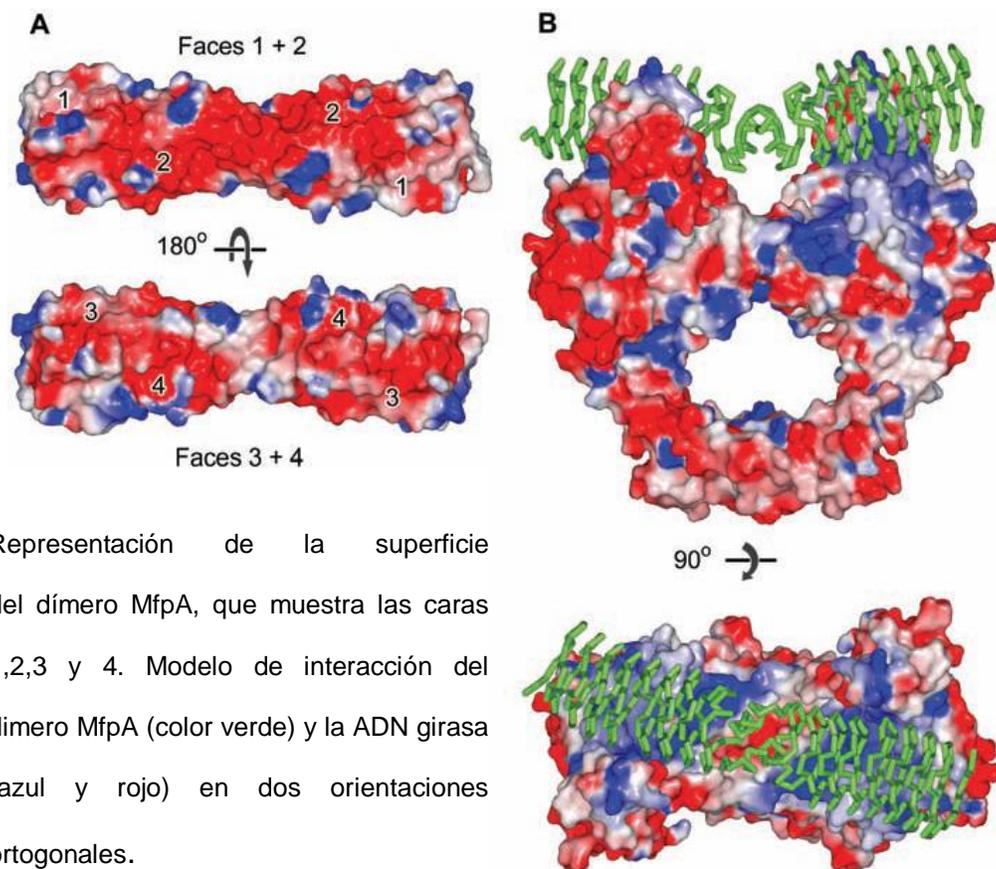


Figura 9. Modelo de la interacción MtMfpA y la ADN girasa (Tomado de Hedge y *col*, 2006).

Con respecto a la función biológica de la proteína MtMfpA, se puede sugerir que la expresión de la proteína podría estar relacionada con la coordinación de la replicación celular con el fin de proveerle asistencia topológica al ADN cuando sea necesario, siempre y cuando se mantenga el cromosoma condensado y se eviten cambios topológicos indeseados durante los períodos de replicación. Se cree que fisiológicamente estos pentapéptidos repetidos pueden ser una clase de reguladores protéicos de unión a ADN. Como consecuencia de ello, la unión de MtMfpA a la subunidad α de la ADN girasa podría inhibir la asociación del ADN a la misma y bloquear la formación del blanco de las FQ, el complejo binario ADN-girasa (Vetting y col., 2006).

Aunque la función de la proteína MtMfpA en la biología de la micobacteria no se conoce, hay algunos indicios que podrían sugerir que su papel es importante. Primero, este gen está presente y es muy similar en todos los genomas micobacterianos (*M. tuberculosis*, *M. smegmatis*, *M. bovis*, *M. ulcerans* y *M. avium*). Segundo, hacia el extremo 5' del gen *mfpA*, hay 4 genes que están altamente conservados en las micobacterias y aparentemente se expresan como parte de la misma unidad transcripcional. Esta organización también se ha encontrado en otros *Actinomycetes*, Familia a la cual pertenecen las micobacterias (Fig. 10) (Vetting y col., 2006).

Por medio del uso de la herramienta de búsqueda de alineamiento básico local entre secuencias de proteínas ("Basic Local Alignment Search Tool", BLASTp), se ha encontrado que el gen que codifica para la proteína Rv3362c de *M. tuberculosis* tiene un 50% de identidad con GTPasas halladas solo en la Familia *Actinomycetes* y todas se encuentran localizadas en conservones.

El gen Rv3363c codifica para una proteína de 122 aminoácidos mientras que Rv3364c para una de 130 aminoácidos, ambas con función desconocida. Rv3365c codifica para una proteína perteneciente a la familia de las histidina quinasa, probablemente asociada a membrana y podría funcionar como una proteína de detección de señal que forma parte de un sistema de dos componentes (Vetting y col., 2006).

Precisamente, en el cromosoma de otro actinomiceto como *Streptomyces coelicolor* A3, este grupo de cuatro genes está presente 13 veces y ha sido llamado conservón (Komatsu y col., 2006). Esta unidad constituida por cuatro genes también ha sido encontrada en otros actinomicetos, con 10 representantes en *Streptomyces avermitilis*, 5 en *Nocardia farcinica* y en *Thermobifida fusca* y 2 en *Kineococcus radiotolerans*. Al presente se conoce que solo hay un solo conservón en micobacterias y es el único que está asociado con un pentapéptido (Vetting y col., 2006).

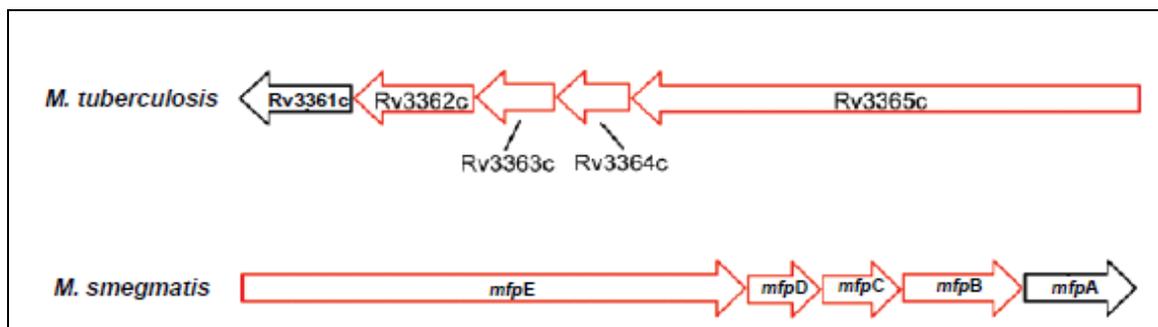


Figura 10. Presunto operón en el que se encuentra el gen que codifica para la proteína MfpA en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*, respectivamente. Los 4 genes resaltados en color rojo son considerados un conservón en otros *Actinomyces* (Modificado de Vetting y col., 2006).

En el 2009, Mérens y col, compararon los efectos que tienen MfpA y QnrB4 en la ADN girasa de MTB y *E. coli*, respectivamente. Empleando ensayos de actividad de topoisomerasa (superenrollamiento y relajación), encontraron que MtMfpA inhibe la actividad catalítica de la ADN girasa de *M. tuberculosis*, mientras que QnrB4 no afecta la actividad de la girasa de *E. coli*. Se determinó que MtMfpA y Qnr exhiben diferentes efectos sobre ADN girasa, lo que sugiere que estas proteínas podrían tener diferentes funciones fisiológicas en la célula bacteriana (Mérens y col., 2009).

2. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la tuberculosis constituye un problema de salud a nivel mundial y que no existe una terapia verdaderamente efectiva que logre erradicar dicha enfermedad, y que asociado a esto, las fluoroquinolonas son los antibióticos que se emplean en personas infectadas con tuberculosis resistente a múltiples drogas, se desea determinar el papel que desempeña la proteína MfpA en el desarrollo de resistencia a estos antibióticos en *M. smegmatis*. Para ello se realizará el etiquetamiento de la proteína codificada por el gen *mfpA* con el epítoto FLAG, con el fin de efectuar un seguimiento de la proteína que a posteriori nos ayude a determinar los niveles de expresión de la misma.

Para desarrollar esta metodología se empleará el epítoto FLAG que consiste en ocho (8) residuos de aminoácidos (A-T-L-A-A-A-L) y se puede fusionar tanto el extremo N-terminal como al C-terminal de la proteína de interés (Einhauer y Jungbauer, 2001). El epítoto FLAG tiene una secuencia corta de aminoácidos por lo que la secuencia de este marcador puede ser incorporada en un solo oligonucleótido sintético.

Para que el sistema de detección de la proteína etiquetada con un epítoto sea eficaz se deben cumplir varios requisitos:

El epítoto añadido no debe interferir con el plegamiento de las proteínas en su forma nativa, la secuencia del péptido debe ser soluble en agua y debe conservar un alto grado de exposición en la superficie de la proteína, de modo que pueda interactuar fácilmente con su ligando. Ambas características las posee el epítoto FLAG (Einhauer y Jungbauer, 2001). Es necesario destacar que se debe llevar a cabo esta construcción

debido a que MfpA tiene poca actividad inmunogénica motivo por el cual no pueden producirse anticuerpos contra MfpA.

Es importante mencionar que debido a que la proteína MfpA de *M. smegmatis* y MTB presentan un alto porcentaje de identidad, los experimentos asociados a este trabajo se llevaron a cabo en la cepa mc²155 de *M. smegmatis* debido a que crece diez (10) veces más rápido que MBT, no es patógena, posee una alta eficiencia de transformación y además los genes de MTB pueden ser expresados en *M. smegmatis*.

El impacto global que ha tenido la *M. tuberculosis* ha influido en el desarrollo de técnicas de manipulación genética, pero existe una alta tasa de recombinación ilegítima que complica la construcción de mutantes por intercambio alélico, como se desea hacer en este trabajo (Kalpana y col., 1991; Aldovini y col., 1993).

Para ello se hará uso de la, que es una herramienta de la ingeniería genética, esta usa las bondades de la y las funciones de los genes *red* del bacteriófago lambda (λ) para llevar a cabo procesos de modificación genética (Sawitzke y col., 2007). Los genes *red* del fago λ pueden favorecer un intercambio genético entre dos moléculas de ADN con regiones homólogas pequeñas. En este trabajo se utilizarán proteínas (gp60 y gp61) del micobacteriófago Che9c, con una gran porcentaje de identidad a las proteínas del fago λ , que aumenta la eficiencia del evento de en micobacterias (van Kessel y Hatfull, 2007).

Para llevar a cabo este proyecto se plantearon los siguientes objetivos:

3.- OBJETIVOS

3.1.- Objetivo General

Construir una cepa mutante de *Mycobacterium smegmatis* que contenga el epítotope FLAG en el gen *mfpA* con el fin de evaluar la expresión de la proteína a través de Western blot.

3.2.- Objetivos Específicos:

- ✓ Aislamiento de ADN genómico de *M. smegmatis* mc² 155.
- ✓ Amplificar por PCR, la región flanqueante 5' y 3' del gen *mfpA*.
- ✓ Aislar ADN plasmídico del vector de clonamiento pYUB854.
- ✓ Digerir los fragmentos amplificados por PCR y el vector de clonamiento con las enzimas de restricción adecuadas.
- ✓ Llevar a cabo las reacciones de ligamiento, para clonar las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *mfpA* en el vector pYUB854.
- ✓ Transformar en *E. coli* y buscar el clon deseado a través de la digestión del ADN recombinante con las enzimas de restricción adecuadas y a través de secuenciación automatizada.
- ✓ Electroporar la construcción en *M. smegmatis*, donde debe ocurrir una que permita etiquetar al gen *mfpA* con el epítotope FLAG.

- ✓ Evaluar la cepa mutante obtenida por PCR para asegurar que haya ocurrido correctamente el etiquetamiento a nivel cromosomal.
- ✓ Realizar western blot para detectar los niveles de expresión de de la proteína MfpA, usando anticuerpos monoclonales anti FLAG.

4. MATERIALES

4.1 Cepas bacterianas y plásmidos

El material biológico que se utilizó para la realización de este estudio fue la cepa mc²155 de *M. smegmatis* (Tabla IV) . Esta cepa pertenece al Laboratorio de Genética Molecular del Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas.

Además, se utilizó una cepa de *E. coli* denominada XL1-Blue, que tiene un genotipo adecuado para realizar los procesos de transformación (tabla IV).

Tabla III. Descripción de las cepas y los plásmidos utilizadas en el estudio.

Nombre	Descripción	Referencia
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (mc ² 155)	Cepa mutante de <i>Mycobacterium smegmatis</i> sivestre mc ² 6 (ATCC), alta eficiencia de transformación.	Snapper y col., 1990
<i>Escherichia coli</i> XL1- blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac [F⁺ proAB lac^f ZΔM15 Tn10]</i> .	Stratagene
pYUB854 (3893 pb)	Plásmido trasbordador que tiene un origen de replicación para <i>E. coli</i> . Hyg ^r	Bardarov y col., 2002
pJV53()	Plásmido que contiene un <i>oriE</i> y un <i>oriM</i> y posee los genes <i>Che9c gp60</i> y <i>gp61</i> que facilitan la . A partir de un promotor de acetamida. Kan ^r .	Van Kessel y Hatfull, 2007
pYUB412.1 (8562 pb)	Plásmido integrativo. Amp ^r Hyg ^r , <i>oriE int attP</i> .	Barda
pALACE	Plásmido trasbordador con <i>oriE</i> y <i>oriM</i> que tiene un promotor acetamida. Hyg ^r	Cowley y col., 2004

4.3 Estuches comerciales

- QIAquick[®] gel Extraction kit (Qiagen).
- QIAquick[®] PCR Purification kit (Qiagen).
- QIAquick[®] Miniprep quit (Qiagen).

4.4 Marcadores de peso molecular

Para realizar las corridas electroforéticas en geles horizontales de agarosa se utilizaron varios marcadores de peso molecular, a fin de identificar si los productos obtenidos en cada uno de los métodos empleados era el esperado, como por ejemplo, el aislamiento de ADN plasmídico, aislamiento de ADN genómico, amplificación por PCR, digestiones, entre otros. Así como también se emplearon para determinar la concentración de ADN.

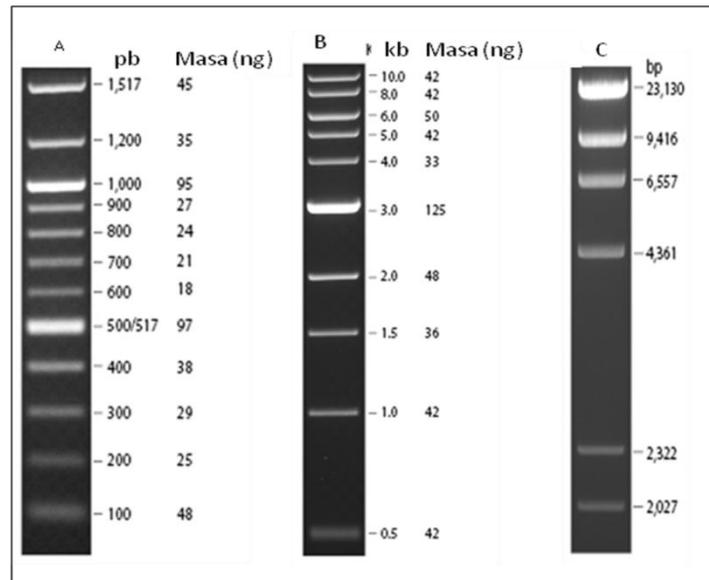


Figura 12. Macadores de peso molecular utilizados para realizar las corridas electroforéticas en geles horizontales de agarosa. A. MPM 100 pb DNA ladder. B. 1kb ladder; C. λ /HindIII.

4.5 Composición de medios

TABLA IV. Componentes de medios de cultivo

Medio	Componentes	Esterilización
<p>7H9 (medio líquido) <i>M. smegmatis</i> Becton and Dickinson Company</p>	<p>Ácido L-glutámico, citrato de sodio, piridoxina, biotina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, citrato de amonio férrico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato de cobre, OAD 10% Tween 0,05%</p>	<p>Autoclave 121 °C durante 15 min. 15 Libras</p>
<p>7H10 (medio sólido) <i>M. smegmatis</i> Becton and Dickinson Company</p>	<p>Ácido L-glutámico, citrato de sodio, clorhidrato de piridoxina, biotina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, citrato de amonio férrico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato de cobre, verde de malaquita, agar, OAD 10%, Tween 0,05%.</p>	<p>Autoclave 121°C durante 15 min. 15 libras</p>
<p>OAD</p>	<p>Acido oléico, cloruro de sodio, glucosa, albúmina</p>	
<p>Caldo LB (Luria-Bertani) <i>E. coli</i> ALPHA biosciences</p>	<p>Cloruro de sodio Extracto de levadura Bactotripton</p>	<p>Autoclave 121°C durante 15 min. 15 libras</p>

5. MÉTODOS

5.1. Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis*.

Partiendo de una colonia aislada de *M. smegmatis* se colocó un preinóculo con 5 ml de 7H9/OAD y se incubó a 37°C, con agitación durante tres (3) días. De este precultivo se tomó una alícuota para inocular 100 ml de 7H9 y se incubó a 37°C con agitación hasta que el cultivo alcanzó una Abs_{600nm} 0,8. Este fue centrifugado a 3000xg durante 20 min y al sedimento celular obtenido, se le añadieron 3 ml de buffer TE (Tris 10 mM pH 7.4 y EDTA 1mM pH 8.0) y 300 μ l de lisozima (10 mg/ml) para luego incubarlo durante 1 hora a 37°C. Una vez transcurrido ese tiempo, se añadieron 420 μ l de SDS (10%) y 36 μ l de proteinasa K (10 mg/ml) y se incubó a 65°C durante 10 min. Luego se le añadieron 600 μ l de NaCl (5N) y 480 μ l de CTAB (5%) y se incubó durante 10 min a 65°C. La suspensión fue centrifugada y se tomó la fase acuosa a la cual se le agregó un volumen de cloroformo: alcohol Isoamílico (25:1). Posteriormente se centrifugó durante 20 min a 8000xg. Se tomó la fase acuosa, se le agregaron 0,6 volúmenes de isopropanol y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Seguidamente se centrifugó a 10000xg durante 20 min y una vez transcurrido este tiempo, se lavó con etanol (70%) y se centrifugó a 10000xg durante 20 min. Finalmente el sedimento fue resuspendido en 50 μ l de agua y se almacenó a -20°C hasta su uso. La integridad y el rendimiento del ADN obtenido fue evaluado en un gel de agarosa al 0.8%.

5.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

La técnica de PCR fue llevada a cabo según el protocolo estándar para la enzima Phusion DNA Polymerase (*FINNZYMES*) con desoxinucleótidos trifosfatos

(dNTPs) [200 μ M]; una solución amortiguadora 5x Phusion GC Buffer [1x] que contiene Tris-HCl (pH 7.4 a 25 °C), EDTA [0.1mM], DTT [1mM], KCl [100mM], MgCl₂ [7.5mM] estabilizados con BSA 200 μ g/ml y glicerol al 50 %; DMSO (3%); Phusion™ ADN polimerasa [0,02 U/ μ L]; iniciadores (0,5 μ M) de cada uno y 1 pg-10 ng de ADN por 50 μ l de reacción. La PCR se llevó a cabo empleando ADN genómico de *M. smegmatis* con el fin de amplificar las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *mfpA* (fig.13). Los cebadores empleados se encuentran en la tabla V.

Tabla V. Cebadores empleados en la PCR

GEN	NOMBRE	SECUENCIA	Temperatura de hibridación
<i>MfpA</i>	KomfpA F1	5'-TTTTTT <u>AAGCTT</u> GCTGCCCGGCTGAGGCTT*	62°C
<i>MfpA</i>	KomfpA R1	5'-TTTTCTCGAGGACTAC GAACAGTAGCAGCAGGAACATCAGG TACCTGCTCGCGGTGAGAAAC-3'	62°C
<i>mfpA</i>	KomfpA F2	5'-TTTTTT <u>GGTACC</u> GACGTCCACGCCGAATACGC-3'	62°C
<i>mfpA</i>	KomfpA R2	5'-TTTTTT <u>CTTAAG</u> CCGGCGCAGGCAAGTCGACG-3'	62°C
<i>mfpA</i>	KomfpA R2 Nuevo	5'-TTTTTT <u>CTTAAG</u> CCGTGCGCAGGCTGGTTTTTCG-3'	62°C
<i>mfpE</i>	<i>mfp5</i> Pacl F	5' - TTTTTTTTAATTAATACCGGTATTCGGCGCGAT - 3'	71.5°C
<i>mfpA</i>	<i>mfp10</i> Pacl R	5' - TTTTTTTTAATTAATAAACCTAGCCGCCGTGGA - 3'	71.5°C
<i>mfpB</i>	<i>mfpB</i> FLAG R:	5' CTGTGTCATCGTCGTCCTTGTAGTCCAC AAGCCTCAGCCGGGC - 3'.	71.5°C
<i>mfpA</i>	<i>mfpA</i> FLAG F	5' GTGGACTACAAGGACGACGATGACAAG CGTATAGGGGCAAACGGC GA-3'.	71.5°C
<i>mfpB</i>	<i>mfpBA</i> F	5'-CGC GGCCGCAATTAACCCTCA- 3'	64°C
<i>mfpA</i>	<i>mfpBA</i> R	5'-GGAGCTGGCCGCGCCCTC- 3'	64°C
<i>mfpA</i>	<i>mfpA</i> RT-PCR R1:	5'-GAGCGTGAAGTCGCACTCGA-3'	64°C
pYUB412.1	412secF	5'GGA GCT GGC CGC GCC CTC 3'	63.5°C
pYUB412.1	412secR	5' CGC GGC CGC AAT TAA CCC TCA 3'	63.5°C

*La secuencia subrayada indica los sitios de restricción específicas para cada fragmento.

** En el cebador reverso 5' se encuentra la secuencia que codifica para el epítotope **FLAG**

El programa utilizado en el termociclador 2720 Thermo Cycler de Applied Biosystems, es el que se indica en la tabla VI.

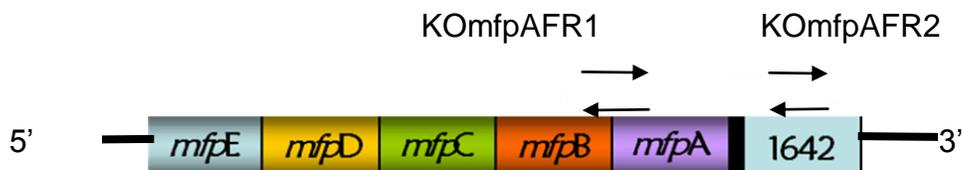


Figura 13. Esquema del operón de *mfpEA* de *M. smegmatis* indicando los sitios donde hibridan los cebadores.

TABLA VI. Condiciones de la reacción en cadena de la polimerasa

Fase del PCR	Condiciones del PCR (Temperatura y tiempo)
Desnaturalización inicial	98°C durante 3 min.
Paso 1: Desnaturalización	98°C durante 30 seg
Paso 2: Hibridación	62°C durante 30 seg
Paso 3: Extensión	72°C durante 40 seg
Extensión final	72°C durante 10 min
Almacenamiento	4°C ∞

35 ciclos

La amplificación de los fragmentos de la PCR se evaluó mediante geles horizontales de agarosa al 1.5%.

5.3. Aislamiento de ADN plasmídico mediante lisis alcalina.

Uno de los métodos más comunes para el aislamiento de ADN plasmídico, consiste en lisar las células bacterianas mediante un choque alcalino. Para iniciar este protocolo se colocó una colonia en 5 ml de caldo LB suplementado con higromicina (150 µg/ml), el cual fue incubado a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las células a 4000xg durante 5 min, se descartó el

sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de solución I (glucosa 50 mM, EDTA 10mM y buffer Tris 25mM, pH 8.0). Posteriormente, se incubó durante 5 min a temperatura ambiente y a continuación, se le agregaron 400 µl de solución de lisis II (NaOH 0.2 M y SDS al 1%, se mezcló por inversión y se incubó 5 min en hielo. Luego se agregaron 300 µl de solución III (acetato de potasio 3M y ácido acético 5M); e igualmente se mezcló e incubó 5 min en hielo. Se centrifugó nuevamente la mezcla durante 10 min a 12000xg y el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, al cual se agregaron 500 µl de isopropanol puro (100%). Luego de una nueva centrifugación durante 10 min a 12000xg, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 200 µl de TE. Seguidamente se añadió cloruro de litio (5M) y se incubó la mezcla durante 5 min a -20°C, ésta fue centrifugada a 12000xg durante 10 min, se recogió el sobrenadante y se transfirió a un tubo nuevo.

Consecutivamente, se agregaron 240 ml de isopropanol puro (100%) y se incubó la mezcla durante 5 min a temperatura ambiente, la cual se centrifugó a 12000xg durante 15 min para luego eliminar el sobrenadante. El sedimento fue lavado con 500 µl de etanol (70%) y se centrifugó durante 10 min a 4°C a 12000xg. Para culminar el protocolo se resuspendió el sedimento en 50 µl de agua con RNasa (10 µg/ml) y luego se incubó durante 30 min a 37°C. Para evaluar la eficiencia del aislamiento se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0.8%.

5.4 Extracción de ADN plasmídico mediante ebullición

Se colocó una colonia transformante en 1 ml de caldo LB suplementado con higromicina (150 µg/ml) y se incubó a 37°C con agitación durante la noche. Al día siguiente, se centrifugó durante 10 min a 13000xg, se descartó el sobrenadante y el sedimento celular se resuspendió en 110 µl de STET (sacarosa (8%); Triton X-100 (0,5%), EDTA [50mM], Tris-HCl [50 mM]; pH 8,0) más lizosima (10 mg/ml), se homogenizó la mezcla y se hirvió durante 45 segundos. Luego se centrifugó durante 15 minutos a 13000xg, se extrajo el sedimento y al sobrenadante se le agregaron 110 µl de isopropanol (100%) y se dejó 5 min a temperatura ambiente. Finalmente se centrifugó durante 15 minutos a 13000xg y el sedimento se resuspendió en agua.

5.5. Digestión del DNA plasmídico y de los fragmentos de PCR con enzimas de restricción.

Para llevar a cabo las digestiones con enzimas de restricción; se calculó la concentración del ADN empleando el marcador de peso molecular 1kb ladder (Fermentas), que también es un indicador de masa. Posteriormente, se ajustaron las unidades de enzima(s) a la concentración del mismo y se mezclaron los siguientes componentes: agua destilada (hasta completarse el volumen deseado), buffer adecuado para la(s) enzima(s) que se va(n) a emplear; albúmina sérica bovina BSA [1X] y el ADN plasmídico o los productos de PCR, seguidos de la(s) enzima(s) de restricción. Las digestiones fueron incubadas durante un tiempo mínimo de 3 horas a 37°C.

