



UNIVERSIDAD PERUANA
CAYETANO HEREDIA

ESTUDIO DEL EFECTO DE
MUTACIONES EN LA
METALOCHAPERONA Rv2059 SOBRE
LA CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE LA
PIRAZINAMIDASA DE *Mycobacterium
tuberculosis*

TESIS PARA OPTAR EL GRADO DE
MAESTRO EN MICROBIOLOGÍA

MARIA DE GRECIA CAUTI MENDOZA

LIMA-PERÚ

2024

ASESOR (a)

PhD. Patricia Sheen Cortavarría

CO-ASESOR

PhD. Mirko Zimic Peralta

JURADO DE TESIS

DR. HOLGER MAITA MALPARTIDA

PRESIDENTE

DR. ARCADIO IVÁN LOZADA REQUENA

VOCAL

DRA. RUTH CRISTÓBAL DELGADO

SECRETARIO (A)

DEDICATORIA

Dedico este logro a