Las enzimas que se utilizaron fueron: *HindIII*, *XhoI*, *KpnI*, *AflI* y *PacI* (New England Biolabs).

5.6. Reacciones de ligamiento

Para llevar a cabo las reacciones de ligamiento entre los productos de PCR y el vector de clonamiento, se efectuó una mezcla que incluía los siguientes componentes: enzima T4 ADN ligasa (NEB), buffer T4 ADN ligasa [1X]. Esta preparación se mezcló con los fragmentos de ADN amplificados por PCR y el vector de clonamiento previamente digeridos y en una relación molar 3:1. Esta reacción fue incubada a 16°C durante la noche.

5.7. Preparación de células competentes

Para llevar a cabo la preparación de células competentes, se colocaron 0,25 ml de *E.coli* XL1-Blue previamente crecida durante la noche a 37°C en 25 ml de LB y se cultivó con agitación hasta alcanzar una DO_{600} 0,5 (aproximadamente $1,5 \times 10^8$ cel/ml). Esta suspensión fue centrifugada a 4000xg a 4°C durante 15 min, para luego descartar el sobrenadante. El sedimento se resuspendió en 5 ml de $MgCl_2$ (50 mM) y se colocó en hielo durante 10 min. Posteriormente, se volvió a centrifugar durante 15 min a 4000xg, a una temperatura de 4°C y luego de descartar el sobrenadante; se resuspendió el sedimento en 10 ml de $CaCl_2$ (50 mM). Finalmente esta mezcla se colocó en hielo durante 30 min y se centrifugó durante 15 min a 4000xg en frío, se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 2 ml de una solución de $CaCl_2$ (50 mM) (Hanahan, 1983).

5.8. Transformación en *E. coli* mediante choque térmico

Se tomaron las células *E. coli* XL1-Blue químicamente competentes y se les agregó el ADN de interés. Esta mezcla se mantuvo durante 15 min en hielo. Seguidamente se aplicó un choque térmico a 42°C durante 45 seg. La suspensión se colocó en hielo y se incubó durante 2 min. Pasado este tiempo, se le agregó 1 ml de medio LB y posteriormente la mezcla fue incubada durante 1 hora a 37°C. Culminado este tiempo, se sembraron 100 µl de la mezcla en placas de agar LB con el antibiótico correspondiente.

5.9. Electroforesis horizontal de ADN en geles de agarosa y registro de imágenes

Para visualizar la integridad y el rendimiento del ADN se utilizaron geles de agarosa en buffer TBE 1X (Tris 0,089 mM; ácido bórico 0,089 mM y EDTA 0,002 mM). Dicha solución se calentó hasta que la agarosa quedó totalmente disuelta y se le agregó bromuro de etidio (0,5 µg/ml) y luego se colocó en una cámara de electroforesis horizontal. Después se cargaron los bolsillos del gel con una mezcla de ADN y buffer de carga [6X] que contiene: azul de bromofenol 0,25%, glicerol 30%, xylene cyanol 0,25% y agua destilada. Se emplearon como marcadores de peso molecular 100 pb ADN ladder (NEB) y λ / *Hind*III (NEB) (Fig. 12), a fin de estimar el peso molecular de las muestras (Sambrook y Russell, 2001). Una vez cargado el ADN en el gel, se aplicó una diferencia de potencial y se procedió a la visualización de las bandas del ADN a través de un transluminador con luz UV (FOTODYNE incorporated) a 360nm. Finalmente, se realizó el registro de

la imagen con una cámara fotográfica (OLYMPUS OPTICAL CO.) usando Doc-It versión 2.2.0 (2003).

5.10. Electroporación en *Mycobacterium smegmatis*

Se suplementó el medio de cultivo 7H9 con una alícuota proveniente de un pre-inóculo de *M. smegmatis* mc²155, se dejó crecer a 37°C con agitación hasta alcanzar una DO_{600nm} entre 0,5 y 1,0. Luego se transfirió el cultivo a un tubo cónico y se incubó en hielo durante 10 min. Este cultivo se centrifugó a 4000xg a 4°C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se realizaron 2 lavados con 45 ml de glicerol (10%) frío. Se centrifugó a 4000xg a 4°C durante 10 min y finalmente el sedimento celular se resuspendió en 5 ml de glicerol (10%) frío. Para cada alícuota de ADN a electroporar se añadieron 400 µl de la suspensión celular y dicha mezcla se incubó en hielo durante 10 min. Luego, la cubeta se colocó en la cámara de seguridad para aplicarle un pulso de corriente con las siguientes características: 2,5 kV, 1000 Ω de resistencia y 25 µF de capacidad. Seguidamente las células fueron transferidas a un tubo cónico de 15 ml que contenía 2 ml de medio 7H9 y se incubaron a 37°C durante 3 horas. Luego, el cultivo se centrifugó a 2000xg durante 10 min, se descartó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 0,5 ml del medio remanente. Finalmente, se sembraron 200 µl de la suspensión celular sobre placas de 7H10 suplementadas con el antibiótico adecuado y fueron incubadas a 37°C durante 3 días.

5.11 Preparación de células electrocompetentes de *M. smegmatis* (van Kessel y Hatfull, 2007).

Se inició un preinóculo en 5 ml de medio 7H9 suplementado con kanamicina (25 µg/ml), a partir de una colonia de la cepa mc²155 previamente electroporada con el vector pJV53 y se incubó durante 3 días en agitación a 37°C. Pasado ese tiempo, se colocaron 100 µl del preinóculo en 100 ml de 7H9 suplementado con kanamicina y succinato (0.2%) y se incubó a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, cuando la DO_{600nm} alcanzó 0.4, se agregó acetamida (0.2%) y esta mezcla se incubó durante 3 horas en agitación a 37°C e inmediatamente se colocó 1 hora en hielo. En seguida la suspensión se trasvasó a un tubo cónico de 50 ml y se procedió a realizar una centrifugación durante 10 min a 4000xg. Luego se realizaron varios lavados con glicerol al 10%, el primer lavado se efectuó con 50 ml de glicerol, luego con 25 ml; con 12,5 ml; con 10 ml y finalmente con 4 ml y en este volumen se resuspendieron las células y se almacenaron a – 80°C. Una vez obtenidas las células electrocompetentes se procedió a realizar el proceso de electroporación descrito previamente.

5.12 Preparación del fragmento de ADN lineal a electroporar (van Kessel y Hatfull, 2007)

Se realizó la linearización del vector pYUB854 usando los sitios de restricción que se utilizaron para clonar las regiones 5' y 3' (en este caso se utilizaron las enzimas *XhoI* y *AflI*). Esta digestión se purificó con el estuche comercial QIAquick^R PCR Purification kit (Qiagen). Seguidamente el ADN fue cuantificado en un gel de agarosa empleando el marcador de masa molecular 1 kb ladder (New England Biolabs).

Una vez obtenido el fragmento que se desea recombinar con el cromosoma de *M. smegmatis*, se transformaron 100 ng del mismo en 100 µl de las células electrocompetentes bajo las mismas condiciones del protocolo de electroporación

(punto 7.10). Esta mezcla se resuspendió en 1 ml de medio 7H9 y se incubó a 37°C durante 4h. Finalizado este tiempo, se sembraron 100 µl de la mezcla en las placas con los antibióticos correspondientes y se dejaron incubando durante 4 días a 37°C.

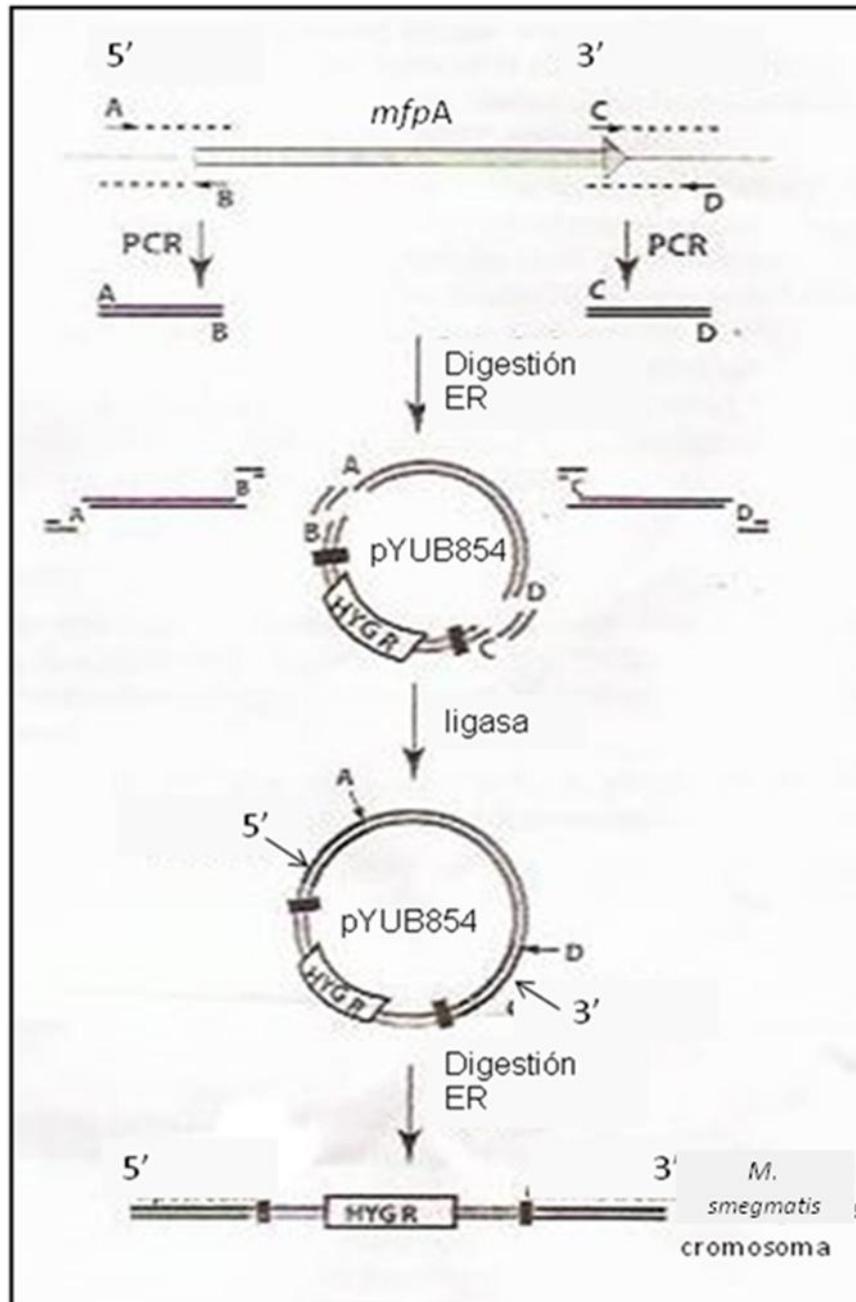


Figura 14. Estrategia de clonamiento de las regiones 5' y 3' del gen *mfpA* en pYUB854, regiones homólogas necesarias para que ocurra el intercambio alélico (Van Kessel y Hatfull, 2007).

5.13 EXTENSIÓN POR SOLAPAMIENTO MEDIANTE PCR

Se decidió cambiar de estrategia para realizar el etiquetamiento de la proteína mediante la técnica de extensión por solapamiento mediante PCR. Para dicho marcaje se diseñaron nuevos cebadores (Tabla V), que tuvieran incorporada la secuencia del epítipo de esta forma al realizar la amplificación del operón (Fig. 15) que contiene al gen *mfpA*; este quedaría etiquetado.

De esta forma se amplificaron las siguientes regiones:

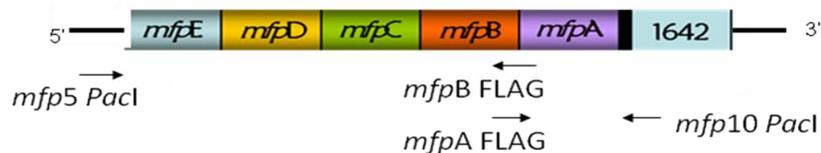


Figura 15. Esquema del operón *mfpEA* de *M. smegmatis* indicando los sitios donde hibridarán los cebadores empleados en la nueva estrategia, extensión por solapamiento mediante PCR.

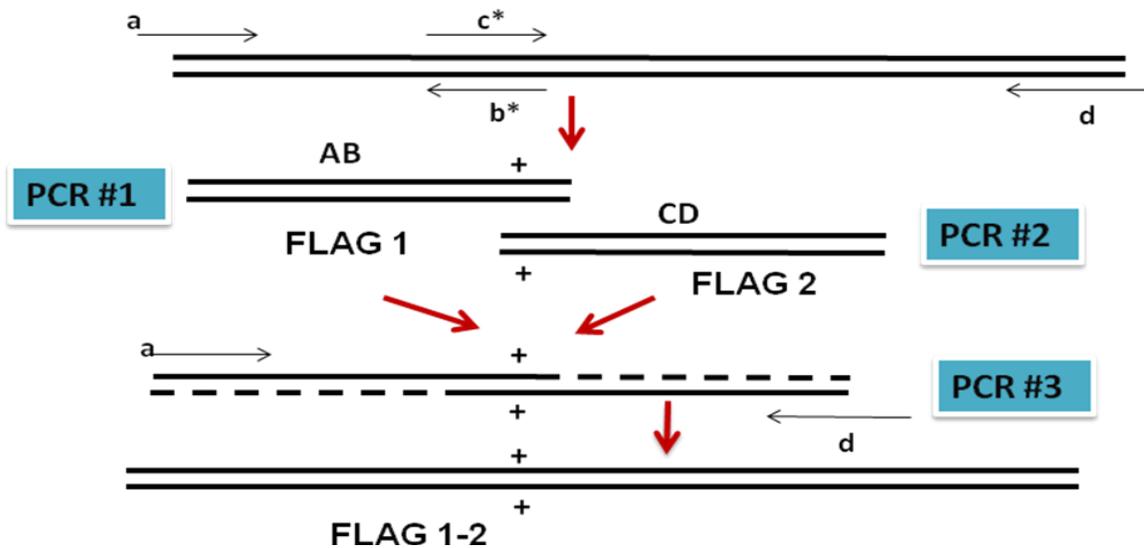


Figura 16. Esquema de la estrategia utilizada para etiquetar el gen *mfpA* con el epítipo FLAG mediante la técnica de extensión por solapamiento mediante PCR.

Esta técnica se basa en obtener mediante un par de PCRs convencionales e independientes, dos productos primarios (AB y CD) etiquetados con una secuencia de

interés (+) (Fig. 16), que a su vez sean complementarias; para que al realizar una tercera reacción de PCR se obtenga el producto final de ambos amplificados con la secuencia de interés incorporada por solapamiento.

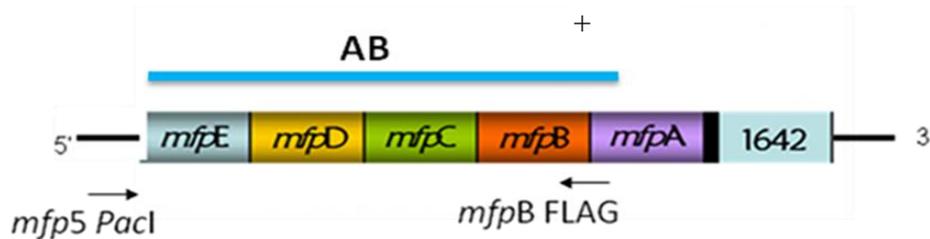


Figura 17. Esquema del operón *mfpEA* de *M. smegmatis* indicando los sitios donde hibridarán los cebadores y el primer fragmento amplificado (FLAG 1).

Para llevar a cabo dicha estrategia se amplificaron los fragmentos de interés (FLAG1 y FLAG2) que se utilizaron como ADN molde en la tercera PCR, donde ocurrirá la extensión por solapamiento mediante PCR. En primer lugar, se amplificó la secuencia correspondiente al primer fragmento al cual llamamos FLAG1, que contiene los genes *mfpE-B* correspondiente al segmento AB en la figura 16, resultando así etiquetando con el epítipo FLAG hacia su extremo 3', mientras que hacia su extremo 5' quedó incorporado el sitio *PacI*, con los cebadores indicados en el figura 17.

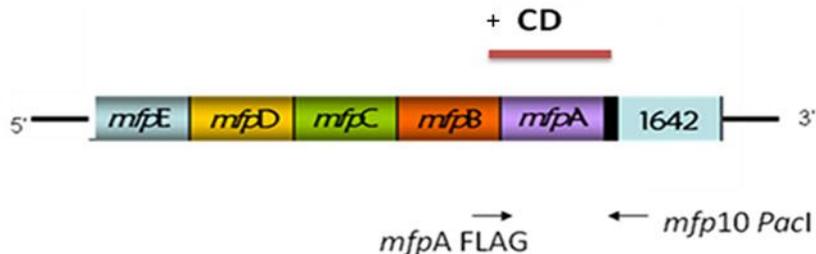


Figura 18. Esquema del operón *mfpEA* de *M. smegmatis* indicando los sitios donde hibridarán los cebadores para el segundo fragmento (FLAG 2).

De la misma forma se realizó una amplificación por PCR del segundo fragmento al cual, denominamos FLAG2, que a diferencia de FLAG1 queda etiquetado con el epítipo hacia su extremo 5' mientras que, hacia su extremo 3' se incorpora el sitio de reconocimiento de la enzima *PacI*. Una vez obtenidos los dos productos esperados, se realizó una PCR con los cebadores *mfp5PacI* y *mfp10PacI* a fin de que ocurra un solapamiento entre los amplificados debido a la complementariedad de bases existentes entre ellos y generar así el amplificado completo del operón *mfpE-A* al cual llamamos FLAG1-2. Se trabajó con todo el operón con el fin de que la proteína *mfpA* se expresara a partir de su propio promotor ubicado hacia el extremo 5' del gen *mfpE*. Se incorporará el sitio de reconocimiento para la enzima *PacI*, porque dicho fragmento será clonado en ese mismo sitio en el vector pYUB412.1 (Fig. 19).

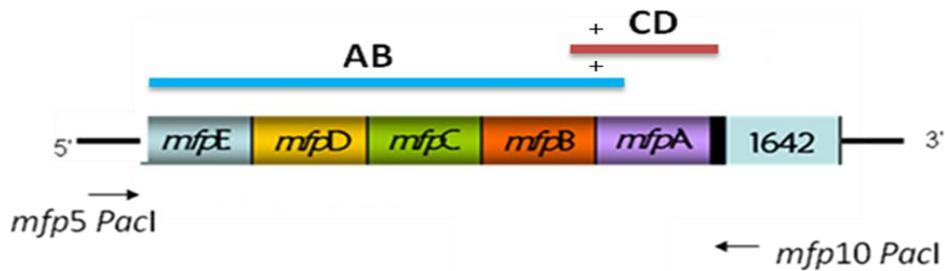


Figura 19. Esquema del operón *mfpEA* de *M. smegmatis*, indicando los fragmentos AB (FLAG1) y CD (FLAG2), utilizados como ADN molde para la PCR donde ocurrió el solapamiento de los genes del epítipo FLAG).

Todos los amplificados fueron secuenciados a fin de corroborar que efectivamente contenían el epítipo FLAG.

5.14 Defosforilación del vector de clonamiento pYUB412.1

Para evitar la posible circularización y la ligación intramolecular, los vectores digeridos con endonucleasas de restricción se desfosforilaron mediante un tratamiento con fosfatasa alcalina de camarón (Shrimp Alkaline Phosphatase) PROMEGA. Las fosfatasas alcalinas se utilizan para prevenir la recircularización del vector mediante la eliminación de grupos fosfatos en ambos extremos 5' terminal. Para ello se incubó a 37°C durante 8 min. la siguiente mezcla de reacción:

- ADN del vector digerido (150 ng).
- Buffer de la fosfatasa alcalina (SAP) 10X Tris-HCl (50mM) pH 7,6 a 4°C y MgCl (10mM).
- Fosfatasa alcalina SAP (1U/μl)
- Agua ultra pura.

Inactivación por calentamiento a 65 ° C durante 15 minutos.

Luego de realizar las reacciones de ligamiento pertinentes, se transformó y se buscó el clon deseado que contuviera el fragmento FLAG1-2. Dicho clon fue corroborado por PCR, ensayos de restricción y secuenciación. Luego se realizó la electroporación en *M. smegmatis* de la misma forma que el punto 7.10, para que el ADN recombinante pYUB412.1 + FLAG1-2 se integre en el sitio *attP*, sitio de integración de los genes del fago. La integración se efectúa por un evento de recombinación sitio-específica mediado por la integrasa (Int) codificada por el micobacteriófago L5 y por proteínas del huésped llamadas factores de integración (IHF), generando dos copias del operón *mfpEA*, una que tenga incorporado el epítipo

FLAG (en este caso es la mutante que se integró al genoma de *M. smegmatis*) y otra copia que se corresponde con los loci silvestres.

5.15. Western blot

Se realizó un western blot con el fin de detectar la expresión de la proteína MfpA usando anticuerpos monoclonales α -FLAG (Sigma). Para ello se realizó una lisis bacteriana partiendo de 5 ml de cultivo 7H9/OAD, al cual se agregaron 200 μ l de buffer PBS con lisozima (2 mg/ml) y un inhibidor de proteasas Protease Inhibitor Cocktail EDTA-free (1.3X) (*PIERCE*) y se incubó 2 horas y media a 37°C. Pasado este tiempo se trasvasó el contenido a un tubo de 2 ml que contenía perlas de zirconio con un diámetro de 0,1 mm dándole 6 pulsos de 30 segundos cada uno en un Homogenizador (Fast-prep FP120- Bio101 Thermo electron corporation) con descansos de 1 minuto en hielo entre pulso y pulso. Este aparato es un equipo especializado en la extracción de DNA, RNA y proteínas en todo tipo de muestras biológicas, siendo un dispositivo versátil, eficiente y rápido que permite aislar ácidos nucleicos y proteínas de las muestras más complicadas. Luego, la mezcla se centrifugó a 13000xg durante 10 minutos y se trasvasaron 50 μ l a un tubo de 1,5 ml y se volvió a centrifugar bajo las mismas condiciones. Finalmente se tomaron 30 μ l de la mezcla y se agregaron 40 μ l de buffer de carga (Coomassie brilliant blue R-250 (0,1%), ácido acético glacial (10%) metanol (50%) y agua) y se hirvió durante 2 minutos. Seguidamente se realizó una electroforesis empleando geles de poliacrilamida al 12%, en condiciones disociantes.

5.15.1 Geles de poliacrilamida 12% en condiciones disociantes

Es una técnica que permite separar las proteínas según su movilidad electroforética en función de la longitud de la cadena polipeptídica o peso molecular.

Está compuesto de dos geles de distinta porosidad y pH, que cumplen funciones diferentes, para aumentar el poder de resolución. En el gel separador, la movilidad es restringida por el tamaño del poro, el cual depende del porcentaje del gel.

Para la preparación del gel separador o inferior y el gel compactador o superior (5 ml, grosor = 0,1 mm), se mezclaron los siguientes reactivos, según el porcentaje de gel deseado.

TABLA VII. Soluciones empleadas para realizar el gel de poliacrilamida al 12%

Soluciones	Componentes (ml) por gel	
	Gel de resolución (separador) 10ml	Gel compactador 4ml
H ₂ O	3,3	2,7
Acrilamida 30%	4,0	0,67
Tris pH 8.8 (1,5M)	2,5	0,5
SDS 10%	0,1	0,04
Persulfato de amonio (10%)	0,1	0,04
TEMED (N,N,N',N'-tetrametimetilenediamina)	0,004	0,004

Una vez que el primer gel ha polimerizado, se procede a colocar sobre este el segundo gel o gel compactador, con una concentración de poliacrilamida y

amortiguador diferentes al gel separador. Este gel compactador tiene dos propósitos: servir de soporte para cargar las muestras y concentrar a las proteínas de la muestra en un solo punto, de forma tal que las proteínas entren al gel separador uniformemente y su movimiento dentro de él no se vea afectado por un retraso en la entrada al mismo.

Cuando este gel polimeriza, se pone todo el sistema en contacto con el buffer de corrida [Tris (25mM), Glicina pH 8.3, SDS (0,1%) y H₂O].

Luego la corrida electroforética se reveló con azul de Coomassie (brillante mancha azul) para un litro:

- 6 Coomassie Brilliant Blue R250 3 gramos
- 7 MetOH: H₂O (1:1 v/v) 45%
- 8 Ácido acético glacial 10%
- 9 Agua destilada 45%

5.15.2 Transferencia a la membrana de nitrocelulosa

Una vez que se corrió el gel de poliacrilamida, se realizó la transferencia de las proteínas a la membrana de nitrocelulosa (nitrato de celulosa) (*ADVANTEC*) y se incubó en el buffer de transferencia durante 15 min a 4°C; luego se realizó la electrotransferencia, utilizando corriente eléctrica para trasladar las proteínas del gel hacia la membrana de nitrocelulosa en el Trans Blot SD SEMI DRY TRASFER CELL (*BIORAD*) bajo las siguientes condiciones: 3 V durante 20 min. Seguidamente se dejó bloqueando durante toda la noche en buffer PBS+ Tween₂₀ 0,1% y leche descremada al 5%. Al día siguiente, se realizaron 3 lavados con buffer PBS y Tween₂₀ 0,1% en intervalos de 15 min, para lavar la membrana del buffer de bloqueo y poder incubar

con el anticuerpo anti-FLAG (*SIGMA*) (1:5000) durante una hora en agitación. Luego se repitió el lavado por triplicado con Tween₂₀ 0,1% 3 con intervalos de 15 minutos, para incubar con el segundo anticuerpo anti-ratón (*PIERCE*) (1:10000) durante una hora. Finalmente se realizaron los últimos 3 lavados con buffer PBS y Tween₂₀ al 0,1% en intervalos de 15 minutos; para revelar con diaminobenzidina (*SIGMA*).

Buffer de transferencia (Composición):

1. Glicina 39 mM
2. Tris base 48mM
3. SDS 0,037%
4. Metanol 20%

Buffer PBS (Composición):

- NaCl 137mM
- KCl 2,7mM
- Na₂HPO₄ 10 mM
- KH₂PO₄ 2mM
- H₂O
- Ajustar el pH a 7,4 con HCl

5.16 Secuenciación de los productos amplificados por PCR

La secuenciación de los amplificados fue realizada en el Centro de Secuenciación y Análisis de Ácidos Nucléicos (CeSAAN), ubicado en el Centro de

Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Se utilizó el secuenciador modelo ABI 3130XL (*Applied BIOSYSTEMS*).

Por exigencias del CeSAAN, el material biológico utilizado para secuenciar debe estar hidratado solamente con agua bidestilada esterilizada, no se debe utilizarse Tris-EDTA y debe llegar al laboratorio en condiciones de almacenamiento adecuadas (máximo 4°C). Las cantidades de ADN que se requieren, dependen del tipo y tamaño del ADN.

Se utilizaron los iniciadores que se emplearon para realizar las reacciones de PCR, y otros cebadores internos (tabla VI) a una concentración de 5 pmol/μl.

5.17 Análisis de las secuencias de nucleótidos y aminoácidos

La búsqueda de similitudes entre las secuencias obtenidas, con las secuencias nucleotídicas reportadas, fue realizada comparándolas en la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI). Esto se llevo a cabo vía internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) empleando los servicios de Basic Local Alignment Search Tool (BLAST). También se utilizó el programa Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

6. RESULTADOS

6.1 Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis*

Mediante la electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, se corroboró la integridad del ADN genómico aislado de *M. smegmatis*. A partir de este ADN se procedió a realizar la amplificación de los fragmentos flanqueantes hacia el extremo 5' y 3' del gen *mfpA* que se deseaban clonar en el vector pYUB854.

Como se observa en la figura 20, el ADN genómico aislado (carril 2) se encuentra íntegro y en concentración adecuada para usarlo como templado en la PCR.

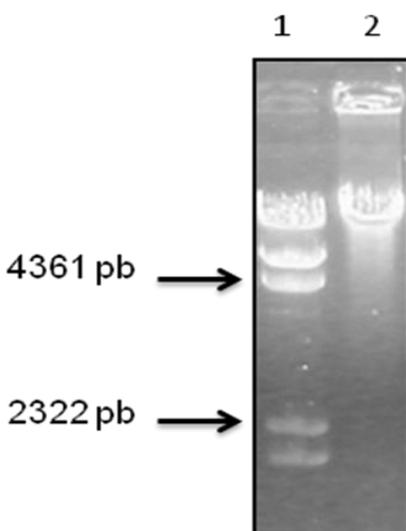


Figura 20. Registro fotográfico del aislamiento del ADN genómico de *M. smegmatis*. Carril1: MPM λ /HindIII; Carril2: ADN genómico mc²155. Corrida electroforética en gel de agarosa al 0.8%.

6.2 PCR para amplificar los extremos 5'y 3' del gen *mfpA*

La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con los iniciadores KOMfpAF1 y KOMfpAR1; KOMfpAF2 y KOMfpAR2 que se indican en la tabla V, a

partir de los cuales se amplificaron las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *mfpA* respectivamente. En la figura 21, se observa que el ADN obtenido en la reacción en cadena de la polimerasa tiene el tamaño esperado. Para corroborar estos resultados se aislaron las bandas del gel con el QIAquick® gel Extraction kit (Qiagen) y se secuenciaron (Figs. 22 y 23).

Los tamaños esperados para los amplificados son:

- Extremo 5' del gen *mfpA* → KOMfpA-FR1 650 pb
- Extremo 3' del gen *mfpA* → KOMfpA- FR2 648 pb.

En los carriles 2 y 3 (Fig. 21) se observa el amplificado obtenido en la PCR para KOMfpAFR1 y en los carriles 4 y 5 (Fig. 21) el producto de PCR adquirido para KOMfpAFR2; ambos productos tienen un peso aproximado al esperado, encontrándose entre las bandas de 600 y 700 pb del marcador de peso molecular que se encuentra en el primer carril (Fig. 12 A).

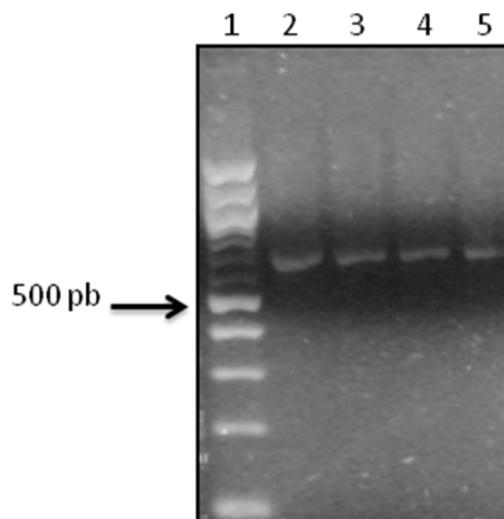


Figura 21. Registro fotográfico del producto de PCR obtenido a partir del ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis*. Carril1. Marcador de peso 100 pb DNA ladder de (NEB); Carril2: KOMfpAFR1; Carril3: KOMfpAFR1; Carril4: KOMfpA-FR1; Carril5: KOMfpAFR2. Corrida electroforética en gel de agarosa al 2%.

Las secuencias obtenidas tanto para el fragmento KOmfpAFR1 (Fig. 22), como para el fragmento KOmfpAFR2 (Fig. 23), muestran la correspondiente homología con la secuencia nucleotídica de los genes *mfpA* y 1642 (*M. smegmatis*) respectivamente, los cuales fueron empleados como ADN molde en la PCR para amplificar los extremos 5' y 3' del gen *mfpA*.

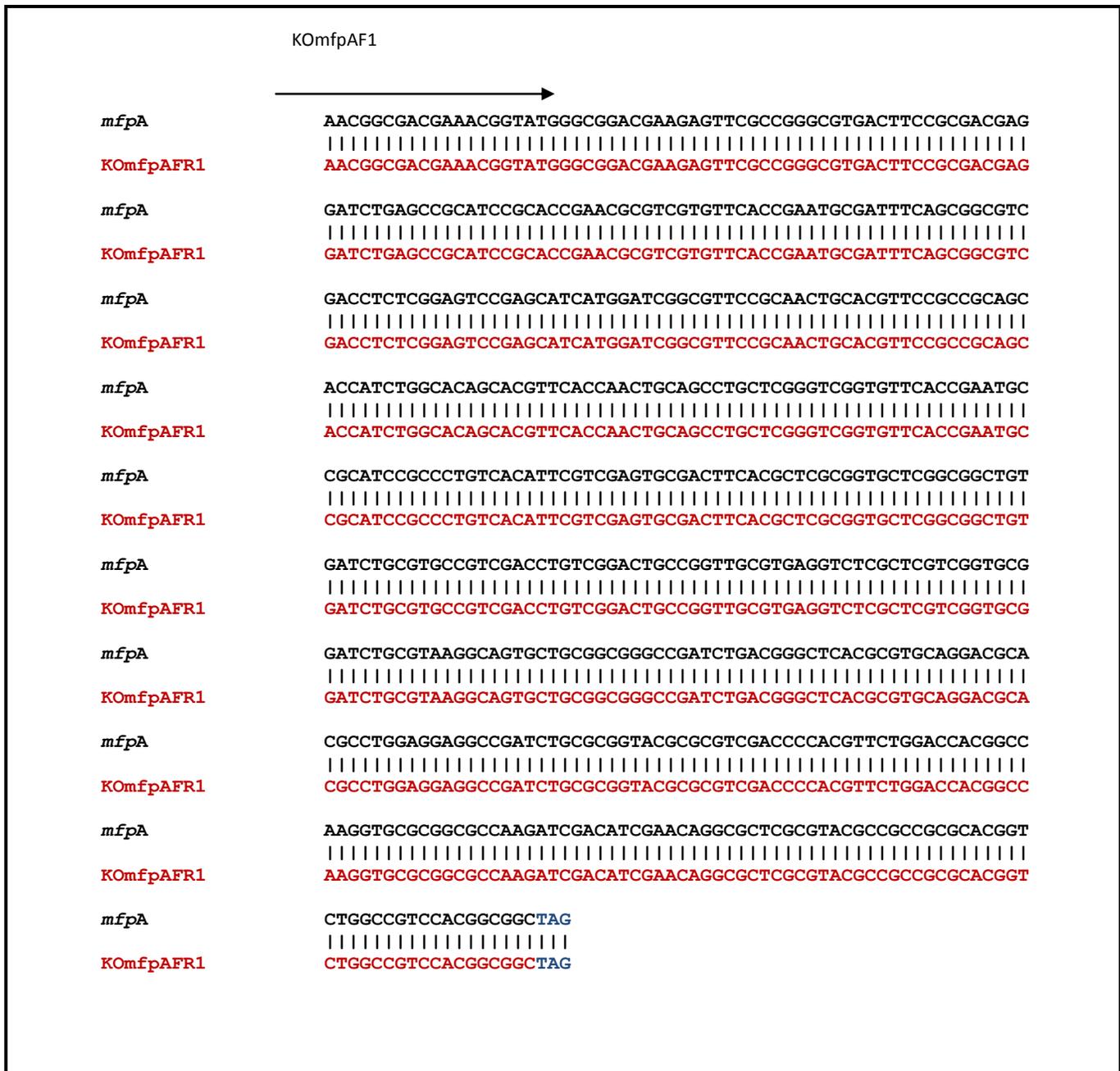


Figura 22. Alineamiento de la secuencia obtenida en amplificación por PCR del gen *mfpA* hacia su extremo 5' al cual llamamos (KOMfpAFR1). El cebador empleado para su secuenciación fue KOMfpAF1 (tabla V), que se muestra en la figura con una flecha negra. En negro se distingue la secuencia superior que pertenece al gen *mfpA* (ADNg de *M. smegmatis*) con el que se realizó la homología. TAG codón de terminación de *mfpA*

6.3 Aislamiento de ADN plasmídico del vector de clonamiento pYUB854

Para seguir la estrategia de clonamiento, se realizó el aislamiento de ADN del vector de clonamiento pYUB854 (Bardarov y col., 2002). Como se observa en la figura 24, el ADN plasmídico aislado se encuentra íntegro, pues podemos distinguir que el plásmido migra en las tres conformaciones esperadas (lineal, mellada y circular).

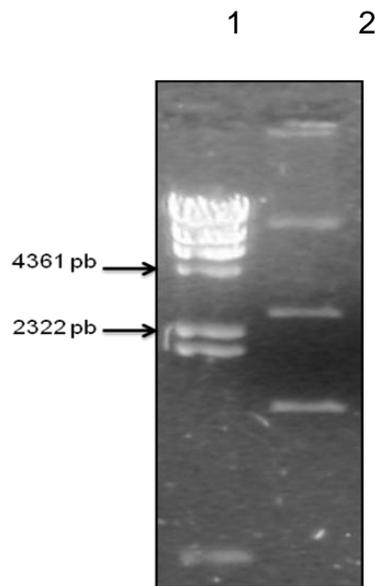


Figura 24. Registro fotográfico del aislamiento del ADN plasmídico del vector de clonamiento pYUB854. Carril1: Marcador de peso molecular λ HindIII; Carril2: pYUB854. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0,8%.

6.4 Digestión con enzimas de restricción

Una vez obtenidos los fragmentos mediante la técnica de PCR y al mismo tiempo el vector de clonamiento (pYUB854), se procedió a la digestión con las enzimas de restricción adecuadas.

El clonamiento se realizó en 2 partes, inicialmente se realizaron las pruebas de ligamiento correspondientes tanto para vector como a los productos amplificados por PCR, a fin de comprobar la efectividad de la digestión con las enzimas de restricción adecuadas. Luego se a clonó primeramente el fragmento KOmfpAFR1, para ello se utilizaron las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*, con las cuales también fue digerido pYUB854. Una vez obtenido dicha construcción al cual llamamos pYUB854-KOmfpAFR1, se efectuó el clonamiento correspondiente al extremo 3' del gen *mfpA*. Para ello, se realizó una prueba de ligamiento para comprobar la eficiencia de la digestión, pero con las enzimas respectivas. Esta consistió en realizar la digestión del amplificado KOmfpAFR2, con cada enzima (*KpnI* y *DraI*) por separado y luego realizar una reacción de ligamiento con la enzima T4 ADN ligasa, a fin de comprobar la formación de dímeros que revelen la efectividad de la digestión de los productos de PCR.

La construcción de esta cepa mutante de *M. smegmatis* no tuvo éxito para el segundo amplificado (KOmfpAFR2), debido a que este no estaba siendo digerido por la enzima de restricción *DraI*.

Esto se corrobora en la figura 25, donde las digestiones de los amplificados con las enzimas de restricción seleccionadas para el clonamiento por separado y ligados, no generan los dímeros deseados ya que, se esperaba la formación de una banda de aproximadamente 1300 pb para la digestión con la enzima *DraI* no fue lograda, mientras que para *KpnI*, se consiguió una exitosa digestión debido a la formación de dímeros que se observa en el segundo carril de la figura 25.

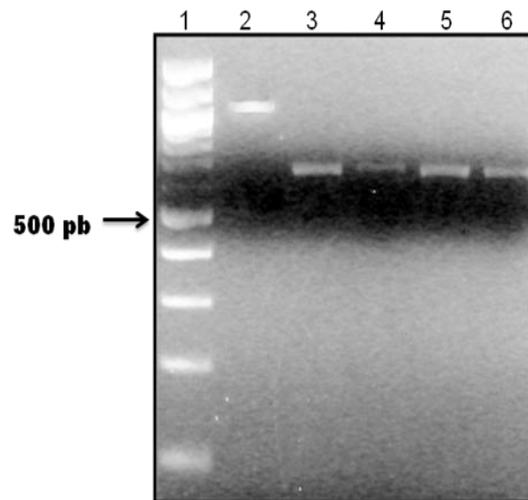


Figura 25. Registro fotográfico de las pruebas de ligamiento de los productos obtenidos en la PCR; Carril1: Marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder; Carril2: KOMfpAFR2/*kpnI* + T4 DNA ligasa; Carril 3: KOMfpAFR2/*KpnI*; Carril 4: KOMfpAFR2/*DraI* + T4 DNA ligasa; Carril 5: KOMfpAFR2/*DraI*; Carril 6: KOMfpAFR2 sin digerir. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 1.5%.

Por esta razón se decidió modificar el sitio de restricción para el amplificado KOMfpAFR2, cambiando la enzima *DraI* por *AflI*. Una vez obtenidas las digestiones y purificadas mediante el estuche comercial QIAquick[®] gel Extraction kit (Qiagen), se procedió a realizar la reacción de ligamiento entre el fragmento KOMfpAFR2 y pYUB854-KOMfpAFR1, que previamente se encontraban digeridos con las enzimas de restricción correspondientes.

6.5 Transformación en *E. coli* XL1-Blue

Se obtuvieron transformantes en placas de LB suplementadas con higromicina. De estas colonias se obtuvo un lisado celular, que permite realizar el aislamiento de ADN de forma rápida. Para comprobar que la construcción se logró con éxito, se procedió a realizar una digestión con enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* para el fragmento KOMfpAFR1 y *AflI* y *KpnI* para KOMfpAFR2 (Fig. 26)

6.6 Digestión con enzimas de restricción para verificar la construcción.

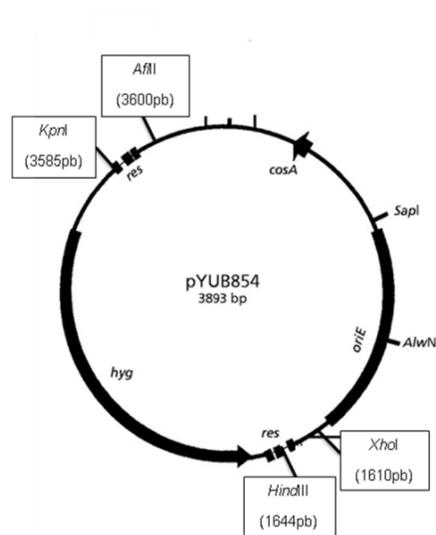


Figura 26. Sitios de corte de las enzimas de restricción utilizadas para la estrategia de clonamiento en el vector pYU854.

Al realizar el ensayo de restricción con las enzimas *HindIII* y *XhoI* en los sitios de reconocimiento que se observan en la figura 26, se tiene que del vector pYUB854 se libera un fragmento de aproximadamente 34 pb, por lo que tamaño esperado para el primer clon pYUB854-KOmfpAFR1 es de 4509 pb. Lo mismo ocurre para la segunda construcción, para clonar KOmfpAFR2 en pYUB854-KOmfpAFR1, se libera un segmento de 15 pb, por lo que el tamaño esperado para la construcción final es de 5143 pb.

En concordancia con el párrafo anterior se realizó un ensayo de restricción para comprobar la efectividad del primer clonamiento pYUB854-KOmfpAFR1 (Fig. 27). En el carril 2 y 3 se tienen, el vector de clonamiento sin digerir y digerido respectivamente respectivamente, seguido de este se observan los presuntos clones obtenidos pYUB854-KOmfpAFR1-1 y pYUB854-KOmfpAFR1-2 sin digerir en los carriles 4 y 6, mientras que en los carriles 5 y 7 tenemos a los mismos clones digeridos con las

enzimas *XhoI* y *HindIII*, donde se liberaban el fragmento de 650 pb correspondiente al fragmento KOMfpAFR1 (extremo 5' del gen *mfpA*). En los carriles 1 y 8 se colocaron los marcadores de peso molecular 100 pb DNA ladder (NEB) y λ *HindIII* (NEB) para corroborar los tamaños del ADN recombinante obtenido, así como también la efectividad del ensayo de restricción.

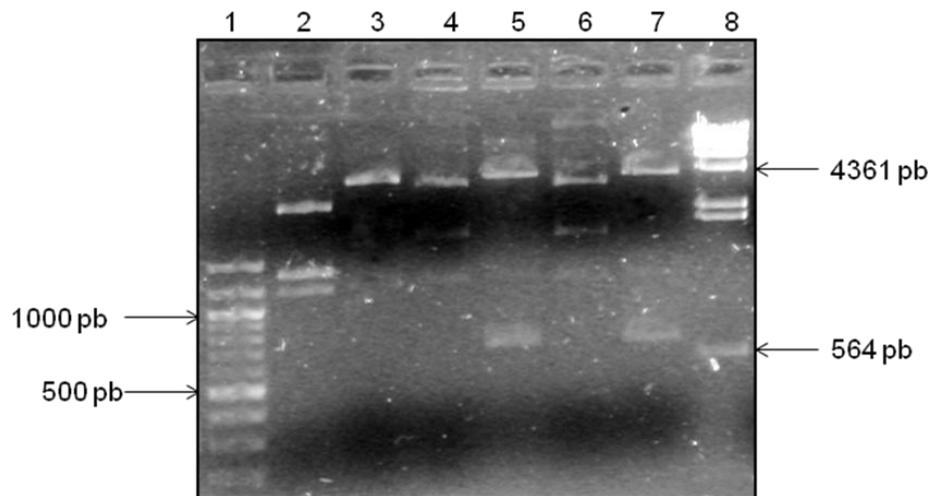


Figura 27. Registro fotográfico de la digestión con las enzimas de restricción *XhoI* y *HindIII* de los posibles clones pYUB854-KOMfpAFR1 y el vector de clonamiento. Carril1: 100 pb DNA ladder; Carril2: pYUB854; Carril3: pYUB854/*HindIII* y *XhoI*; Carril4: pYUB854-KOMfpAFR1-1; Carril5: pYUB854-KOMfpAFR1-1/*HindIII* y *XhoI*; Carril6: pYUB854-KOMfpAFR1-4; Carril7: pYUB854-KOMfpAFR1-4/*HindIII* y *XhoI*; Carril8: λ *HindIII*. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%.

Una vez obtenido el primer clon, se realizó la misma estrategia para incorporar la segunda región flanqueante del gen *mfpA*, en este caso el gen 1642 en la primera construcción pYUB854FR1.

Para ello se emplearon las enzimas de restricción *AflI* y *KpnI* cuyos sitios de reconocimiento en el vector son 3600 pb y 3585 pb respectivamente (Fig. 26).

Luego de realizar las reacciones de ligamiento y transformación correspondientes, se efectuó una doble digestión de estos clones a fin de corroborar que efectivamente el fragmento KOMfpAFR2 había sido clonado. En la figura 28 se

colocaron en orden consecutivo pYUB854, pYUB854-KOmfpAFR1-1 y pYUB854-KOmfpAFR1-FR2 (construcción final con las dos regiones 5' y 3' del gen *mfpA* clonadas en el vector pYUB854) en los carriles 2, 3 y 4 respectivamente. Seguidamente se colocaron los presuntos clones alcanzados con sus respectivos ensayos de restricción con las de restricción *KpnI* y *AflI* en los carriles 5, 7, 9, 11, 13 y 15, donde observamos el segmento de aproximadamente 649 pb correspondiente al fragmento KOmfpAFR2.

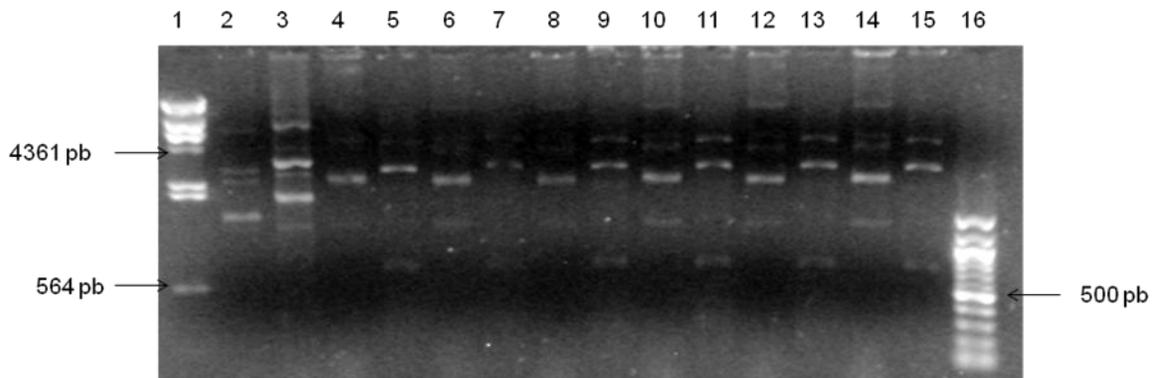


Figura 28. Registro fotográfico de la digestión con las enzimas de restricción *AflI* y *KpnI* de los presuntos clones obtenidos para pYUB854 KOmfpAFR1-FR2 y el vector de clonamiento. Carril1: λ /*HindIII*; Carril2: pYUB854; Carril3: pYUB854-KOmfpAFR1; Carril4: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2 1; Carril5: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2 1/ *AflI* y *KpnI*; Carril6: pYUB854-FR1-FR2- 2; Carril7: pYUB854-FR1-FR2 2/ *AflI* y *KpnI*; Carril8: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-3; Carril9: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-3/ *AflI* y *KpnI*; Carril10: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-4; Carril11: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-4/ *AflI* y *KpnI*; Carril12: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-5; Carril13: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-5/ *AflI* y *KpnI*; Carril14: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-6; Carril15: pYUB854-KOmfpAFR1-FR2-6/ *AflI* y *KpnI*; Carril16: 100 pb DNA ladder. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

Para corroborar que la construcción final obtenida era la deseada se realizó un PCR, utilizando como ADN molde el clon pYUB854-KOmpfAFR1-FR2 y se observó que efectivamente las regiones amplificaron bajo las mismas condiciones de la PCR para el ADN genómico de la micobacteria y con el tamaño esperado, como se observa en la figura 29. En los carriles 4 y 5 se tiene el amplificado correspondiente para el extremo 5' del gen *mfpA*, mientras que en los carriles 6 y 7 el segmento correspondiente al amplificado del gen 1642, correspondiente al extremo 3' del gen *mfpA*.

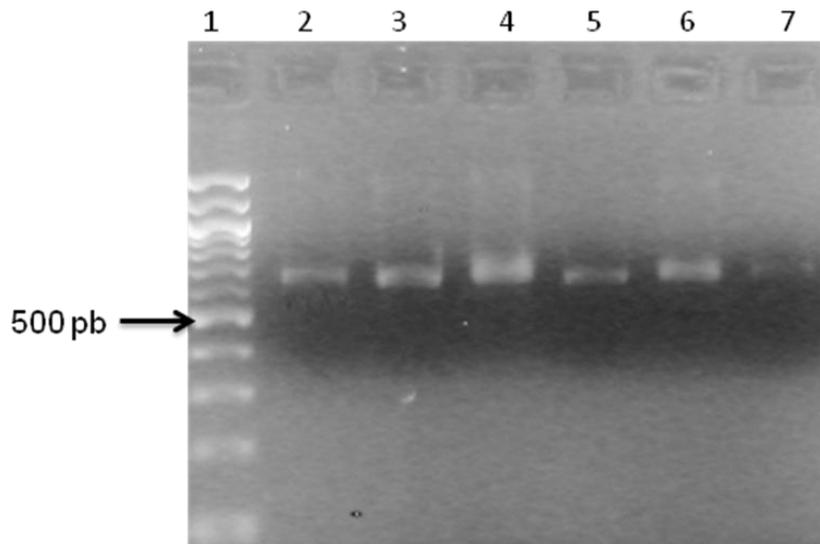


Figura 29. Registro fotográfico de la PCR donde se amplifican los fragmentos KOmpfAFR1 y KOmpfAFR2, utilizando como ADN molde la construcción final (pYUB854-KOmpfAFR1-FR2). Carril1: MPM 100 pb DNA ladder; Carril2: KOmpfAFR1 (*mc*²155); Carril3: KOmpfAFR1. (pYUB854-KOmpfAFR1-FR2); Carril4: KOmpfAFR1 (pYUB854-KOmpfAFR1-FR2); Carril5: KOmpfAFR2 (*mc*²155); Carril6: KOmpfAFR2 (pYUB854-KOmpfAFR1-FR2); Carril7: KOmpfAFR2 (pYUB854-KOmpfAFR1-FR2). Corrida electroforética en un gel de agarosa al 2%.

Estos clones se enviaron a secuenciar al CeSAAN (Figs. 30 y 31), y se obtuvo que efectivamente la homología de secuencias se conservaban entre los fragmentos KOmpfAFR1 y KOmpfAFR2 y los genes *mfpA* y 1642, con los que se realizó el alineamiento.



Figura 30. Alineamiento de la secuencia obtenida en amplificación por PCR del gen *mfpA* hacia su extremo 5' al cual llamamos (KOfpAFR1), utilizando como ADN molde la construcción pYUB854FR1-FR2. El cebador empleado para su secuenciación fue KOfpAF1 (tabla V), que se muestra en la figura con una flecha negra. En negro se distingue la secuencia superior que pertenece al gen *mfpA* (ADNg de *M. smegmatis*) con el que se realizó la homología.

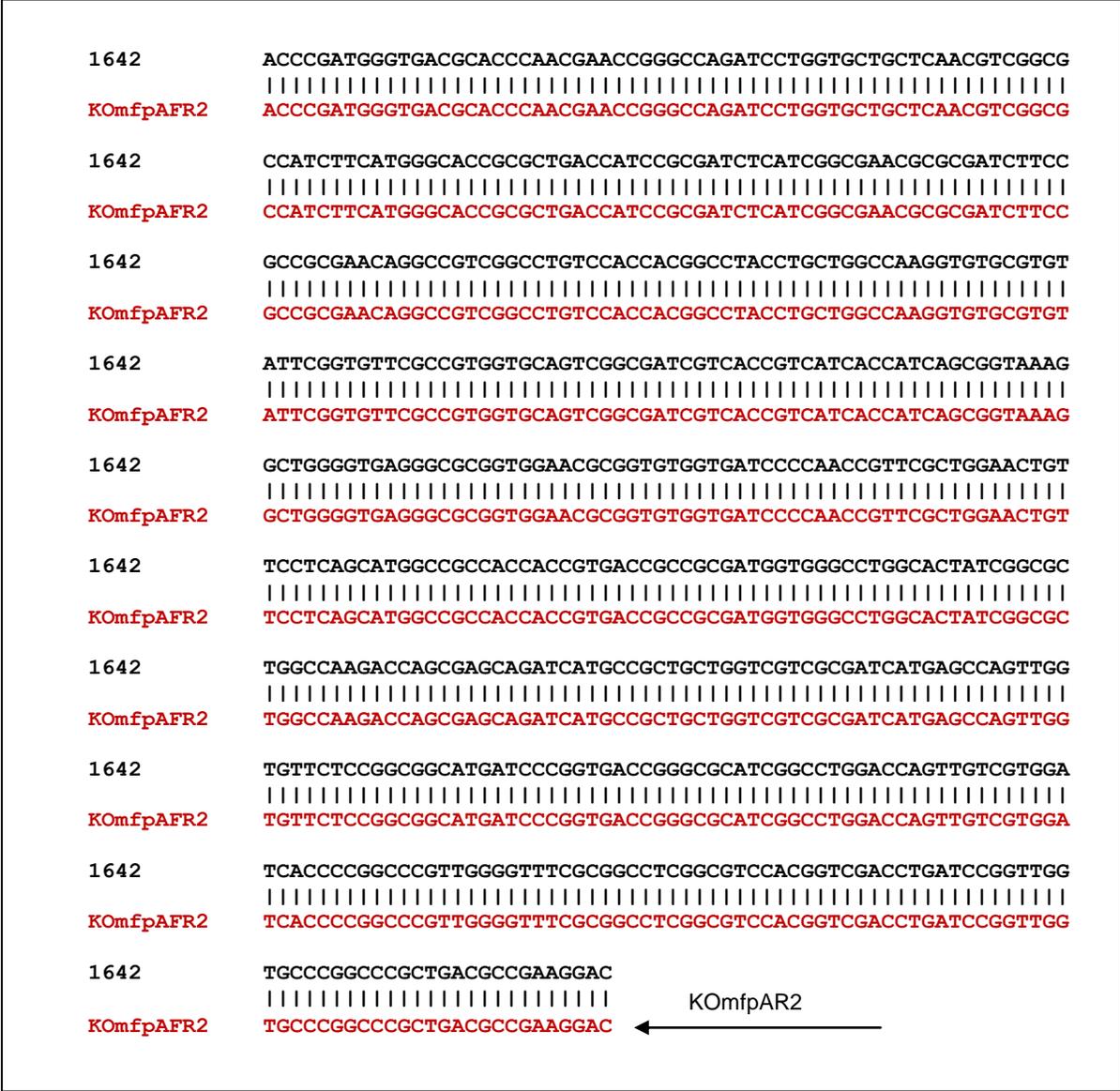


Figura 31. Alineamiento de la secuencia obtenida en amplificación por PCR del gen *mfpA* hacia su extremo 3' al cual llamamos (KOmf_pAFR2) utilizando como ADN molde la construcción pYUB854KOmf_pAFR1-FR2. El cebador empleado para su secuenciación fue KOmf_pAR2 (tabla V), que se muestra en la figura con una flecha negra. En color negro se distingue la secuencia superior que pertenece al gen 1642 (ADNg de *M. smegmatis*) con el que se realizó la homología.

Finalmente se realizó un ensayo de restricción simple con la enzima *Hind*III (Fig. 32), tanto del vector como a las dos construcciones con el fin de linearizar estos clones y así demostrar que efectivamente estos tenían los tamaños esperados. Para el vector tenemos 3893, seguido de la primera construcción (extremo 5' del gen *mfpA*) pYUB854-FR1 (4509 pb) y la segunda construcción pYUB854FR1-FR2 (extremo 5' y 3' del gen *mfpA*) de 5142 pb.

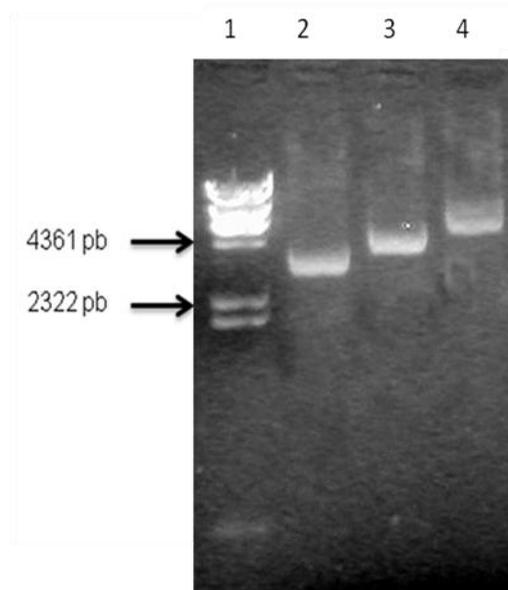


Figura 32. Registro fotográfico del aislamiento de ADN realizado por el kit Mini-prep y linearizados con la enzima *Hind*III. Carril1: MPM *NHind*III; Carril 2: pYUB854; Carril3: pYUB854-KOmpAFR1; Carril4: pYUB854-KOmpAFR1-FR2. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8

Una vez conseguido el ADN recombinante que contenga ambos extremos 5' y 3' del gen *mfpA* pYUB854-KOmpAFR1-FR2, se continuó con la estrategia propuesta para lograr el etiquetamiento a nivel cromosomal, para ello se digirió con las enzimas de restricción *Afl*III y *Xho*I (Fig. 33), a fin de obtener de forma lineal los fragmentos

clonados en conjunto con el cassette de higromicina, como indica el protocolo utilizado (Van Kessel y Hatfull, 2008) ya que se requiere la incorporación del fragmento de ADN lineal al momento de realizar la electroporación en el ADNg de la micobacteria, resultando un fragmento lineal (Fig. 33B).

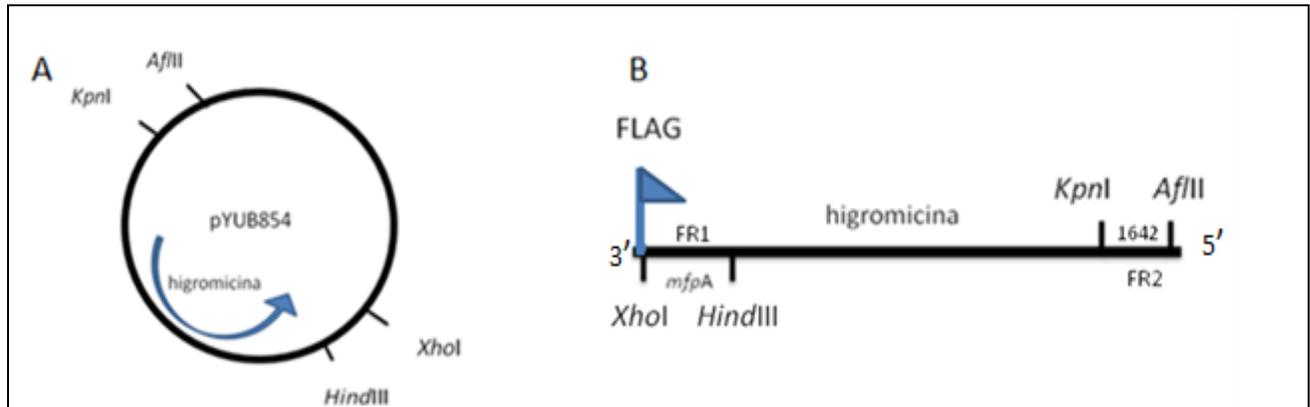


Figura 33. A. Vector de clonamiento pYUB854 con las regiones clonadas. B. fragmento linealizado con los genes *mfpA* y 1642 clonados, mostrando donde se encuentra el epítipo FLAG.

Al realizar la digestión del vector recombinante con las enzimas antes mencionadas se liberaban dos fragmentos, uno de 3240 pb que contiene el cassette de resistencia a higromicina (Fig. 33B), más las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *mfpA* y otro que contenía la secuencia del plásmido restante. Los tamaños observados en la figura 33B eran los esperados y esto se pudo determinar al comparar el carril 3 que contiene las dos bandas, con el carril 1 (Fig. 34). Esta digestión se purificó con el estuche comercial QIAquick® PCR Purification kit (Qiagen). Seguidamente el ADN fue cuantificado en un gel de agarosa empleando un marcador de masa molecular 1 kb ladder (New England Biolabs).

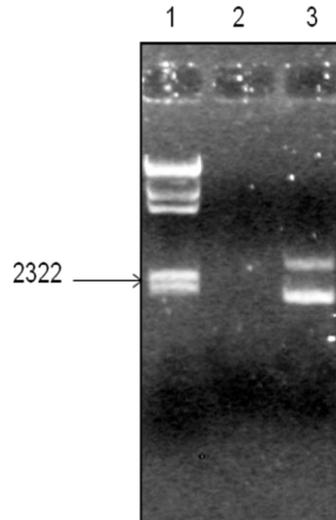


Figura 34. Registro fotográfico de la doble digestión de pYUB854-KOmfAFR1-FR2, para obtener el ADN lineal (Fig 33.B), requerido para realizar la electroporación en *M. smegmatis*. Carril1: Marcador de peso molecular λ /HindIII; Carril3: pYUB854-KOmfAfr1-FR2/AflI- XhoI. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

Al mismo tiempo que se obtuvo el fragmento de interés linearizado (Fig. 34), se electroporó en *M. smegmatis* el vector pJV53.

Los resultados obtenidos en la electroporación del fragmento de ADN lineal fueron los siguientes:

CONTROLES POSITIVOS:

1. Cepa mc²155-pJV53 en placas 7H10 suplementadas con kanamicina.
2. Cepa mc²155-pJV53 + plásmido pALACE (Fig. 12D), Que confiere resistencia a higromicina en placas 7H10 suplementadas con kanamicina e higromicina.

CONTROLES NEGATIVOS:

1. Cepa mc²155-pJV53 en placas 7H10 suplementadas con kanamicina e higromicina.

Se observó crecimiento en los controles positivos, mientras que el experimento de electroporación para el fragmento lineal de ADN las placas donde se esperaban tener las transformantes no se observó ninguna colonia.

Este proceso no tuvo éxito a pesar de haberse realizado varias veces; por lo que no se pudo construir la cepa mutante de *M. smegmatis* que tuviera el epítotope FLAG en el gen *mfpA*. Debido a esto se realizó otra estrategia, con el fin de conseguir el etiquetamiento del gen *mfpA* en el cromosoma micobacteriano.

Para ello se realizó la técnica de extensión por solapamiento mediante PCR (Fig. 16), ya que esta permite la fusión de dos secuencias de ADN sin el uso de enzimas de restricción (Horton y col., 1989). Básicamente consiste en la unión dos secuencias cortas que son complementarias entre el extremo 3' de la primera secuencia y el extremo 5' de la otra. Dichas secuencias son fusionadas durante la PCR, una vez que estas cadenas estén solapadas, hibridan y se extienden para producir una secuencia quimérica (Ho y col., 1989).

La secuencia complementaria puede ser introducida en el sitio de solapamiento ubicado en dos fragmentos no relacionados mediante la incorporación de secuencias de etiquetamiento comunes en los cebadores, en una primera ronda de PCR en paralelo (Horton y col., 1989; Urban y col., 1997; Jones y Barnad, 2005). Por el contrario, si los dos fragmentos contienen las secuencias de complementarias, entonces podrá producirse un producto quimérico final sin modificar las secuencias.

El método de superposición por extensión es bastante básico, pero versátil en su aplicación a la mutagénesis dirigida o la generación de productos con genes empalmados. Aunque la limpieza del templado inicial y la designación de cebadores exactos son factores clave para el éxito de esta técnica, la principal limitación a la máxima precisión para generar el producto final AD, es la eficiencia de la ADN polimerasa empleada en la PCR. El tamaño del producto AD puede en esencia variar

entre 100 nt a 2 kb, dependiendo de la fidelidad y función de la polimerasa utilizada (Heckman y Pease, 2007).

El primer amplificado correspondiente a los genes *mfpA*-1642 FLAG2 (figura 18), tiene un tamaño de 650 pb, mientras que el segundo amplificado correspondiente a los genes *mfpEB* FLAG1 (figura 17) y tiene un tamaño de 4500 pb.

En la figura 35 se pueden observar ambos amplificados obtenidos en la primera ronda de PCR, a los cuales se les incorporó la secuencia correspondiente al epítotope FLAG (Fig. 16):

- El amplificado correspondiente a FLAG1: 4500 pb
- El amplificado para FLAG2: 650 pb

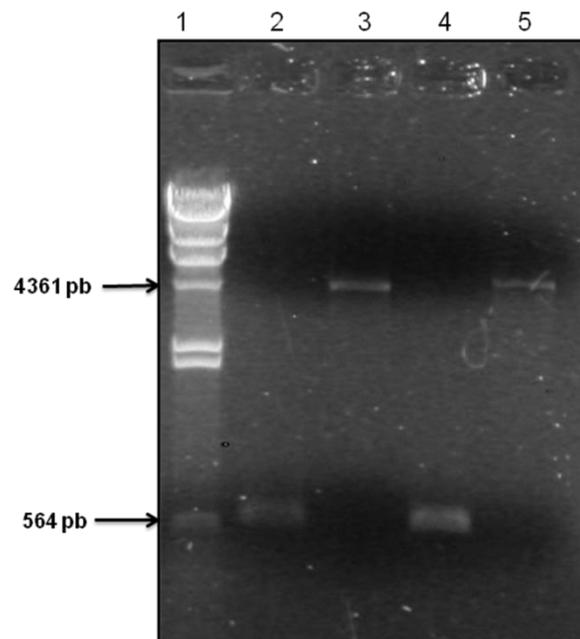


Figura 35. Registro fotográfico de los productos de PCR primarios obtenidos (FLAG1 y FLAG2) que se utilizaron como ADN molde para la extensión por solapamiento utilizando la PCR, para etiquetar el gen *mfpA* con el epítotope FLAG. Carril1: Marcador de peso molecular λ /*Hind*III; Carril2: FLAG2; Carril3: FLAG1; Carril 4: FLAG2; Carril5: FLAG 1. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 1%.

Se pueden observar los amplificadores con los tamaños esperados, donde el fragmento al cual denominamos FLAG 2 queda etiquetado con el epítipo FLAG en el extremo 5' del gen *mfpA* y así mismo, el fragmento FLAG1 tiene la homología con FLAG2 hacia el extremo 3' del gen *mfpB*. Estos productos primarios fueron secuenciados para comprobar la correspondencia con los genes *mfpEB* y *mfpA* (mc²155) con los mismos cebadores con los que se amplificaron ambos fragmentos (Figs. 36 y 37). Ambos amplificadores se enviaron a secuenciar al CeSSAN.

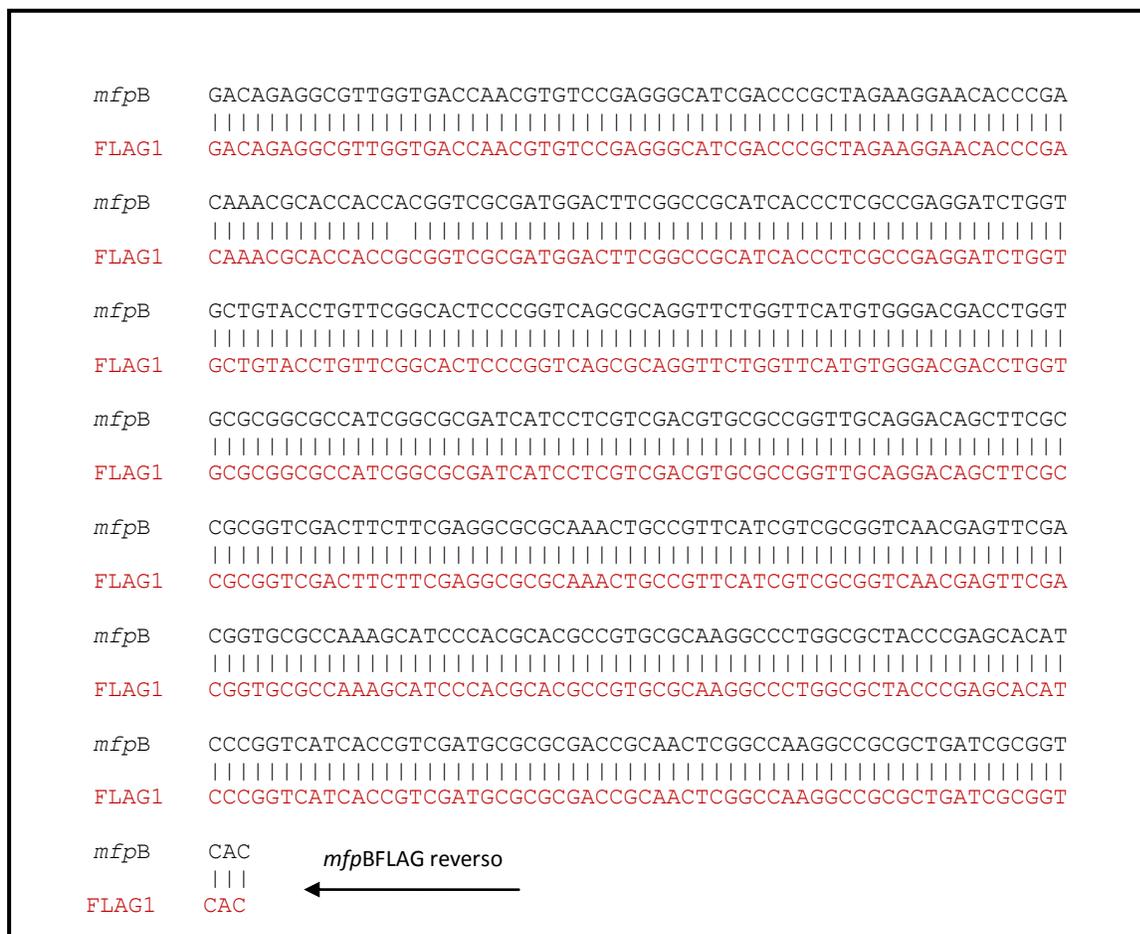


Figura 36. Alineamiento de la secuencia obtenida para la amplificación mediante PCR del fragmento que contiene los genes *mfpEB*, al cual llamamos **FLAG1** (secuencia de color rojo). El cebador empleado para secuenciar fue *mfpBFLAG reverso*. La secuencia de color negro pertenece al gen *mfpB* (ADNg de *M. smegmatis*) con el que se realizó la homología.

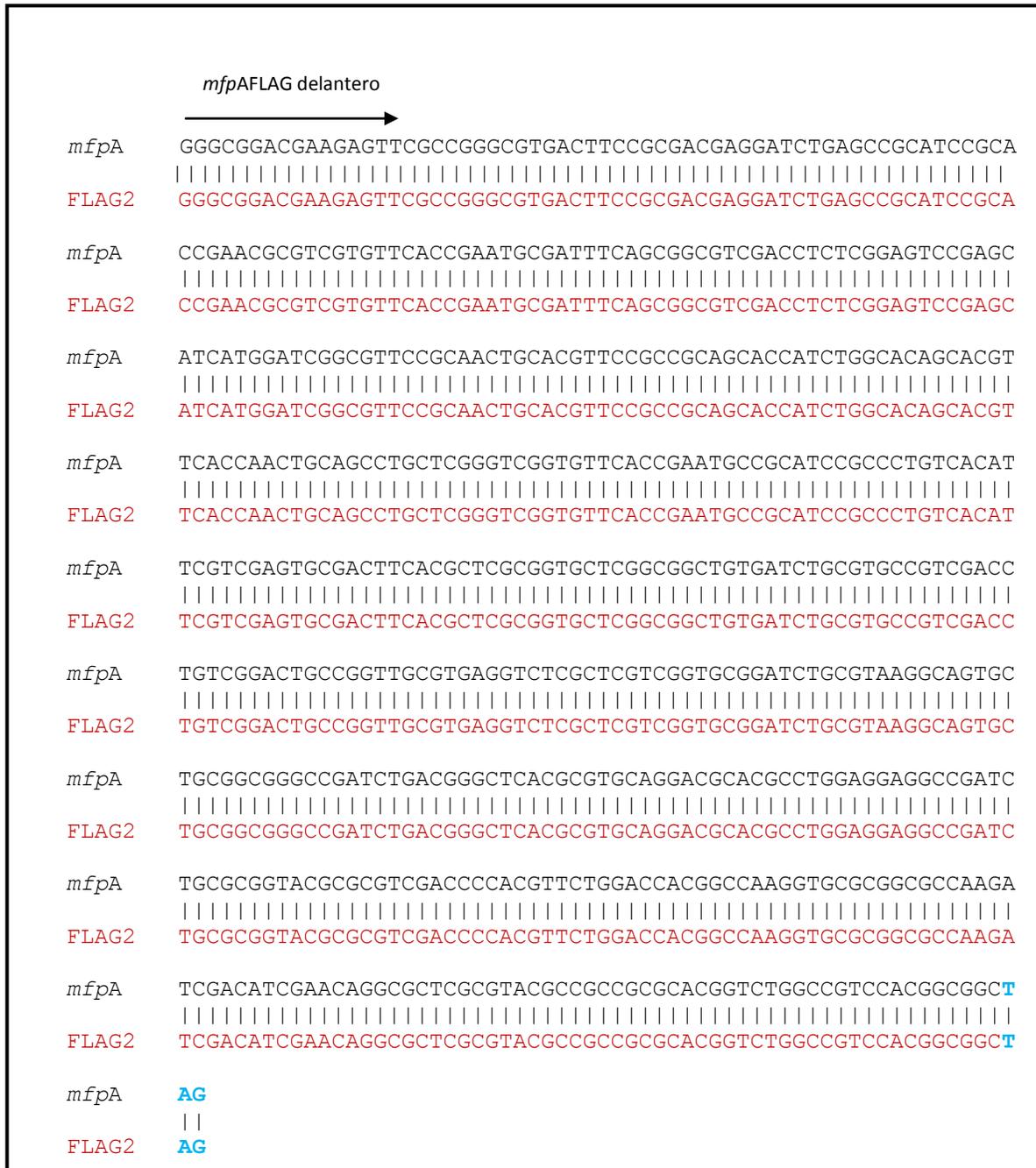


Figura 37. Alineamiento de la secuencia obtenida para la amplificación mediante PCR del fragmento que contiene al gen *mfpA*, al cual llamamos **FLAG2** (secuencia resaltada en rojo). El cebador empleado para secuenciar fue *mfp*AFLAG delantero, se muestra e la figura con una flecha. La secuencia de color negro pertenece al gen *mfpA* (ADNg de *M. smegmatis*) con el que se realizó la homología. La secuencia resaltada en color azul, pertenece al codón de tenimación de *mfpA* TAG.

Para determinar que efectivamente se había logrado etiquetar ambos amplificados con el epítipo FLAG, estos se enviaron a secuenciar también con unos cebadores que hibridan dentro de los genes *mfpA* y *mfpB* (Fig. 38 y 39).

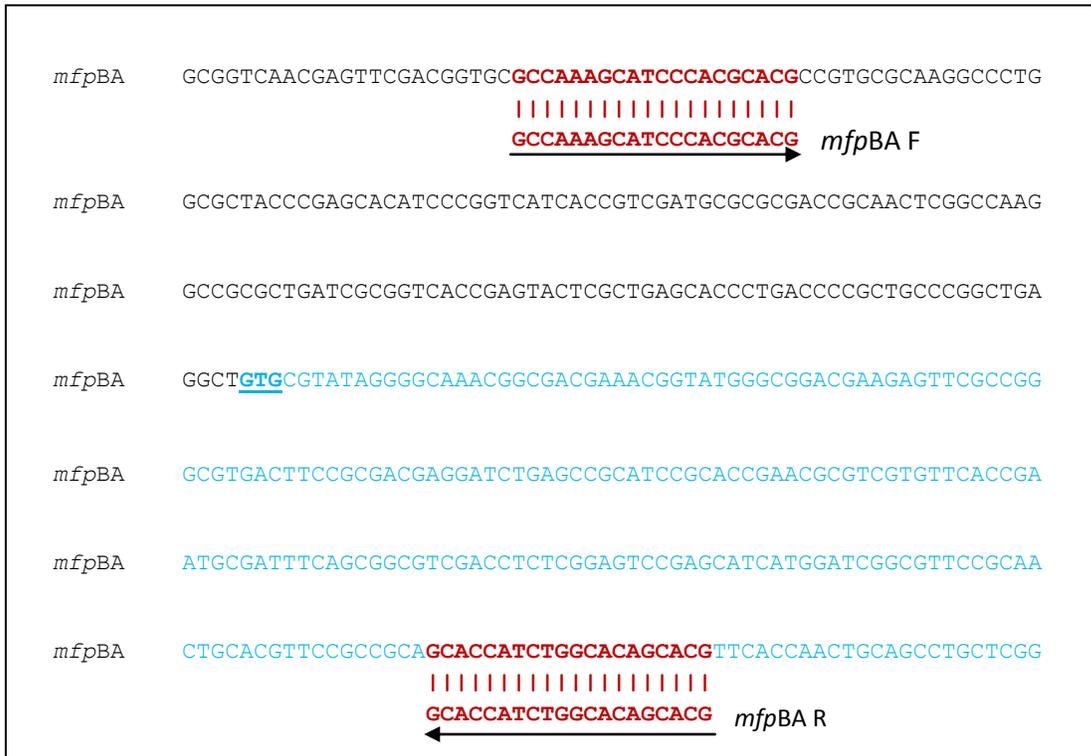


Figura 38. Secuencia de los genes *mfpB* y *mfpA* con los sitios donde hibridan los cebadores internos *mfpBA F* y *mfpBA R* que se utilizaron para secuenciar a FLAG. **GTG** es el codón de inicio de *mfpA*

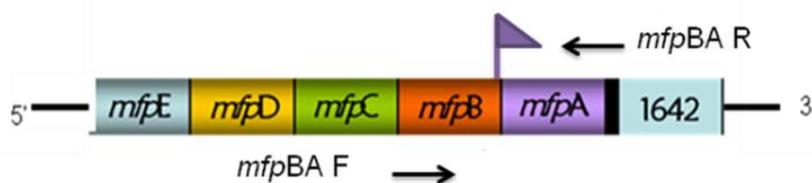


Figura 39. Esquema del operón *mfpEA* de *M. smegmatis* indicando los sitios donde hibridarán los cebadores utilizados para secuenciar *mfpAB* (FLAG).

Las secuencias obtenidas para cada uno de los amplificados por separados fueron los siguientes:

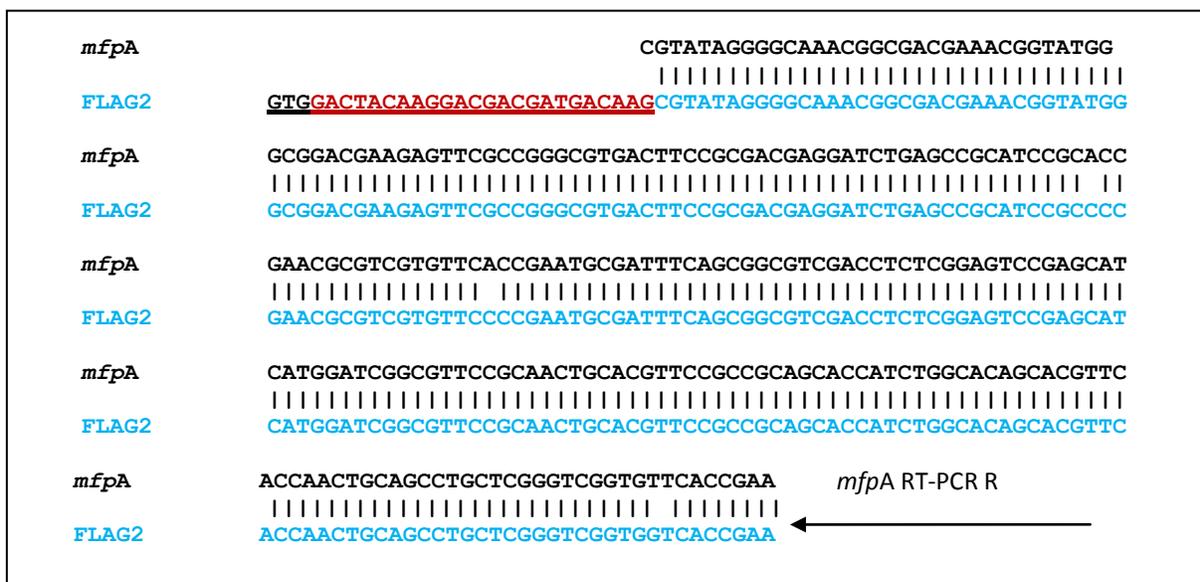


Figura 40 Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado mediante PCR de **FLAG2** (secuencia inferior), comparado con el gen *mfpA* ADN genómico de *M. smegmatis* (secuencia superior); el cebador utilizado para secuenciar fue *mfpA* RT-PCR reverso (flecha negra), que hibrida en el gen *mfpA*, con el fin de determinar la incorporación epítoto del FLAG dentro de la secuencia del producto primario FLAG2, necesario para realizar la estrategia de extensión por solapamiento mediante PCR. En color rojo se ubica la secuencia del epítoto **FLAG. GTG** es el codón de inicio de *mfpA*.

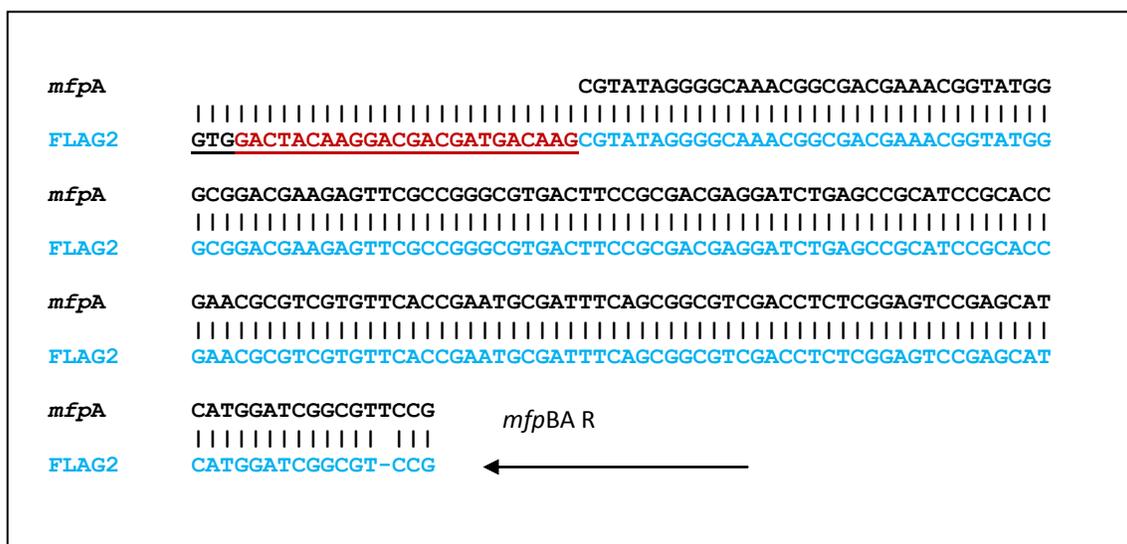


Figura 41 Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado mediante PCR de **FLAG2** (secuencia inferior), comparado con el gen *mfpA* ADN genómico de *M. smegmatis* (secuencia superior); el cebador utilizado para secuenciar fue *mfpBA* reverso (flecha negra), que hibrida en el gen *mfpA*, con el fin de determinar la incorporación epítoto del FLAG dentro de la secuencia del producto primario FLAG2, necesario para realizar la estrategia de extensión por solapamiento mediante PCR. En color rojo se ubica la secuencia del epítoto **FLAG. GTG** es el codón de inicio de *mfpA*.

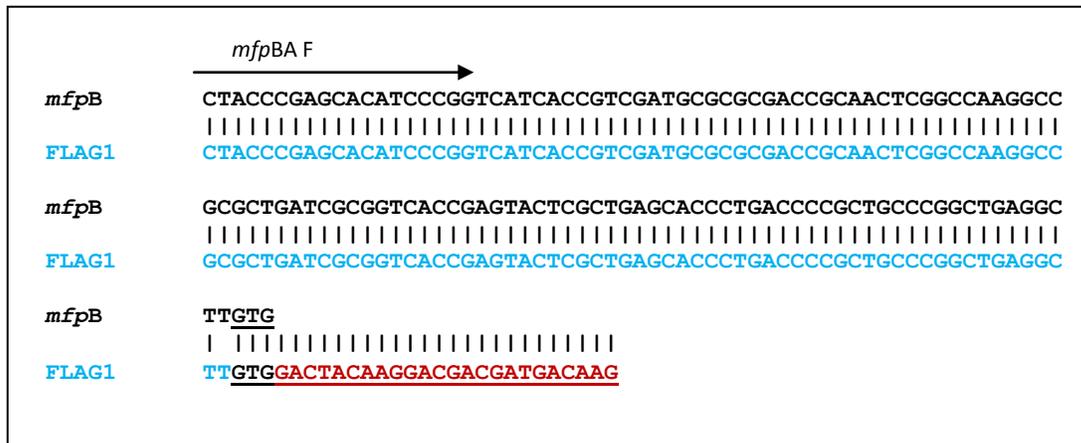


Figura 42 Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado mediante PCR de FLAG1 (secuencia inferior), comparado con el gen *mfpA* ADN genómico de *M. smegmatis* (secuencia superior); el cebador utilizado para secuenciar fue *mfpBA* delantero (flecha negra), que hibrida en el gen *mfpB*, con el fin de determinar la incorporación epítipo del FLAG dentro de la secuencia del producto primario FLAG2, necesario para realizar la estrategia de extensión por solapamiento mediante PCR. En color rojo se ubica la secuencia del epítipo **FLAG. GTG** es el codón de inicio de *mfpA*.

Ambas secuencias arrojaron los resultados esperados. El primer producto que se secuenció fue FLAG2 con un cebador llamado ***mfpA* RT-PCR R1 (tabla VI)** a fin de determinar si el epítipo FLAG se había incorporado (Fig. 40), así como también se empleó el cebador *mfpBA* reverso (Fig 41), estos cebadores solo hibridan en la secuencia del gen *mfpA*. Al mismo tiempo se obtuvo la secuencia para FLAG1 (Fig. 42) y efectivamente esta también tenía incorporada la secuencia complementaria de FLAG.

Seguidamente se realizó una tercera PCR con los cebadores externos *mfp5Pacl* y *mfp10Pacl*, que contienen el sitio de reconocimiento para la enzima *Pacl*, obteniéndose así el amplificado de todo el operón, que tiene un tamaño aproximado de de 5185 pb.

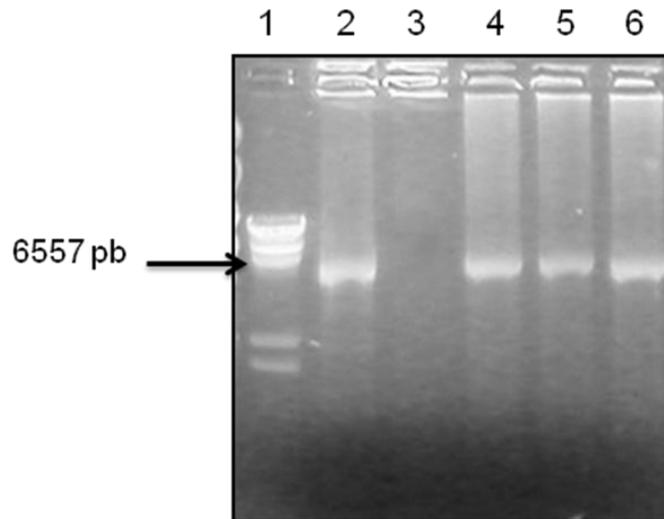


Figura 43. Registro fotográfico de los productos obtenidos en la extensión por solapamiento mediante PCR. Carril1: Marcador de peso molecular λ /HindIII; Carril2: *mc*²155 *mfpEA*; Carril 3: Control negativo (-); Carril 4: FLAG 1-2; Carril5: FLAG 1-2. Carril 6: FLAG1-2. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

El fragmento FLAG 1-2 carriles 4, 5 y 6 (Fig. 43), fue enviado a secuenciar y mientras se esperaban los resultados de las secuencias, el fragmento FLAG1-2 fue digerido con la enzima *PacI* para luego llevar a cabo el clonamiento en el vector pYUB412.1 previamente aislado (Fig. 44), que también fue digerido con la misma enzima. Así mismo, se realizaron las pruebas de ligamiento necesarias para determinar si el vector se encontraba bien digerido y desfosforilado, a fin de tener las condiciones óptimas para realizar el clonamiento.

Luego de realizar las reacciones de ligamiento y transformación correspondientes, se analizaron los posibles clones. Para ello se realizó la extracción de ADN de 11 colonias distintas mediante la técnica de ebullición para determinar si se había logrado introducir el fragmento FLAG1-2 en el vector pYUB412.1.

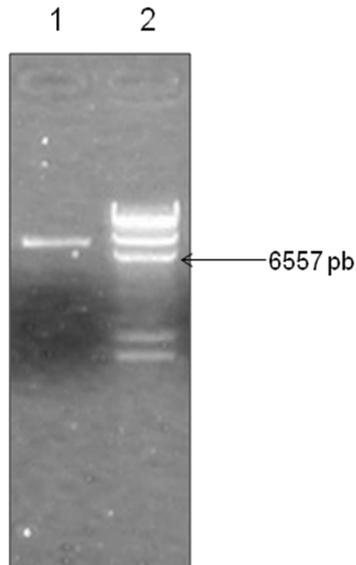


Figura 44. Registro fotográfico del vector pYUB412.1 digerido con *PacI*. Carril: 1 pYUB412.1/*PacI* defosforilado. Carril2: Marcador de peso molecular λ /*HindIII*. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

Como se observa en la figura 45, la corrida electroforética de los posibles clones (carriles 3-13) 13747 pb, proyecta una diferencia de tamaño considerable con respecto al vector pYUB412.1 (8562 pb) que se muestra en el segundo carril.

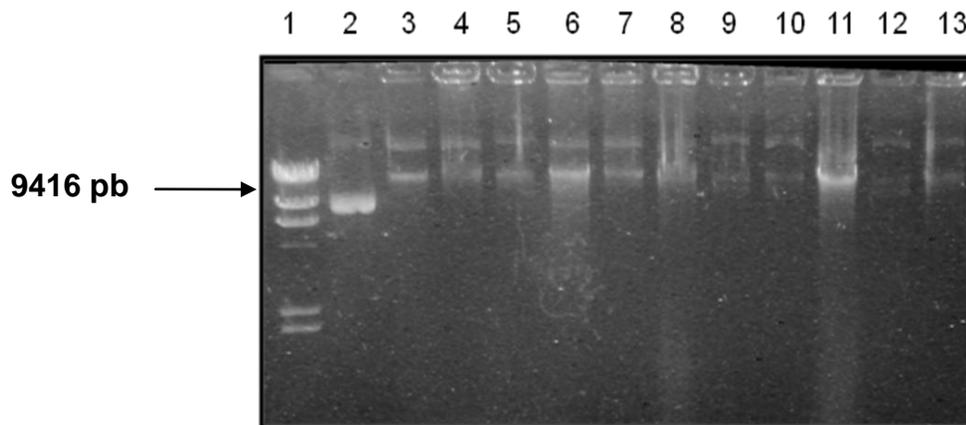


Figura 45. Registro fotográfico del aislamiento de ADN mediante ebullición de los posibles clones pYUB412.1 + FLAG 1-2. Carril1: Marcador de peso molecular λ /*HindIII*; Carril2: pYUB412.1; Carril 3: pYUB412.1+ FLAG 1-2 1; Carril 4: pYUB412.1+ FLAG 1-2 2; Carril 5: pYUB412.1+ FLAG 1-2 3; Carril 6: pYUB412.1+ FLAG 1-2 4; Carril 7: pYUB412.1+ FLAG 1-2 5; Carril 8: pYUB412.1+ FLAG 1-2 6; Carril 9: pYUB412.1+ FLAG 1-2 7; Carril 10: pYUB412.1+ FLAG 1-2 8; Carril 11: pYUB412.1+ FLAG 1-2 9; Carril 12: pYUB412.1+ FLAG 1-2 10; Carril 13: pYUB412.1+ FLAG 1-2 11. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

Para confirmar que efectivamente se había logrado el clonamiento, se realizó un PCR utilizando la construcción FLAG1-2 como ADN molde, y efectivamente amplificaron las bandas correspondientes a FLAG1 y FLAG2. Además dichos clones fueron secuenciados, encontrándose concordancia entre las secuencias obtenidas en el PCR para *mfpEB* y *mfpA* con la secuencia de *M. smegmatis*.

Al mismo tiempo se realizó la digestión de la construcción pYUB412.1 + FLAG1-2 con la enzima que se utilizó para el clonamiento del fragmento *mfpEA* (Fig. 16) y se obtuvieron las bandas con los tamaños esperados tanto para el vector (8562 pb), como para el fragmento *mfpEA* (5185 pb) (Fig.46).

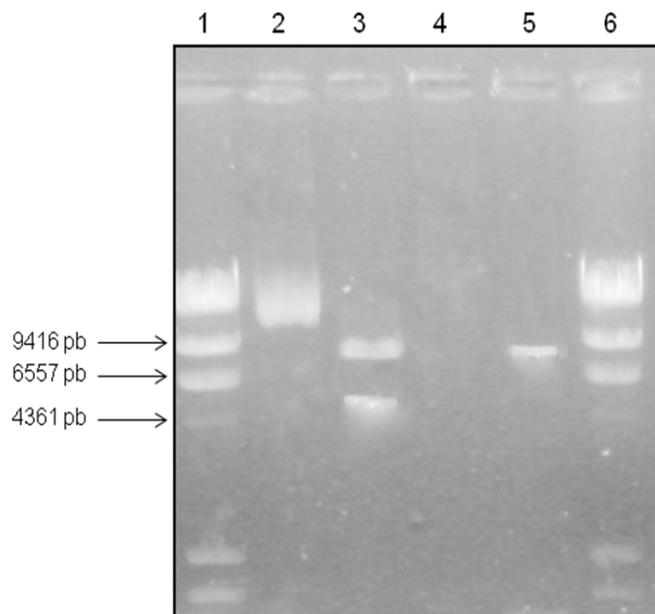


Figura 46. Registro fotográfico de la digestión de pYUB412.1-FLAG 1-2 con la enzima de restricción *PacI*. Carril1: Marcador de peso molecular λ *HindIII*; Carril2:pYUB412.1 +FLAG1-2 (13747 pb); Carril 3: pYUB412.1 +FLAG1-2/*PacI*; Carril 5: pYUB412.1 (8562 pb); Carril 6: Marcador de peso molecular λ *HindIII*. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

Finalmente se realizó la electroporación de la construcción (pYUB412.1+ FLAG1-2) en *M. smegmatis*, para integrarla al genoma micobacteriano.

Los resultados obtenidos en la electroporación del fragmento de ADN lineal fueron los siguientes:

CONTROLES POSITIVOS:

1. Cepa mc²155 sembrada en placas 7H10.
2. Cepa mc²155 + plásmido pALACE sembrada en placas 7H10 suplementado con higromicina.

CONTROLES NEGATIVOS:

1. Cepa mc²155 sembrada en placas 7H10 suplementado con higromicina.
2. Cepa mc²155 + pALACE (Fig.11D) sembrada en placas 7H10.

EXPERIMENTO

1. Cepa mc²155 + pYUB412.1 + FLAG 1-2 sembrada en placas 7H10 suplementado con higromicina.

Con la electroporación se obtuvieron los resultados esperados, tanto para los controles positivos como para los negativos y también para el experimento, consiguiendo así que el plásmido recombinante pYUB412.1 – FLAG1-2, que contiene el epítipo FLAG, se integró en el genoma de *M. smegmatis*.

En este experimento se obtuvieron 15 colonias, las cuales se inocularon en 5 ml de 7H9/OAD + higromicina, y se dejaron en agitación durante 2 días. Luego se realizó el lisado correspondiente de estos cultivos a fin de obtener el ADN molde (*M. smegmatis* + pYUB412.1+FLAG 1-2), a partir del cual se efectuaron las PCRs correspondientes, a fin de establecer que efectivamente el vector recombinante se

integró en el ADN cromosomal de *M. smegmatis*. Para ello se emplearon los cebadores 412secF delantero y 412secR reverso (tabla V), diseñados específicamente para amplificar al vector pYUB412.1. Estos cebadores hibridan dentro de los sitios *PacI* del vector pYUB412.1 donde fue clonado el fragmento *mfpEA* (FLAG1-2), por lo que el amplificado que obtuvimos al realizar el PCR a partir del ADN genómico de la cepa mutante de *M. smegmatis* fue de aproximadamente unas 6000 pb como se observa en la figura 48.

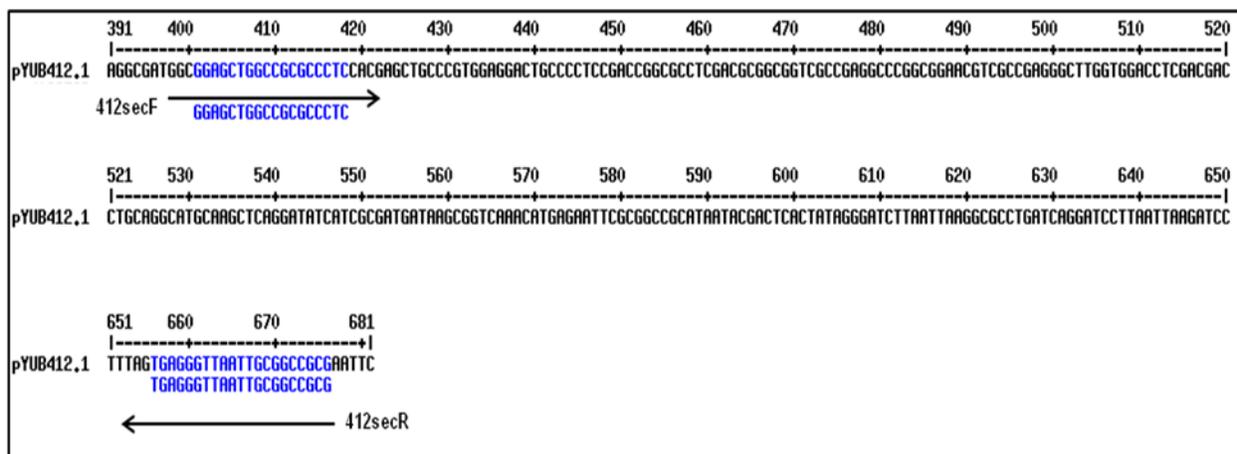


Figura 47. Secuencia del vector integrativo pYUB412.1 con los sitios donde hibridan los cebadores 412secF y 412secR (azul).

Como se observa en el Fig. 50 efectivamente se observó una banda de aproximadamente 6000 pb ubicada en el cuarto carril, que corresponde al amplificado del vector pYUB412.1-FLAG1-2 integrado dentro del genoma de la micobacteria.

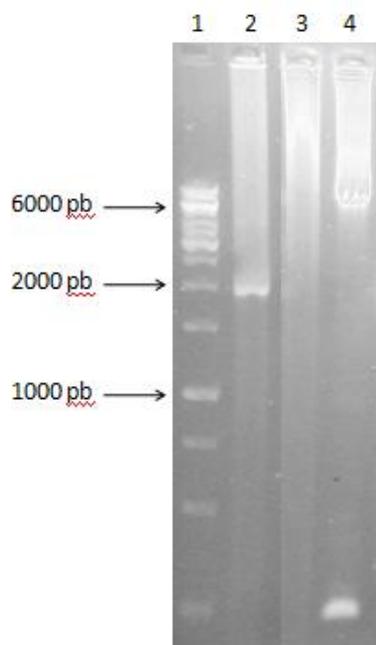


Figura 48. Registro fotográfico de la amplificación por PCR del vector pYUB412.1, empleando como ADN molde el ADN genómico de *M. smegmatis* con el vector recombinante pYUB412.1-FLAG1-2 integrado. Carril 1: MPM 1kb ladder; Carril 2: Control (+) pYUB412.1-PknL; Carril3: mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2; Carril 4: mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2. Corrida electroforética en un gel horizontal de agarosa al 0.8%.

Como control de este experimento se utilizó una construcción facilitada por una compañera del laboratorio, que consistía en el clonamiento de una proteína llamada PknL de aproximadamente 1500 pb, que también fue incorporada dentro de los sitios de reconocimiento para la enzima de restricción *PacI* en el vector pYUB412.1. Por lo que el amplificado final del PCR fue aproximadamente de 1900 pb.

Al comprobar que efectivamente se había logrado que el vector se integrara en el ADN cromosomal de *M. smegmatis*, como se observa en el cuarto carril de la figura 48, se procedió a realizar el western blot, utilizando 4 colonias del experimento mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2 y 3 controles positivos, que trae el estuche comercial del anticuerpo anti-FLAG (SIGMA). También se realizó la amplificación mediante PCR con los cebadores *mfpBA* delantero y reverso a partir de los clones obtenidos, utilizando

como ADN molde $mc^2155+pYUB412.1+FLAG1-2$, donde se obtuvo la banda esperada de aproximadamente 300 pb en el carril 2 (Fig.49). Estos fragmentos se enviaron a secuenciar.

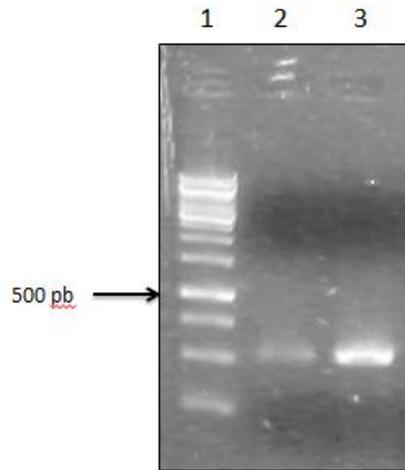


Figura 49. Registro fotográfico de la amplificación por PCR del fragmento *mfpBA*, empleando como ADN molde el ADN genómico de *M. smegmatis* con el vector recombinante pYUB412.1-FLAG1-2 integrado. Carril 1: MPM 100 pb DNA ladder; Carril 2: *mfpBA* proveniente de $mc^2155-pYUB412.1-FLAG1-2$; Carril 3: $mc^2155-pYUB412.1-FLAG1-2$. Corrida electroforética en un gel horizontal de agarosa al 0.8%.

Al mismo tiempo que se esperaban las secuencias que confirmaran la presencia del epítipo FLAG, se corrieron dos geles de poliacrilamida al 12% con los lisados correspondientes a los clones obtenidos ($mc^2155-pYUB412.1-FLAG1-2$), un gel para comprobar la cantidad de proteína obtenida (Fig. 50) y el otro para realizar la transferencia a la membrana de nitrocelulosa, y hacer la detección del epítipo FLAG con los anticuerpos correspondientes.

Como control positivo del western blot utilizamos un plásmido que expresa BAP (Bacterial Alkaline Phosphatase) fusionada a FLAG, con un peso de 49 kDa, que se observan en los carriles 1, 2 y 3; este plásmido se ha usado numerosas veces como control positivo para la expresión, afinidad, purificación y detección de otras proteínas de fusión a FLAG.

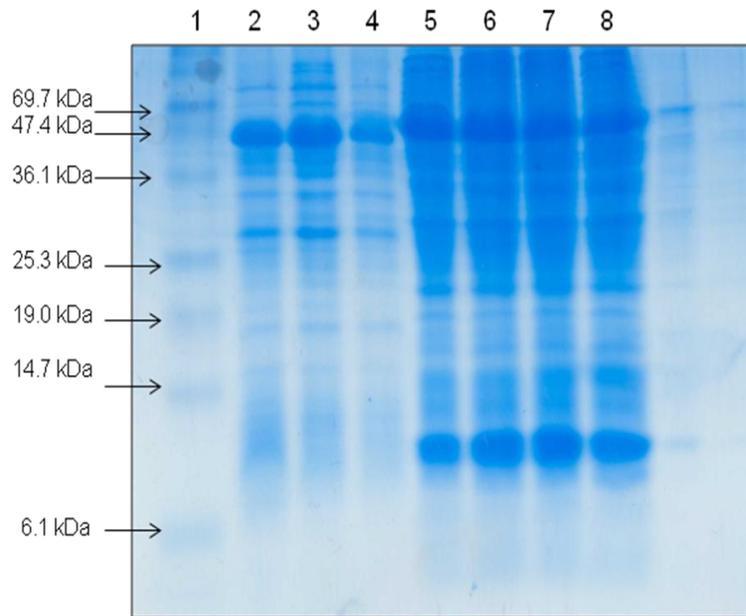


Figura 50. Gel de poliacrilamida al 12%. Carril 1: Marcador de peso de la proteína; carril 2: FLAG-BAP, carril 3: FLAG-BAP; carril 4: FLAG-BAP; carril 5: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG1-2; Carril 6: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG1-2; Carril 7: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG1-2; Carril 8: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG1-2.

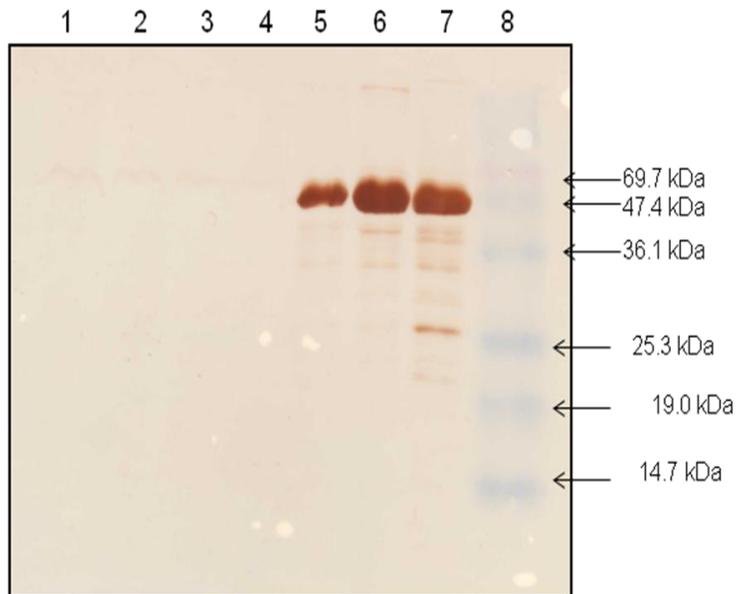


Figura 51. Western blot. Carril 1: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG 1-2; Carril 2: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG 1-2; Carril 3: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG 1-2; Carril 4: lisado de *M. smegmatis* + pYUB412.1+ FLAG 1-2; Carril 5: FLAG-BAP; Carril 6: FLAG-BAP; Carril 7: FLAG-BAP; Carril 8: Marcador de peso de proteínas preteñido (BenchMark™ Prestained Protein Ladder Invitrogen).

Como observamos en la figura 51 al agregar los anticuerpos α -FLAG y diaminobencidina, efectivamente se detectaron los controles positivos, en los carriles 7, 6 y 5 respectivamente, mientras que en los carriles 1- 4 no se observó detección alguna del epítipo FLAG de interés, que se incorporó inicialmente en el gen *mfpA* de *M. smegmatis*. En el carril 5, 6 y 7 se ubica la proteína FLAG-BAP en el peso esperado de 49 kDa en comparación con el marcador de proteínas utilizado, pero no se detectó señal de FLAG. Luego de realizar el western blot, se recibió la secuencia de la extensión por solapamiento mediante PCR y se observó que no se había logrado el etiquetamiento, pues el epítipo no fue incorporado en el PCR, esto se corrobora también con la secuencia obtenida para la amplificación por PCR del fragmento *mfpBA* donde se utilizó como ADN molde mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2 (Fig. 53). Sin embargo, lo que se presume debió ocurrir fue que los dos fragmentos se solaparon mediante 3 bases, como se observa en la secuencia (Fig. 52). Esto explica porque el western blot no arrojó los resultados esperados.

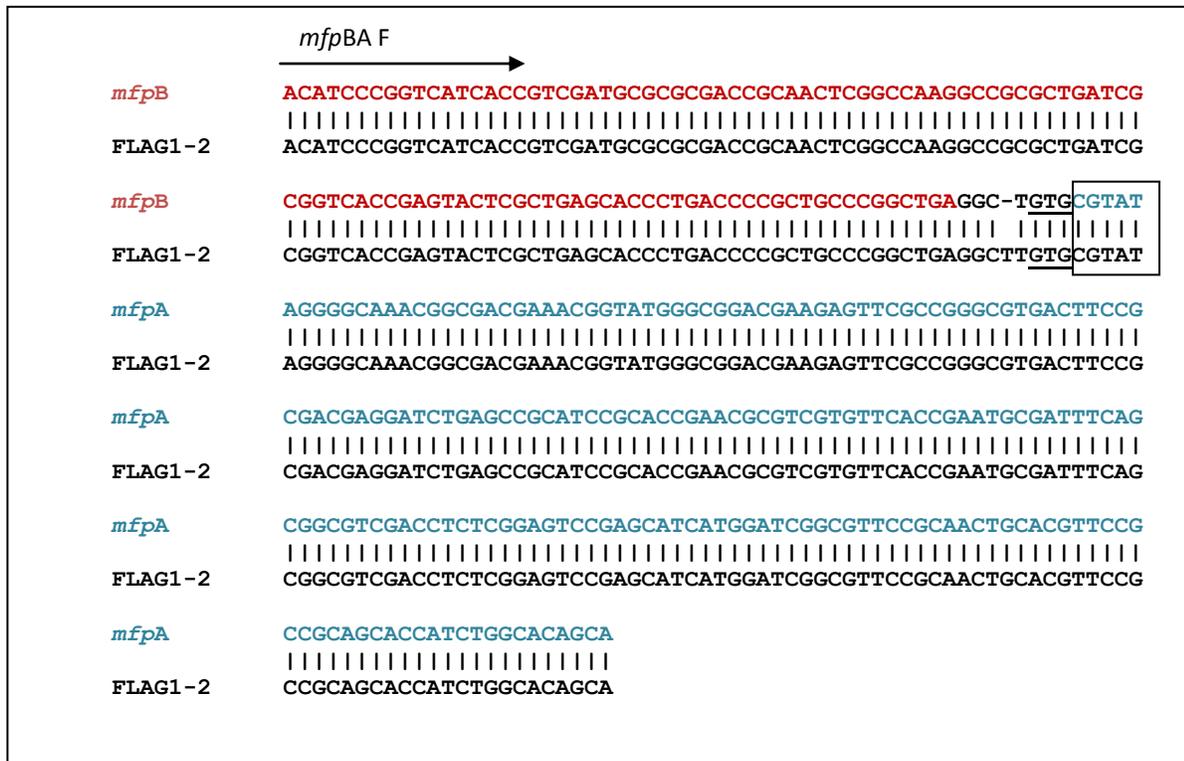


Figura 52 Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado mediante PCR de FLAG1-2 (secuencia inferior), comparado con los genes *mfpB* y *mfpA* ADN genómico de *M. smegmatis* (secuencia superior); el cebador utilizado para secuenciar fue *mfpBA* delantero (flecha negra), que hibrida en el gen *mfpB*, con el fin de determinar la incorporación epítoto del FLAG en el operón *mfpEA*, **GTG** es el codón de inicio de *mfpA* y en un recuadro negro se resalta el lugar donde debería estar la secuencia del epítoto FLAG.

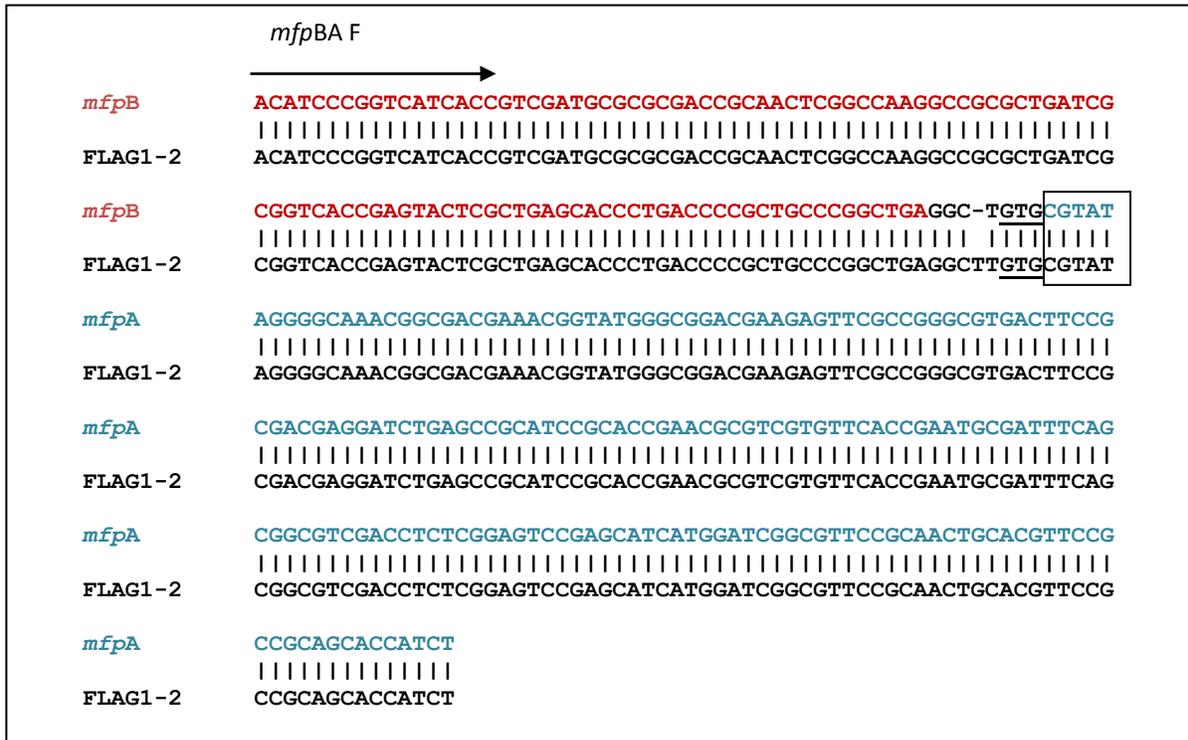


Figura 53. Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado *mfpBA* utilizando como ADN molde mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2. El cebador empleado fue *mfpBA F* (delantero) Tabla V que hibrida en el gen *mfpB*. Con este es posible detectar si la secuencia del epítipo FLAG fue incorporada durante la extensión por solapamiento de los genes *mfpEB* y *mfpA*. La secuencia del gen *mfpBA* (ADNg de *M. smegmatis*) se utilizó para realizar la homología. Como se puede apreciar en la figura la secuencia resaltada en verde pertenece al gen *mfpB*, y la resaltada en azul es propia del gen *mfpA*. Por lo que en el medio de ambas, podría detectarse la secuencia nucleotídica del epítipo FLAG. (resaltado en un cuadro azul).

Por ello se decidió seguir realizando la extensión por solapamiento mediante PCR, con los mismos productos primarios ya secuenciados.

Luego de varios intentos, efectivamente se logró obtener el amplificado completo que contuviera el epítipo FLAG etiquetando al gen *mfpA* con el epítipo FLAG (Fig. 54), este se envió a secuenciar

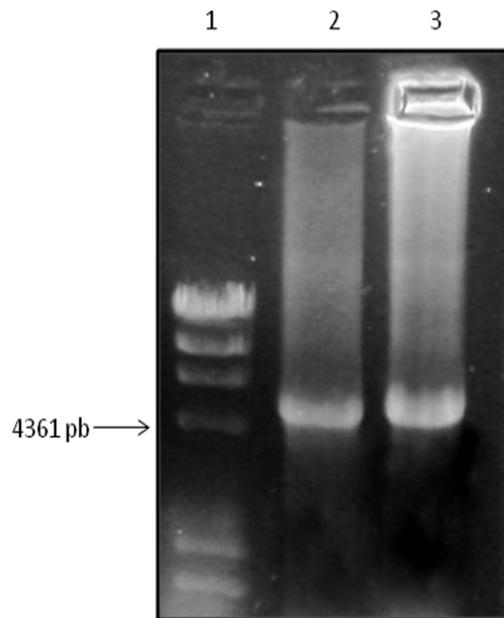


Figura 54. Registro fotográfico de los productos obtenidos de PCR overlap extensión. Carril1: Marcador de peso molecular *λHindIII*; Carril 3: FLAG 1-2; Carril4: FLAG 1-2. Corrida electroforética en un gel de agarosa al 0.8%.

En la figura observamos el gel de agarosa donde se corrió la muestra de FLAG1-2, pero lamentablemente el producto que se envió a secuenciar era poco y no pudo reproducirse el experimento, por lo que no se pudo clonar en el vector pYUB412.1, así que no pudieron culminarse los últimos objetivos planteados por falta de tiempo.

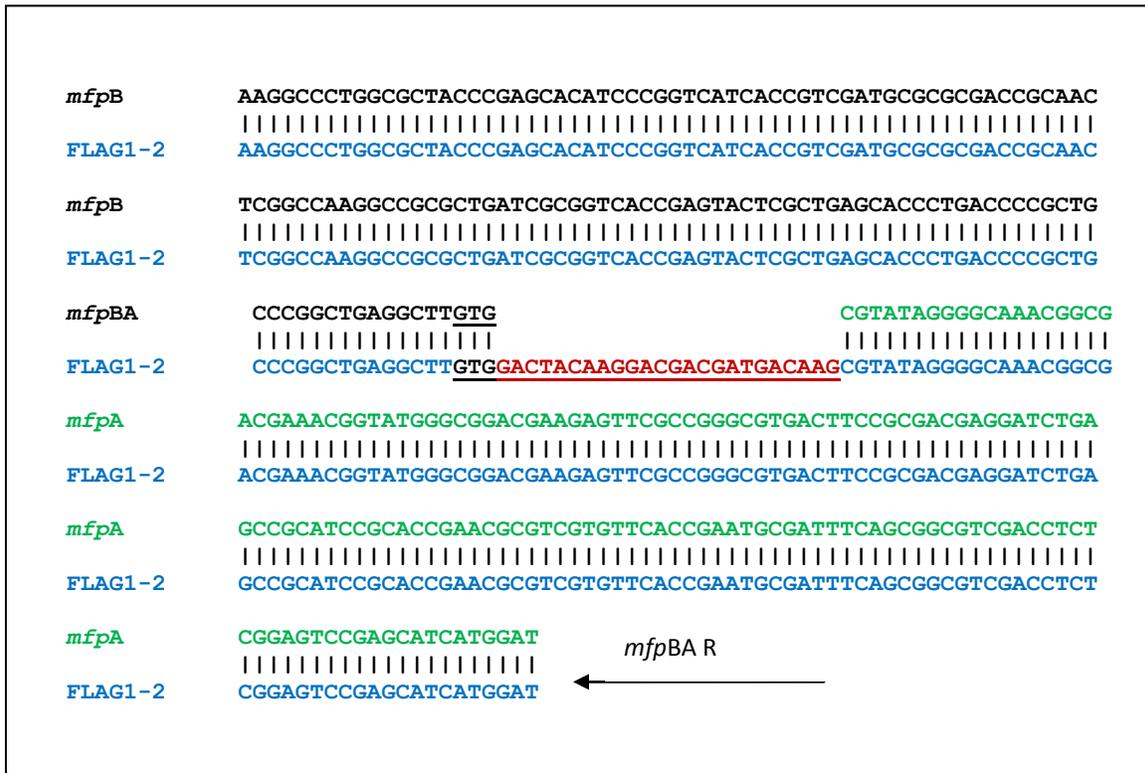


Figura 55. Alineamiento de la secuencia obtenida para el amplificado **FLAG1-2**. El cebador empleado fue *mfpBA* R (reverso) Tabla V, ya que con este fue posible detectar si la secuencia del epítoto FLAG fue incorporada durante la extensión por solapamiento de los genes *mfpEB* y *mfpA*. La secuencia de los genes *mfpB* y *mfpA* (ADNg de *M. smegmatis*) se utilizó para el alineamiento. La secuencia del epítoto se encuentra resaltada en color rojo pertenece al epítoto **FLAG**. **GTG** pertenece al codón de inicio del gen *mfpA*

7. DISCUSIÓN

La tuberculosis constituye un problema de salud a nivel mundial. A pesar de ello no existe una terapia verdaderamente efectiva que logre erradicar dicha enfermedad, ya que desafortunadamente el tratamiento presenta una alta tasa de toxicidad y numerosos efectos secundarios, que dificultan la adherencia de los pacientes al mismo y contribuye a la aparición de cepas multirresistentes a las drogas disponibles. Entre estas drogas encontramos a las fluoroquinolonas cuyo blanco de acción es en la enzima ADN girasa, que al unirse a MfpA genera un mecanismo de resistencia que bloquea la función de dichos antibióticos. Por esta razón es necesario estudiar la relación que pudiera existir entre el gen en cuestión y las FQs. Es por este motivo, que en este trabajo se planteó construir una cepa mutante de *M. smegmatis* que contenga el epítotope FLAG para poder seguir dicha proteína, ya que MfpA no es una proteína inmunogénica y por tanto pueden producirse anticuerpos anti-MfpA. Se deseaba construir dicha mutante con el fin de determinar los niveles de expresión de la proteína de interés en otras cepas mutantes en *gyrA* y bombas de eflujo. Es por ello que se utilizó una técnica de manipulación genética para llevar a cabo el reemplazamiento de genes y poder introducir el epítotope FLAG en el extremo N-terminal de MfpA.

Las estrategias de reemplazamiento de genes utilizando vectores no replicativos, fragmentos lineales de ADN y plásmidos incompatibles han sido desarrollados, pero se necesitan grandes cantidades de ADN (1- 10ng) y aunado a esto, se obtiene un bajo rendimiento de mutantes. Aún así, plásmidos trasbordadores facilitan la recuperación de mutantes pero típicamente se requiere de múltiples pasos

de transformación y selección (Bardarov y col., 2002). Pero esto no es suficiente para aumentar la frecuencia de recombinación en micobacterias. Por ello se propone una técnica que podría simplificar extremadamente su manipulación genética, utilizando las bondades de la λ y las funciones de los genes *red* del bacteriófago lambda (λ) para llevar a cabo diversos procesos de clonación y modificación genética (Sawitzke y col., 2007). Los genes *red* de λ pueden realizar un intercambio genético entre dos moléculas de ADN con regiones homólogas muy pequeñas, de aproximadamente 50 pares de bases (pb) o menos, comparado con otros procesos mediados por la proteína RecA, que utiliza fragmentos de mayor tamaño para poder lograr una alta eficiencia de recombinación (Watt y col., 1985; Shen y Huang, 1986; Oppenheim y col., 2004).

La *recombinación* se define como el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas de ADN idénticas (Szostak y col., 1983). En *E. coli* ocurre por vía de RecBCD, RecFOR y RecET (Kowalczykowski y col., 1994; Clark y Sandler, 1994). El complejo RecBCD inicia la recombinación con ADN doble cadena (Kowalczykowski, 2000), mientras que el complejo RecFOR (junto con otras proteínas) inicia el evento utilizando ADN de cadena sencilla (Horii y Clarck, 1973).

Se sabe que la vía RecBCD es mucho más eficiente que RecFOR (100 veces más), aunque se propone que su principal función es durante la replicación del ADN al reparar y reiniciar la replicación de horquillas atoradas (Kuzminov, 1995). RecE es una exonucleasa 5' - 3' que depende del ADN doble cadena y junto con RecT promueven el alineamiento de cadenas sencillas. Los genes *recT* y *recE* son parte del profago Rac presente en algunas cepas de *E.coli* (Hall y col., 1993; Hall y Kolodner, 1994; Muyrers y col., 2000). La función final de cada vía de recombinación es generar extremos de ADN 3', los cuales son necesarios para el evento de invasión y apareamiento de

regiones complementarias en el ADN, etapa dependiente de la proteína RecA (Kowalczykowski y col., 1994). Una mutación en el gen *recA* finaliza la y las cepas son extremadamente susceptibles a compuestos químicos que dañan el ADN (Clark y Margulies, 1965). Esta proteína RecA se une a los extremos 3' iniciando la búsqueda e invasión de la región homóloga (ADNdc) (Nishinaka y col., 2007). Durante esta etapa de la recombinación se forma una estructura de cuatro cadenas de ADN conocida como el intermediario de Holliday (Hollyday, 1990). Esta estructura es procesada por la proteína RuvAB o RecG y resuelta por medio de un corte endonucleotídico por la enzima RuvC (Rafferty y col., 1996) Al final de este proceso de intercambio de información, una ADN ligasa sella las cadenas y termina el evento de (Fig 56).

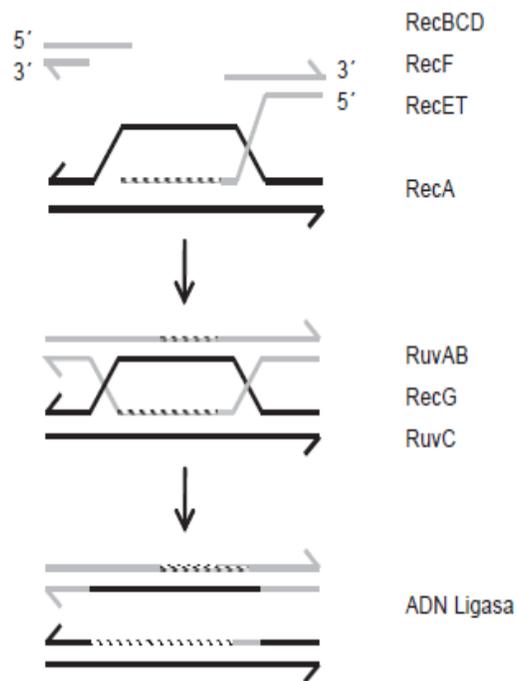


Figura 56. Modelo de las vías RecBCD, RecFOR y RecET generan extremos de ADN 3', las cuales son reconocidas por RecA para la invasión de la región homóloga. Proteínas como RuvAB, RecG migran el intermediario de Holliday y RuvC lo resuelve con un corte. La ADN ligasa posteriormente liga los cortes.

La en *E. coli* depende en un alto grado de la función del gen *recA* (Clark y Margulis, 1965; Kowalczykowski y col., 1994); sin embargo, la recombinación del fago λ es muy eficiente tanto en una mutante *recA*, como en la cepa silvestre de *E. coli* (Brooks y Clark, 1967; Muyrers y col., 2000). Esto se debe a que el genoma de λ contiene los genes de recombinación Red: *exo*, *bet* y *gam* (Court y col., 2002). Los genes *exo*, *beta* y *gam* se encuentran localizados dentro del operón PL del fago λ y su expresión se da durante las etapas tempranas de la infección del fago. La proteína Exo del fago λ es una exonucleasa que degrada ADN lineal en dirección 5' - 3' (Carter y Radding, 1971).

Estudios *in vitro* demuestran que puede degradar hasta 1000 pares de bases por segundo, aunque depende del contenido de bases nucleotídicas del ADN, así como de cambios estructurales del complejo ADN-Enzima (Matsuura y col., 2001; van Oijen y col., 2003; Perkins y col., 2003). La proteína Exo puede reconocer extremos de ADN doble cadena o de cadena sencilla para proceder con la degradación de mononucleótidos y generar extremos 3' (Ellis y col., 2001; Subramanian y col., 2003) (Fig. 57).

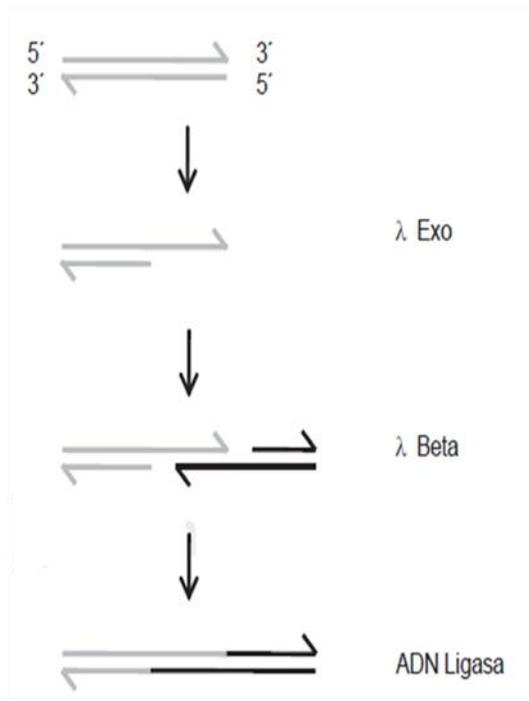


Figura 57. Modelo de acción de los genes red del fago lambda en . Mientras que Gamma inhibe la actividad de RecBCD, Exo degrada el ADN en dirección 5'- 3' para generar extremos 3'. El alineamiento de cadenas es mediado por Beta.

Se propone que las proteínas Exo y Beta pueden interactuar y funcionar de manera coordinada para llevar a cabo la recombinación. Una vez que Exo genera extremos de ADN 3', éstos son inmediatamente reconocidos por Beta en una dirección 3'- 5' (Fig. 57). Beta se une establemente al ADN simple cadena en un número de bases mayor a 35 nucleótidos (Muniyappa y Radding, 1986) protegiéndolo de la degradación de nucleasas. Posteriormente la proteína Beta promueve el apareamiento y alineación de regiones homólogas de ADNcs. Como se muestra en la Figura 58, Beta hibrida con los extremos 3' generados por Exo con otras regiones de ADN simple cadena pero es incapaz de invadir el ADN doble cadena como lo realiza RecA (Court y col., 2002). Se propone que ésta es una diferencia importante entre los dos sistemas de (Figs. 56 y 57).

Las actividades de Exo y Beta no se podrían llevar a cabo sin la función de Gamma. Esta proteína se une a RecBCD e inhibe sus funciones de nucleasa, formando el complejo Gamma-RecBCD (Murphy, 2007; Court y col., 2007). Aún cuando se sabe que Gamma puede bloquear la actividad nucleasa de RecBCD, las actividades de recombinación no son afectadas completamente en cepas que expresan Gamma (Murphy, 1991; Court y col., 2002). Se ha sugerido que el complejo Gamma-RecBCD retiene algunas funciones de recombinación, y que enzimas de la vía RecFOR son requeridas para recombinar en presencia de Gamma. RecBCD es una exonucleasa potente de fragmentos lineales de ADN que los degrada y evita que recombinen con el genoma de la bacteria (Sawitzke y col., 2007). Es por ello importante la función de Gamma, ya que mediante la inhibición de estas nucleasas, las secuencias de ADN exógeno son más estables y permiten que se puedan integrar en regiones homóloga del genoma bacteriano, ya sea plásmido o cromosoma (Ellis y col., 2001; Court y col., 2002).

El desarrollo de esta estrategia en *E. coli* depende de las funciones Red del fago λ . La función de estas proteínas λ no es universal en bacterias Gram-negativas y Gram-positivas. Por lo tanto, se han buscado alternativas y actividades análogas a los genes *red* de λ en bacterias Gram-positivas. Recientemente, van Kessel y Hatfull (2007) reportaron un sistema de reemplazamiento alélico en *Mycobacterium tuberculosis* y *Mycobacterium smegmatis*; utilizando a el micobacteriófago Che9c, cuyas enzimas se caracterizaron bioquímicamente y fueron utilizadas para el intercambio alélico tanto en micobacterias de crecimiento lento y rápido (van Kessel y Hatfull).

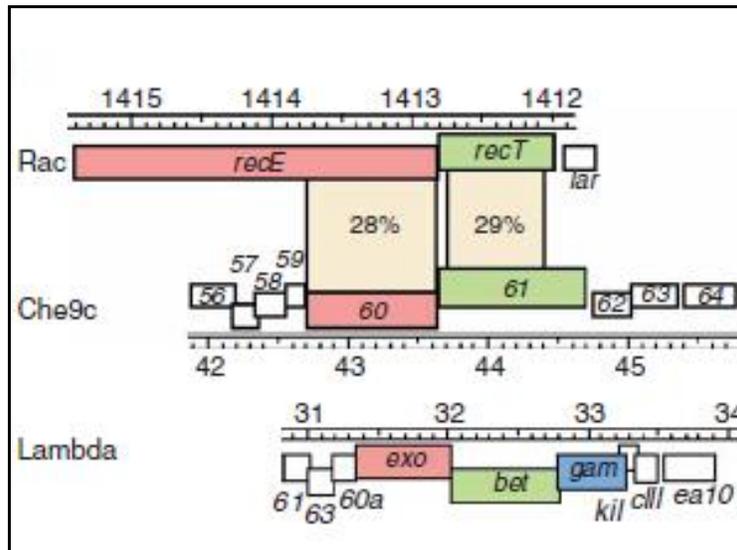


Figura 58. Mycobacteriófago Che9c codifica para las proteínas RecE-RecT. Proteínas-como: Che9c gp60 y gp61 son parientes lejanos de RecE y RecT, respectivamente, codificada por el profago Rac *E. coli*. Ni Rac ni Che9c tienen funciones similares a la proteína Gam codificada por el sistema del fago Red λ . Los genes de Rac y Che9c son transcritos de izquierda a derecha; los genes de λ se transcriben de derecha a izquierda. Marcos de lectura abiertos están representados por cajas y localización en el genoma se indica en kps.

Descubrieron que el genoma del micobacteriófago contiene genes homólogos a RecE y RecT (Fig. 58). Che9c gp60 codifica para una exonucleasa (5'-3') dependientes de ADN doble cadena homóloga a RecE (Exo) Muyrers y *col.*, 2000). Che9c gp61 homóloga de RecT y λ Beta son proteínas que se unen al ADNcs y promueven el alineamiento con regiones homólogas de ADN (Li y *col.*, 1998). Para conocer si realmente estas dos proteínas, gp60 y gp61 podían funcionar como un sistema de recombinación en estas dos bacterias Gram-positivas. Ambos genes se expresaron en un vector que fue transformado en dichas bacterias. La transcripción de estos genes fue regulada por un promotor inducible por acetamida. Utilizando como templado diferentes plásmidos se amplificaron diversos productos de PCR que contenían regiones homólogas de ~50 pb a 500 pb en ambos lados del marcador que es el cassette de higromicina, esto con el fin de realizar el intercambio de diversos genes. Las frecuencias para generar mutantes mediante un reemplazamiento alélico

ambas bacterias fueron de $\sim 1 \times 10^{-4}$. Del total de recombinantes analizados, el 90% contenían la mutación correcta. Este trabajo de investigación propone que es una tecnología eficiente (van Kessel y Hatfull, 2007) (Fig. 59), y por lo tanto factible para bacterias gram-positivas. La proteína Che9c gp60 tiene 314 aminoácidos siendo más pequeña que RecE, que tiene 866 residuos, teniendo un 28% de identidad con esta última, mientras que Che9c gp61 tiene 39% de homología con RecT.

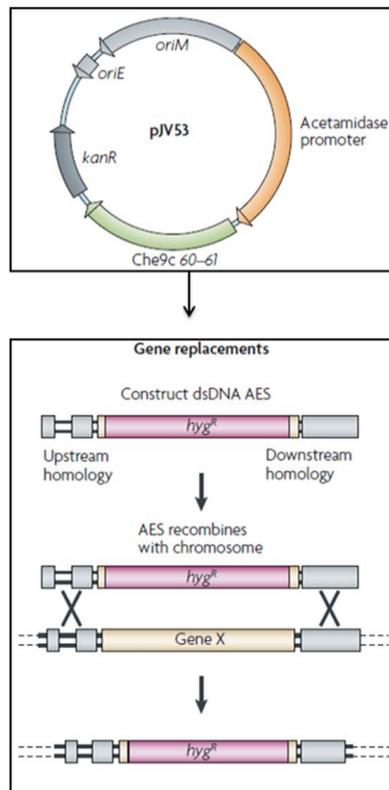


Figura 59. Estrategia propuesta por van Kessel y Hatfull en el 2007, para la en micobacterias (van Kessel y Hatfull, 2008).

La construcción de la mutante mediante el reemplazo de genes pueden ser fácilmente construida por electroporación de ADN lineal (AES) como sustrato en cualquiera de las cepas: *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*. Normalmente AES contienen regiones de homología aguas arriba y aguas abajo del gen diana que flanquea un cassette de resistencia a antibióticos, como el cassette de resistencia a higromicina

(*hyg*^r). Se recomienda el uso de un mínimo de 500 pb de homología (Fig. 59). Un protocolo simple implica la transformación de células electrocompetentes que contienen *M. smegmatis* y pJV53 que inducen la expresión de gp60 y gp61 con 100 ng del AES linearizado.

La recombinación homóloga está permitiendo que se revolucione el conocimiento de la biología de bacterias como *E. coli*. De igual manera, el uso de esta novedosa tecnología es hoy en día posible en algunas otras especies del grupo Gram-negativos. Actualmente se está desarrollando en géneros donde las técnicas de modificación genética no son tan adelantadas como en *E. coli*. Esto permitirá que se aceleren los estudios de la genómica funcional, incluyendo la posibilidad de generar colecciones de mutantes en genomas completamente secuenciados. En muchos casos se puede utilizar el esqueleto de algunos vectores ya construidos (Datta y col., 2006) mediante la inserción de nuevos promotores o cambiando el origen de replicación. La finalidad es que expresen adecuadamente los genes *red* del fago λ y faciliten su movimiento a diferentes especies bacterianas. En el caso de las bacterias Gram-positivas, las investigaciones sobre el reemplazamiento aleélico se limitan a las micobacterias.

Bajo este esquema se inició la estrategia para etiquetar el gen *mfpA* de *M. smegmatis* bajo los principios de la recombinación homóloga, utilizando la metodología propuesta por van kessel y Hatfull en el 2007, clonando las regiones homólogas 5' y 3' del gen de interés en un vector de clonamiento, en este caso utilizamos pYUB854, propuesto por Bardarov y colaboradores en el año 2002 como un vector suicida eficiente utilizado para el reemplazamiento alélico.

Para ello se inició con el aislamiento del ADN genómico de *M. smegmatis*, ya que a partir de este se amplificarán las regiones de homología (el extremo 5' y 3' del gen *mfpA*) necesarias para el evento de erecombinacion homóloga.

Para lograr obtener la construcción de la cepa mutante de *M. smegmatis*, se realizó el aislamiento del ADN genómico de *M. smegmatis* (Fig. 20) ya que a partir de esta muestra se amplificaron mediante PCR las regiones flanqueantes 5' y 3' del gen *mfpA*. De esta forma, resultó incorporada la secuencia FLAG hacia el extremo 3' del gen ya que el primer reverso 5' KOMfpAFR1 (tabla V), contiene la secuencia del epítotope (**TACAAGGACGACGATGACAAG**). De esta manera la proteína MfpA quedaría etiquetada hacia su extremo N-terminal con el epítotope FLAG. Dicha proteína no se etiquetó hacia su extremo C-terminal, debido a que se sabe que esto afecta el plegamiento natural de la proteína.

Una vez obtenidos los amplificados KOMfpAFR1 y KOMfpAFR2 (Fig. 21) se comprobó mediante secuenciación (Figs. 22 y 23) y se continuó con la estrategia de clonamiento en dos partes. En primer lugar se clonó KOMfpAFR1 (extremo 5' del gen *mfpA*) en el vector pYUB854, que previamente fue aislado por el método de lisis alcalina (Fig. 25). Ambos ADNs fueron digeridos con las enzimas de restricción *HindIII* y *XhoI*, para generar los extremos cohesivos necesarios para realizar las reacciones de ligamiento donde la enzima T4 DNA ligasa, une los extremos 5' OH y 3' P que se generan con las enzimas de restricción; uniéndose así los extremos del vector con los del primer amplificado (KOMfpAFR1). Una vez obtenida la primera construcción (Fig. 27); donde existe una diferencia de peso notable entre el vector y el primer clon pYUB854-KOMfpAFR1, en los carriles 1 y 3 respectivamente. Para corroborar que se había incorporado este fragmento se realizó una digestión con las

enzimas de restricción empleadas para el clonamiento y en el mismo gel se observan que efectivamente se liberaban las bandas de aproximadamente 650 pb de KOMfpAFR1 en los carriles 4 y 6 respectivamente.

Una vez obtenido este plásmido recombinante, con el primer fragmento, se realizó una nueva digestión pero con las enzimas de restricción seleccionadas para clonar el segundo amplificado (*DraI* y *KpnI*) dirigido hacia el extremo 3' del gen *mfpA*, estos cebadores hibridan específicamente en el gen que esta aguas arriba de *mfpA*, llamado 1642 (Fig. 13), pero al realizar las reacciones de ligamiento y transformación no se obtenían los clones deseados, por ello se decidió realizar las pruebas de ligamiento pertinentes tanto al vector de clonamiento (pYUB854-KOMfpAFR1) como al fragmento digeridos con las enzimas correspondientes. Para el fragmento la digestión se realizó con cada enzima por separado a fin de comprobar cuál de las dos enzimas estaba impidiendo el clonamiento de KOMfpAFR2. La prueba de ligamiento del vector arrojó los resultados esperados, donde se demostró que efectivamente este se encontraba digerido apropiadamente, lo mismo ocurrió para el fragmento KOMfpAFR2 digerido con *KpnI*, ya que se pudo observar la formación de dímeros (Fig. 25), en el segundo carril, mientras que para la digestión realizada con *DraI*, no se obtuvieron los dímeros necesarios que comprobaran la eficiencia de la digestión, por lo que se dedujo que este fragmento estaba afectando el clonamiento. Debido a esto se decidió cambiar de sitio de restricción de *DraI* por *AflI*, mediante mapas de restricción y para ello se diseñó nuevamente el primer KOMfpAR2 a fin de cambiarle el sitio de reconocimiento de la enzima y al realizar las reacciones de ligamiento y transformación correspondiente se obtuvieron los clones esperados (Fig. 28). De la misma forma que se realizó con el primer plásmido recombinante se realizaron ensayos de restricción, a fin de verificar

que efectivamente se habría logrado el segundo clonamiento con éxito. Y se encontró que ciertamente se había logrado incorporar el amplificado perteneciente a la región 3' del gen *mfpA*; y se obtuvieron las bandas esperadas para los seis (6) clones conseguidos (Fig. 28).

Para corroborar el clonamiento y que indudablemente los fragmentos amplificados por PCR que se clonaron en pYUB854, eran los extremos 5' y 3' correspondientes al gen *mfpA*, los productos de PCR fueron secuenciados empleando como molde (Figs. 30 y 31), ADN plasmídico de los presuntos clones (Fig. 29), previamente verificados por ensayos de restricción.

Una vez obtenido el plásmido recombinante que contuviera los extremos 5'y 3' de gen *mfpA*, necesarios para que ocurra el evento de (van Kessel y Hatfull, 2007) se realizó el proceso de electroporación en *M. smegmatis* del plásmido pJV53. Una vez incorporado este plásmido en la micobacteria se tiene la maquinaria (Fig. 59) necesaria para que ocurra la de los genes de *mfpA*-1642 que se encuentran clonados en el vector pYUB854. Al electroporar este último en mc²155+pJV53 no se obtuvieron las transformantes esperada.

van Kessel y Hatfull en el protocolo de micobacterias, explican que este método podría llegar a tener una baja eficiencia debido a que:

1.- La frecuencia de recombinación que genera este método no es muy elevada, por lo tanto, no es 100% eficiente. El proceso de transformación tiene una eficiencia de 10⁶ transformantes/ μ g, utilizando 50 ng de ADN. Por esta razón, ellos recomiendan realizar el protocolo con 100 ng de ADN; con el fin de favorecer un poco más el evento de recombinación. El experimento ciertamente se realizó con la cantidad de ADN

recomendada por los autores, aunque no se obtuvieron los resultados esperados, a pesar de realizarse varias veces.

Adicionalmente puede estar ocurriendo que el gen sea esencial y la incorporación del epítipo pueda afectar su expresión hasta el plegamiento de la proteína.

Sin embargo, se sabe que la construcción se realizó de forma incorrecta, debido a mal diseño de cebadores, donde los genes *mfpA* y 1642, no quedan en fase para que ocurra la estrategia de recombinación homóloga, por lo que esta es la razón por la cual la estrategia no funcionó.

Debido a esto se concluyó que la estrategia pudo plantearse de otra forma, cambiando los sitios de restricción para ambos fragmentos, para ello sería necesario cambiar los sitios de restricción en los cebadores KOMfpAF1 y R1 y KOMfpAF2 y R2, así los fragmentos correspondientes a los extremos 5' y 3' del gen *mfpA* quedarían clonados de la siguiente manera en pYUB854:

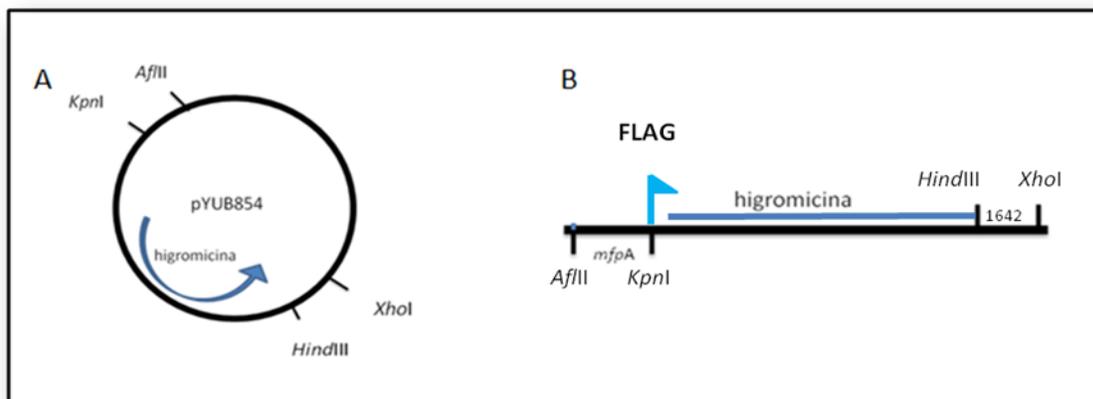


Figura 60. Vector de clonamiento pYUB854 con las regiones de clonamiento; B. fragmento linealizado con *mfpA* clonado, mostrando donde se encuentra el epítipo FLAG.

Esta puede ser una modificación en la estrategia que a futuro proyecte los resultados esperados y posiblemente se pueda lograr el etiquetamiento de la proteína MfpA con el epítoto FLAG.

Sin embargo, en este estudio se deseaba construir una cepa mutante de *M. smegmatis* por lo que se decidió realizar una nueva estrategia para el etiquetamiento de la proteína mediante la extensión por solapamiento mediante PCR. Para dicho marcaje se diseñaron nuevos cebadores y se trabajó con el operón que contiene al gen *mfpA*. Para ello se realizó la amplificación de dos regiones que contuvieran una secuencia complementaria (Fig. 16), a fin de generar un producto final que se encuentre marcado en este caso con el epítoto FLAG.

En primer lugar se realizó la PCR para amplificar la región *mfpEB* (Fig. 17), con los cebadores específicos indicados, quedando la secuencia de aproximadamente 4700 pb etiquetada hacia su extremo 3' por la secuencia del epítoto FLAG y hacia su extremo 5' se le incorporó el sitio de reconocimiento para la enzima *PacI* (Fig. 61), mientras que para el fragmento FLAG2 (región *mfpA*) se incorporó la secuencia complementaria del epítoto hacia su extremo 5', quedando incorporado el sitio *PacI* en el extremo 3' (Fig. 61); ya que este es el sitio de clonamiento que se utilizó en el vector pYUB412.1. FLAG1 y FLAG2 fueron obtenidos exitosamente (Fig. 35), esto se corroboró mediante secuenciación (Figs.36, 37, 40, 41 y 42) , donde efectivamente encontramos al epítoto FLAG en cada uno de los productos primarios y una vez purificados mediante el estuche comercial apropiado, se procedió a realizar la tercer

PCR utilizando como molde ambos productos primarios:

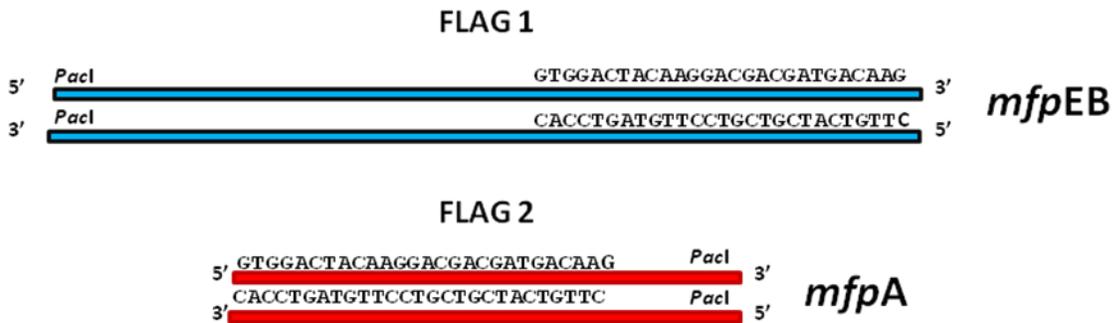


Figura 61. Fragmentos correspondientes a los amplificados mediante PCR del gen *mfpEB* (FLAG1), etiquetado hacia su extremo 3' con la secuencia del epítipo FLAG y del gen *mfpA* (FLAG2) con el mismo epítipo hacia su extremo 5'.

En la tercera PCR, debido a la complementariedad de bases del epítipo (FLAG) incorporado tanto en FLAG1 como en FLAG2 (Fig 61), las secuencias se solapan, para dar origen a un amplificado completo del operón *mfpEA*, pero con los 24 nucleótidos pertenecientes al epítipo FLAG etiquetando al gen *mfpA* hacia su extremo 5'. Esto ocurre de la siguiente manera: la cadena 5'- 3' del segmento FLAG1 se solapa con la secuencia 3'- 5' de FLAG2 (Fig. 62.A), donde ambos epítopos tienen extremos 3'OH libres reconocidos por la ADN polimerasa y extender para originar el producto completo (*mfpEA*), por lo tanto esta extensión puede ocurrir sin la presencia de cebadores, además que en estas secuencias no tienen sitio de reconocimiento para estos. Por otro lado, en el caso de la cadena 3'- 5' FLAG1 se complementa con la secuencia 5'- 3' de FLAG2 (Fig. 63.A), donde la extensión ocurre por la hibridación de los cebadores externos *mfp5Pacl* y *mfp10 Pacl* (Fig. 62.B) generando la secuencia FLAG1-2 (*mfpEA*), con el epítipo FLAG incorporado. Esta estrategia se logró y efectivamente el PCR arrojó una banda de aproximadamente 5350 pb (Fig.43) teniendo como punto de

referencia el MPM λ HindIII (NEB). Este fragmento fue purificado y enviado a secuenciar.

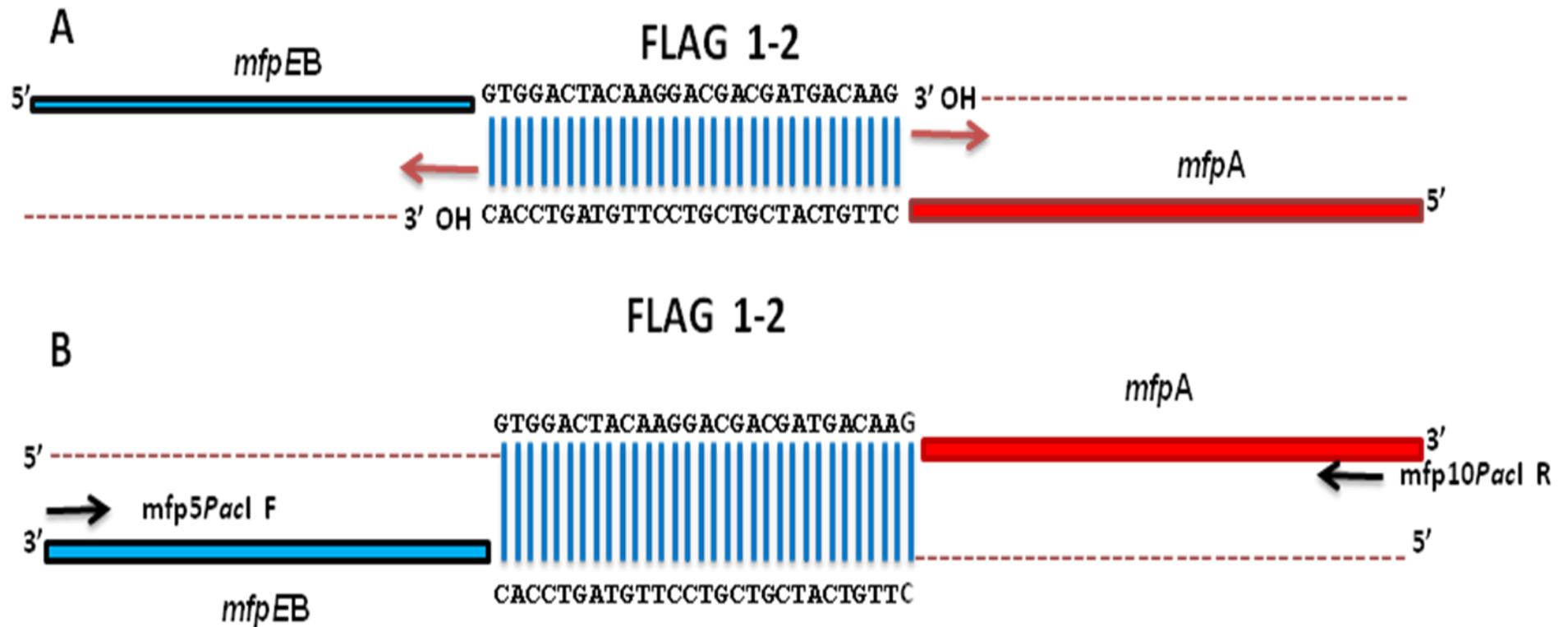


Figura 62. Extensión por solapamiento mediante PCR de los genes *mfpEB* y *mfpA*, para etiquetar a la proteína MfpA con el epítoto FLAG. A. Extensión por parte de la ADN polimerasa, sin cebadores, de la secuencia nucleotídica del epítoto. B. Extensión por parte de la ADN polimerasa con la acción de los iniciadores *mfp5Pacl F* y *mfp10Pacl R*.

Mientras se obtenía la secuencia donde se comprobaría que el epítoto FLAG fue incorporado y aunado a eso tener limitaciones de tiempo, se continuó con la estrategia de clonamiento, una vez digerido el fragmento FLAG1-2 y el vector con la enzima de restricción *PacI*, se realizaron las reacciones de ligamiento y transformación correspondientes para obtener los clones deseados. Efectivamente este objetivo fue alcanzado, y se logro clonar el segmento obtenido en la extensión por solapamiento de genes. A este plásmido recombinante se le llamó pYUB412.1-FLAG1-2 (Fig. 45), y se envió a secuenciar con los cebadores *mfpBA* F y R, a fin de corroborar que efectivamente se encontraba incorporado el epítoto.

Este clonamiento fue confirmado mediante ensayos de restricción, con la enzima *PacI*. En la figura 46, se observa en el primer carril la banda correspondiente al clon pYUB412.1-FLAG1-2, cuyo tamaño es de 13912 pb aproximadamente, en el siguiente carril donde se colocó la digestión se obtuvieron dos bandas, una perteneciente al vector pYUB412.1 que tiene un tamaño de 8562 pb, que tiene concordancia con el quinto carril donde se colocó pYUB412.1 como control; por lo tanto la segunda banda onbservada en el tercer carril corresponde al tamaño esperado para el fragmento FLAG1-2 (5350 pb).

Al confirmar el clon por ensayos de restricción, se procedió a realizar la electroporación en *M. smegmatis*, utilizando como control el plásmido pALACE (Fig. 11D) y se obtuvieron las transformantes esperadas, tanto en los controles como en el experimento (mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2) y se colocaron inóculos de estas colonias para realizar el aislamiento de proteínas para realizar el western blot y el aislamiento de ADN genómico de micobateria.

Con el ADN genómico de *M. smegmatis* (mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2) se realizaron 2 PCRs, uno con los cebadores específicos para el vector pYUB412.1 y se obtuvo que efectivamente se había logrado integrar al vector en el genoma de la micobacteria ya que el tamaño del amplificado era el esperado, aproximadamente unas 6000 pb (Fig. 48); y el segundo PCR que se realizó fue con los primers *mfpBA* F y R, para amplificar la región que contiene al gen *mfpA* etiquetado con el epítipo FLAG, pero utilizando como ADN molde, los clones obtenidos en la electroporación, de esta manera se tendría un control sobre la estrategia en cada paso, para ello estos productos también fueron enviados a secuenciar. Para esta PCR, se obtendrían dos productos; ya que como se explicó anteriormente, al integrarse el vector en el genoma quedan automáticamente dos copias del operón, uno que tiene incorporado el epítipo y uno silvestre. Pero como la diferencia entre ambos son los 24 nucleótidos del epítipo FLAG, por lo que no podría ser observado en un gel de agarosa, así que se aisló la banda y esta se envió a secuenciar. Mientras se obtenían todas las secuencias que confirmaran la incorporación del epítipo FLAG, se continuó con el último objetivo propuesto, la detección de la proteína por el western blot, donde no se obtuvieron los resultados esperados para las proteínas aisladas del cultivo de mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2, mientras que para los controles positivos, si se detectó la proteína FLAG-BAP de aproximadamente 49 kDa (Fig. 51). Luego de recibir las secuencias donde se confirmaba la presencia del epítipo FLAG dentro del operón *mfpEA* (FLAG1-2), utilizando como ADN molde:

- FLAG1-2 (Fig. 43),
- PCR (pYUB412.1-FLAG1-2)
- PCR *mfpBA* (mc²155-pYUB412.1-FLAG1-2) (Fig. 53).

Fueron analizadas y se determinó que ninguna tenía incorporado el epítotope FLAG, pero el solapamiento de genes si ocurrió con éxito ya que como se observa en cada una de las secuencias, estas alinean tanto en los genes de *mfpB*, que sólo forman parte de FLAG1, como *mfpA* que pertenece a FLAG2, solo que el solapamiento de genes ocurrió solo mediante los nucleótidos (GTG), que se encontraban incorporados dentro de la secuencia de los cebadores. No obstante se continuaron realizando nuevos intentos a fin de lograr el etiquetamiento de la proteína MfpA y efectivamente, se volvió a realizar un PCR (Fig. 54). Donde ciertamente se consiguió realizar el etiquetamiento de los genes con la secuencia del epítotope; esto se confirmó mediante secuenciación, donde efectivamente se observa la secuencia del epítotope (Fig. 55).

Lamentablemente el volumen final utilizado para el PCR fue de 20 µl, y luego de su purificación, la concentración de ADN final era muy baja, por lo que todo el producto se envió a secuenciar, debido a la falta de tiempo estos experimentos no pudieron continuarse y no puedo volver a reproducirse el solapamiento de estas secuencias ya que esta es una técnica bastante compleja. Además una limitación adicional de la estrategia es que los dos fragmentos tienen una diferencia de tamaño considerable (Fig. 35), lo que puede afectar la eficiencia de la técnica. FLAG1, tiene aproximadamente 4700 pb, mientras que FLAG2, tiene 650 pb. La estrategia se diseñó de esta manera, debido a que el gen *mfpA* forma parte de un operón, y aún cuando esta es modificada al introducir el epítotope FLAG, se aseguraría la expresión de la proteína a partir de su propio promotor; ubicado en el extremo 5' del gen *mfpE*, que forma parte de FLAG1.

Aunado a esto, uno de los fragmentos tiene un tamaño de aproximadamente 4kb, y en el año 2007 Hecmank y Pierce, reportaron que los fragmentos utilizados para realizar un PCR de extensión no deberían ser mayor de 2kb, dependiendo de la polimerasa utilizada, porque esto disminuye la eficiencia de la extensión por solapamiento de las secuencias, aunque con la enzima empleada en este trabajo eso no representa un problema, ya que extiende hasta 7.5 kb.

Finalmente enfocándonos en la proteína MfpA, en la biología de la micobacteria no se conoce su función, justo aguas arriba del gen *mfpA*, hay 4 genes que están altamente conservados en las micobacterias y aparentemente se expresan como parte de la misma unidad transcripcional (Fig. 10, Tabla VII). Esta organización también se ha encontrado en otros Actinomycetes, familia a la cual pertenecen las micobacterias (Fig. 10) (Vetting y col., 2006).

Con respecto a la función biológica de la proteína MtMfpA, se puede sugerir que la expresión de la proteína de la misma podría estar relacionada con el ciclo celular con el fin de proveerle asistencia topológica al ADN cuando sea necesario. Se cree que fisiológicamente estos pentapéptidos repetidos pueden ser una clase de reguladores proteicos de unión a ADN. Como consecuencia de ello, la unión de MtMfpA a la subunidad α de la ADN girasa podría inhibir la asociación del ADN a la misma y bloquear la formación del blanco de las FQ, el complejo binario ADN-girasa (Vetting y col., 2006).

Tabla VIII. BLASTp de los marcos abiertos de lectura que forman parte del presunto operón en *M. smegmatis* y

M. tuberculosis.

Gen	Longitud del gen (pb)	Definición de la proteína	Longitud de la proteína	% de indentidad
<i>mfpA</i>	576	Pentapéptido	192	66
Rv3361c	552	Pentapéptido	183	
<i>mfpB</i>	582	Unión ATP/GTP	193	77
Rv3362c	582	Unión ATP/GTP	193	
<i>mfpC</i>	366	Hipotéticamente conservada	121	68
Rv3363c	369	Hipotéticamente conservada	122	
<i>mfpD</i>	408	Hipotéticamente conservada	135	82
Rv3364c	393	Hipotéticamente conservada	130	
<i>mfpE</i>	2784	Interal d membrana histidina -quinasa	927	46
Rv3365c	2631	Interal d membrana histidina -quinasa	876	

Aunque ambas proteínas tengan un alto porcentaje de homología no se supone sean iguales, por lo que, realiza un experimento con *M. smegmatis*, para extrapolarlo a *M. tuberculosis*, pueden ser resultados muy poco válidos.

Finalmente, yo continuaré realizando la estrategia hasta lograr etiquetar la proteína; de no lograrse, tomaría en consideración todas las limitaciones antes mencionadas para lograr el etiquetamiento en el extremo N-terminal de la proteína MfpA a nivel cromosomal, en *M. smegmatis*.

8. CONCLUSIONES

- A pesar de obtener el clonamiento propuesto para el vector pYUB854, con los extremos 5´ y 3´ del gen *mfpA*; la estrategia de reemplazamiento alélico, no se pudo lograr, ya que es un método de manipulación genética bastante complejo, a pesar de mostrarse como una metodología sencilla, por lo complicado que resulta el proceso de recombinación homóloga.
- La estrategia de extensión por solapamiento mediante PCR, también parece ser una técnica bastante sencilla. En este trabajo se logró incorporar la secuencia del epítotope FLAG al gen de interés empleando esta metodología, obteniendo así, al gen *mfpA* etiquetado hacia su extremo 5´, pero es necesario estandarizar la técnica para poder reproducir el experimento, lo cual no se logró en este trabajo, a pesar de tener la secuencia del epítotope confirmada por secuenciación en los dos productos primarios.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Aldovini, A., Husson R.N. y Young R.A. 1993. The *uraA* locus and homologous recombination in *Mycobacterium bovis* BCG. *J. Bacteriol.* **175**(22): 7282-7289.
2. Alexandre V., Herrera G., Urios A., Blanco M. 1991. Effects of ciprofloxacin on plasmid DNA supercoiling of *Escherichia coli* topoisomerase I and gyrase mutants. *Antimicrob Agents Chemother* **35**(1):20-3.
3. Ayora, S., Missich R., Mesa P., Lurz R., Yang S., Egelman E.H. y Alonso J.C. 2002. Homologous-pairing activity of the *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1 replication protein G35P. *J Biol Chem.* **277**:35969-73599.
4. Bannam, T.L., Johanesen, P.A., Salvado, C.L., Pidot, S.J., Farrow, K.A., Rood, J.I. 2004. The *Clostridium perfringens* TetA(P) efflux protein contains a functional variant of the Motif A region found in major facilitator superfamily transport proteins. *Microbiology.* **150**: 127-134
5. Bardarov, S., Bardarov, S.Jr., Pavelka, M.S. 2002. Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruptions in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology.* **148**: 3007-3017.
6. Bhatt, K, Banerjee, S.K., Chakraborti, P.K. 2000. Evidence that phosphate specific transporter is amplified in a fluoroquinolone resistant *Mycobacterium smegmatis*. *Eur J Biochem.* **7**(13):4028-4032.
7. Blanchard, J. 1992. Molecular mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu Rev. Biochem.* **65**: 215-39.

8. Black, K., Buikema, W., Haselkorn, R., 1995. The hglK is Required for Localization of Heterocyst-Specific Glycolipids in the Cyanobacterium *Anabaena* sp. Strain PPC 7120. *J Bacteriol* **177** (22): 6440-6448.
9. Braibant, M., Gilot, P., Content, J. 2000. The ATP binding cassette (ABC) transport systems of *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS. Microbiol. Rev.* **24**: 449-467.
10. Brennan, J., Nikaido, H. 1995. The envelope of mycobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**:29-63.
11. Brock, T.D., Madigan, M.T. 1993. *Microbiología*. Prentice Hall, 6ta Edición.
12. Brooks, K., Clark A.J. 1967. Behavior of λ Bacteriophage in a Recombination Deficient Strain of *Escherichia coli*. *J. Virol.* **1**(2): 283-293.
13. Brown, M.H., Skurray, R.A. 2001. Staphylococcal Multidrug Efflux Protein QacA. *J.Mol. Microbiol. Biotechnol.* **3**(2): 163-170.
14. Camus, J.C., Pryor, M.J., Médigue, C., Stewart, T.C. 2002. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology.* **148**: 2967-2973.
15. Carter, D.M., Radding, C.M. 1971. The role of exonuclease and β protein of phage λ in genetic recombination. *J. Biol. Chem.* **246**: 2502-2512.
16. Chopra, P. (2003). New drug target for M tuberculosis. *Indian J Med Res* 117, pp 1-9.

17. Choudhuri, B., Bhakta, S., Barik, R., Basu, J., Kundu, M., Chakrabarti, P. 2002. Overexpression and functional characterization of an ABC (ATP-binding cassette) transporter encoded by the genes *drxA* and *drxB* of *Mycobacterium tuberculosis*. *Biochem J.* **367**:279-85.
18. Clark, A.J., Margulies, A.D. 1965. Isolation and characterization of recombination deficient mutants of *Escherichia coli* K12. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **53**: 451-459.
19. Clark, A. y Sandler, S. 1994. Homologous genetic recombination: the pieces begin to fall into place. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**: 125 -142.
20. Cole S. T., Brosch, R., Parkhill, J. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393**:537–544.
21. Cole S. T. (2002). Comparative mycobacterial genomics as a tool for drug target and antigen discovery. *Eur. Respir. J. Suppl.* **36**: 78-86.
22. Coll P. 2003. Drugs with activity against *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **21(6)**: 299-308.
23. Court, D. L. & J. A. Sawitzke & L. C. Thomason. 2002. Genetic engineering using homologous recombination. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 361-388.
24. Court, R., Cook, N., Saikrishnan, K., Wigley, D. 2007. The crystal structure of lambda-Gam protein suggests a model for RecBCD inhibition. *J Mol Biol.* **371**:25-33.

25. Couturier, M., Bahassi, E. y Van Melderen, L. 1998. Bacterial death by DNA gyrase poisoning. *Trends of Microbiol*, 6 **(7)**: 269-275.
26. Daffé, M. y Drapper, P. 1998 The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 131-203.
27. Datta, S., Costantino, N. y Court, D. L. 2006. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. *Gene* **379**:109-115.
28. Davidson, A. y Chen, J. 2004 ATP-Binding Cassette Transporters in Bacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **73**: 241-268.
29. De Rossi, E., Arrigo, P., Bellinzoni, M., Silva, P., Martín, C., Aínsa, J., Gugliera, P., Riccardi, G. 2002. The multidrug transporters belonging to major facilitator superfamily in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Med.* **8**(11): 714-724.
30. De Rossi, E., Aínsa, J., Riccardi, G. 2006. Rol of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question. *FEMS Microbiol Rev.* **30**: 36-52.
31. Einhauer, A. y Jungbauer, A., 2001. The FLAG peptide, a versatile fusion tag for the purification of recombinant proteins. *J. Biochem. Biophys. Methods.* **49**: 455–465.
32. Ellis H. M., D. Yu, T. DiTizio & D. L. Court. 2001. High efficiency mutagenesis, repair, and engineering of chromosomal DNA using single-stranded oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**:6742-6746.

33. Ernts, J.N. 1998. Macrophage receptors for Mycobacterium tuberculosis. *Infect. and Immun.* **66**: 1277-1281.
34. Flynn, J. y Chan, J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:93-129.
35. Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. 1998. *Diagnostic Microbiology*. 10th Edition. Mosby Inc.
36. García, J. y González, A. 2001. Tuberculosis: Patogénesis y Manifestaciones clínicas. *Acta Científica Venezolana.* **52** (Supl. 1):5
37. Gillespie SH. (2002). Evolution of drug resistance in Mycobacterium tuberculosis: clinical and molecular perspective. *Antimicrob Agents Chemother.* **46**: 267-74.
38. Ginsberg A. y Spigelman M. (2007). Challenges in Tuberculosis drug research and development. *Nature Medicine.* **3** (3) 290-294.
39. Ginsburg, A., Grosset, J., Bishai, W. 2003. Fluoroquinolones, tuberculosis and resistance. *Lancet Infect Dis.* **3**: 432 – 42.
40. Godreuil, S., Galimand, M., Gerbaud, G., Jacquet, C., Courvalin, P. 2003. Efflux Pump Lde Is Associated with Fluoroquinolone Resistance in *Listeria monocytogenes*. *Antimicrob. Agents. Chemother.* **47**(2): 704-708.
41. Hall, S.D., Kane, M.F. y Kolodner, R. D. 1993. Identification and characterization of the *Escherichia coli* RecT protein, a protein encoded by the recE region that promotes renaturation of homologous single-stranded DNA. *J Bacteriol.* **175**:277-287.

42. Hall, S.D. y Kolodner, R. D. 1994. Homologous pairing and strand exchange promoted by the *Escherichia coli* RecT protein. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 91:3205-3209.
43. Hanahan, D. 1983. Studies of the transformation en *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol. Biol.* **166**:557-580.
44. Hata M, Susuki M, Matsumoto M, Takahashi M, Sato K, Ibe S and Sacae K. (2005). Cloning a novel gene for quinolona resistance from a transferable plasmid in *Shigella flexneri* 2b. *Antimicrob Agents Chemother.* **49(2)**: 801-803.
45. Heckman, L., y Pease, L. (2007) Gene splicing and mutagenesis by PCR-driven overlap extension. *Nat. Protoc.* **2(4)**:924-32.
46. Hedge, S., Vetting, M., Roderick, S., Mitchenall, L., Maxwell, A., Takiff, H., Blanchard, J. 2006. A Fluoroquinolone Resistance Protein from *Mycobacterium tuberculosis* That Mimics DNA. *Science*, **308**: 1480-1483.
47. Ho, N., Hunt, H.D., Horton, R.M., Pullen, J.K., Pease, L.R. 1989. Site-directed mutagenesis by overlap extension using the polymerase chain reaction. *Gene*. 15;77(1):51-9.
48. Hollyday, R. 1990. The history of the DNA heteroduplex. *Bioessays*. **12**:133-42.
49. Hong, X., Hopfinger, A. 2004. Construction Molecular Modeling, and Simulation of *Mycobacterium tuberculosis* Cell Walls. *Biomacromolecules*, **5**: 1052-1065.
50. Horii, Z. y Clarck A. J. 1973. Genetic analysis of the *recF* pathway to genetic recombination in *Escherichia coli* K12: isolation and characterization of mutants. *J Mol Biol.* 80:327-344.

51. Hooper, D. 1999. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resist Updat.* 2(1):38-55.
52. Horton, R.M., Hunt, H.D., Ho, S.N., Pullen, J.K., Pease, L.R. 1989. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene.* 15; 77(1):61-8.
53. Jack, D., Yang, N., Milton, H. 2001. The drug/metabolite transporter superfamily. *Eur. J. Biochem.* **268**: 3620-3639.
54. Jacoby, G., Chow, N., Waites, K. 2003. Prevalence of Plasmid-Mediated Quinolone Resistance. *Antimicrob Agents Ch.* **47**:559-562.
55. Jehl, F., Chomarat, M., Weber, M., Gerard, A. 2004. Del antibiograma ala Prescirpción Editions Biomerieux.
56. Jones, M.L. y Barnard, R.T. 2005 Chimerization of multiple antibody classes using splice overlap extension PCR. *BioTechniques.* **38** (2): 181-182
57. Kalpana, G.V., Bloom, B.R., Jacobs, W. Jr. 1991 Insertional mutagenesis and illegitimate recombination in mycobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **88**:5433-5437.
58. King, D., Malone S., Lilley S. 2000. New classification and Update on the Quinolone Antibiotics. *American Family Physician.* 61(9).
59. Komatsu, M., Takano, H., Hiratsuka, T., Ishigaki, Y., Shimada, K., Beppu, T., Ueda, K. 2006 Proteins encoded by the conservon of *Streptomyces coelicolor* A3(2) comprise a membrane-associated heterocomplex that resembles eukaryotic G protein-coupled regulatory system. *Mol. Microbiol.* **62**(6), 1534–1546

60. Kowalczykowski, S., Dixon, D., Eggleston, A., Lauder, S., Rehrauer, W. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **58**(3): 401-465
61. Kowalczykowski, S. C. 2000. Initiation of genetic recombination and recombination-dependent replication. *Trends Biochem Sci.* **25**:156-165.
62. Kuzminov, A. 1995. Collapse and repair of replication forks in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* **16**:373-384.
63. Levine C, Hiasa H, Marians KJ. 1998. DNA gyrase and topoisomerase IV: biochemical activities, physiological roles during chromosome replication, and drug sensitivities. *Biochimica et Biophysica Acta* . **1400**: 29-43.
64. Li, Z., Karakousis, G., Chiu S., Reddy, G., Radding C. M. 1998. The Beta protein of phage lambda promotes strand exchange. *J Mol Biol.* (276):733-744.
65. Li X., Costantino, N., Lu, L., Liu, D., Watt, R.M., Watt, K., Cheah, D., Court D., Huang, J. 2003. Identification of factors influencing strand bias in oligonucleotide-mediated recombination in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids. Res.* **31**:6674-6687.
66. Li, X.Z., Zhang, L., Nikaido, H. 2004. Efflux Pump-Mediated Intrinsic Drug Resistance in *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**(7): 2415-2423.
67. Littlejohn T.G., Paulsen, T.I., Gillespie, M., Tennen, J.M., Midgley, M., Jones, I.G., Purewal, A., Skurra, R. 1992. Substrate specificity and energetics of

- antiseptic and disinfectant resistance in *Staphylococcus aureus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **95**:259-265.
68. Martínez-Jiménez, M. I., Alonso J. C. y Ayora S. 2005. *Bacillus subtilis* bacteriophage SPP1-encoded gene 34.1 product is a recombination-dependent DNA replication protein. *J Mol Biol.* 351:1007-1019.
69. Martínez M., Pascual A., Jacoby G. 1998. Quinolone resistance from a transferable plasmid. *Lancet.* **351**(9105):797-9.
70. Matsuura, S., Komatsu, J., Hirano, K., Yasuda, H., Takashima, K., Katsura, S., Mizuno, A. 2001. Real-time observation of a single DNA digestion by lambda exonuclease under a fluorescence microscope field. *Nucleic. Acids. Res.* **29**:E79.
71. Mérens, A., Matrat, S., Aubry, A., Lascols, C., Jarlier V., Soussy, C., Cavallo J. y colaboradores. 2009. The Pentapeptide Repeat Proteins MfpA_{MT} and QnrB4 Exhibit opposite Effects on DNA Gyrase Catalytic Reactions and the Ternary Gyrase- DNA- Quinolone Complex. *J Bacteriol*, **191**(5):1587-1594.
72. Mitchell BA, Paulsen IT, Brown MH, Skurray RA. 1999. Bioenergetics of the staphylococcal multidrug export protein QacA. Identification of distinct binding sites for monovalent and divalent cations. *J Biol Chem.* 1999 Feb 5; 274(6):3541-8.
73. Montero, C., Mateu, G., Rodriguez, R., Takiff, H. 2001. Intrinsic resistance of *Mycobacterium smagmatis* to fluoroquinolones may be influenced by new pentapeptide protein MfpA. *Antimicrob. Agents Ch.* **45**:3387-3392.

74. Muniyappa, K. y Radding, C.M. The homologous recombination system of phage lambda. Pairing activities of Beta protein. *J. Biol. Chem.* **261**:7472-7478.
75. Murphy, K.C. 1991. Lambda Gam protein inhibits the helicase and chi-stimulated recombination activities of *Escherichia coli* RecBCD enzyme. *J. Bacteriol.* **173**:5808-5821.
76. Murphy, K.C. 2007. The lambda Gam Protein Inhibits RecBCD Binding to dsDNA Ends. *J. Mol. Biol.* **371**:19-24.
77. Muyrers, J. P., Y. Zhang, F. Buchholz & A. F. Stewart. 2000. RecE/RecT and Redalpha/Redbeta initiate double-stranded break repair by specifically interacting with their respective partners. *Genes Dev.* 14:1971-1982.
78. Nishinaka, T., Doi, Y., Hara, R. y Yashima, E. 2007. Elastic Behavior of RecA-DNA Helical Filaments. *J Mol Biol.* **370**:837-845.
79. Nordmann, P. and Poirel, L. 2005. Emergence of plasmid-mediated resistance to quinolones in Enterobacteriaceae. *J. Antimicrob Chemother.* 56: 463-469.
80. Nuermberger, E.L. 2004. Moxifloxacin-containing regimens of reduced duration produce a stable cure in murine tuberculosis. *Am J Respir Crit Care Med* 15; **170(10)**:1131-4.
81. Oppenheim, A., Rattray, A., Bubunenko, M., Thomason, L., Court. D 2004. *In vivo* recombineering of bacteriophage lambda by PCR fragments and single-strand oligonucleotides. *Virology.* **319**:185-189.
82. Perkins T.T., Dalal, R., Mitsis, P., Block, S. 2003. Sequence-dependent pausing of single lambda exonuclease molecules. *Science.* **301**:1914-8.

83. Piddock, L. 2006. Multidrug-resistance efflux pumps not just for resistance. *Nature Reviews Microbiology*. **4**:629-636.
84. Poelarends, G. y Konings, W. 2002. The Transmembrane Domains of the ABC Multidrug Transporter LmrA Form a Cytoplasmic Exposed, Aqueous Chamber within the Membrane. *J. Biol. Chem.* **277**(45): 42891-42898.
85. Rafferty, J. B., Sedelnikova, S. E., Hargreaves, D., Artymiuk, P. J., Baker, P. J., Sharples, G. J., Mahdi A. y colaboradores. 1996. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for its binding to the Holliday junction. *Science*. 274:415-421.
86. Ramaswamy, S., Musser, J. 1998. Molecular genetic basis of antimicrobial agent resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tubercle Lung. Dis.* 79(1): 3-29.
87. Reece R. y Maxwell A. (1991). DNA gyrase: structure and function. *Rev Biochem Mol Biol* **26**(3-4):335-75.
88. Saier, M.H., Beatty, J.T., Goffeau, A., Harley, K.T., Heijne, W.H., Huang, S.C., Jack, D.L., Jähn, P.S., y colaboradores. 1999. The major facilitator superfamily. *J Mol Microbiol Biotechnol.* **1**(2):257-79.
89. Sambrook, J., Russell, D. W. 2001. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Third edition. USA.
90. Sander, P., De Rossi, E., Boddington, B., Cantoni, R., Branzoni, M., Böttger, EC, Takiff, H. y colaboradores. 2000. Contribution of the multidrug efflux pump LfrA to innate mycobacterial drug resistance. *FEMS Microbiol Lett* 193:19–23.
91. Sawitzke, J. A., Thomason, L., Costantino, N., Bubunenko, M., Datta, S., Court, D. 2007. Recombineering: in vivo genetic engineering in *E. coli*, *S. enterica*, and

- beyond. *Methods Enzymol.* **421**:171-199. Schmitt L y Tampé, R. 2002 Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **12**(6): 754-760.
92. Schmitt, L., Tampé, R. 2002. Structure and mechanism of ABC transporters. *Curr Opin Struct Biol.* **12**(6):754-60.
93. Shen, P., y Huang, H. 1986. Homologous recombination in *escherichia coli*: dependence on substrate length and homology. *Genetics.* **112**: 441-457.
94. Smith D., Leander, G., Seiler, P., Baumann, S., Hess, J., Brinkmann, V., Nasser A., P. Mann P. y colaboradores 2003. The enzymatic basis of processivity in λ exonuclease. *Nucleic. Acids. Res.* **31**(6): 1585-1596.
95. Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. *Clin Microbiol Rev.* **16**(3):463-96.
96. Sumano, L., Ocampo, C., Brumbaugh, G., Lizarraga RE. 1998 Effectiveness of two fluoroquinolones for the treatment of chronic respiratory disease outbreak in broilers. *Br Poult Sci.* **39**(1).
97. Szostak, J. W., Orr-Weaver, T. L., Rothstein, R. J. y Stah, I F. W. 1983. The double-strand-break repair model for recombination. *Cell.* **33**:25-35.
98. Takiff, H., Salazar, L., Guerrero, C., Philipp, W., Huang, W., Kreiswirth, B., Cole, S. y colaboradores. (1994). Cloning and Nucleotide Sequence of *Mycobacterium tuberculosis gyrA* and *gyrB* Genes and Detection of Quinolone resistance Mutations. *Antimicrob. Agents Chemoter.* **38**, 773-780.
99. Taléns- Visconti R., Garrigues, T., Cantón, E. 2002. Mecanismos de resistencia bacteriana a las quinolonas. *Rev. Esp. Quim.* **15**(1): 53-58.

100. Tran J., Jacoby G., and Hooper D. 2005 Interaction of the Plasmid-Encoded Quinolone Resistance Protein Qnr with *Escherichia coli* DNA Gyrase. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **49**(1): 118-125.
101. Tufariello, M.J., Chan, J., Flynn, J. 2003 Latent tuberculosis: mechanisms of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet. Infect. Dis.* **3**:578-590.
102. Urban, P., Mignotte C., Kazmaier, M., Delorme, F., Pompon, D. 1997. Cloning, Yeast Expression, and Characterization of the Coupling of Two Distantly Related *Arabidopsis thaliana* NADPH-Cytochrome P450 Reductases with P450 CYP73A5. *J. Biol. Chem.*, **272**(31): 19176 –19186.
103. Van Crevel, R., Ottenhoff, T.H., Van der Meer, J.W. 2002. Innate immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin. Microbiol. Rev.* **15**: 294-309.
104. Van Kessel J. y Hatfull G.(2007). Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature* **4**(2):147-152.
105. Van Kessel, J.C. y Hatfull, G.F. 2008. Efficient point mutagenesis in mycobacteria using single-stranded DNA recombineering: characterization of antimycobacterial drug targets. *Mol. Microbiol.* **67**(5): 1094-1107.
106. Van Oijen, A., Blainey, P., Crampton, D., Richardson, C., Ellenberger, T., Xie., X. 2003. Single-molecule kinetics of lambda exonuclease reveal base dependence and dynamic disorder. *Science.* **301**:1235-8
107. Vetting M., Hegde S., Fajardo J., Fiser A., Roderick S., Takiff H., Blanchard J 2006. Pentapeptide repeat proteins. *Biochemistry* **45**(1):1-10.

108. Watt, V., Ingles, C., Urdea, M., Rutter, W. 1985. Homology requirements for recombination in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **82**:4768-4772.
109. Wayne LG. (1994). Dormancy *Mycobacterium tuberculosis* and latency of disease. *Eur Clin Microbiol Infect Dis.* **13**:908-14.
110. Wigfield, S.M., Rigg, G.P., Kavari, M., Webb, A.K., Matthews, R.C., Burnie, J.P. 2002. Identification of an immunodominant drug efflux pump in *Burkholderia cepacia*. *J Antimicrob Chemother.* **49**(4):619-624.
111. Wolfson JS, Hooper DC. 1989. Bacterial resistance to quinolones: mechanisms and clinical importance. *Rev Infect Dis.* **11**(5): S960-S968.
112. Yerushalmi, H., Lebendiker, M., Schuldiner, S. 1995. EmrE, an *Escherichia coli* 12-kDa multidrug transporter, exchanges toxic cations and H⁺ and is soluble in organic solvents. *J Biol Chem.* **270**(12):6856-63.
113. Zahradka, K., Simic, S., Buljubasic, M., Petranovic, M., Dermic, D. y Zahradka, D. 2006. *sbcB15* and *DeltasbcB* mutations activate two types of recF recombination pathways in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **188**:7562-7.
114. Zhang, Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu Rev. Pharmacol Toxicol.* **45**: 529 - 64.
115. Zechiedrich E., Khodursky A., Bachellier S., Schneider R., Chen D., Lilley D. , Cozzarelli N.(2000). Roles of topoisomerases in maintaining steady-state DNA supercoiling in *Escherichia coli*. *JBiol Chem* **275**(11):8103-13.

116. Zignol, M., Hosseini, M.S., Wright, A., Weezenbeek, C.L., Nunn, P., Watt, C.J., Williams, B.G., Dye, C. 2006. Global incidence of multidrug-resistant tuberculosis. *J. Infect. Dis.* **194**(4):479-485.

Consultas en línea:

1. <http://www.aecom.yu.edu/tbresearch/Resources/Vectors/pYUB854/854.jpg>, (Consulta, 20 de Febrero 2009).
2. <http://mcb.berkeley.edu/labs/berger/structures.html>, (Consulta, 29 de Abril, 2009).
3. http://es.wikipedia.org/wiki/Archivo:Mycobacterial_cell_wall_diagram.png, (Consulta, 30 agosto, 2009).

Amartin@ivic.gob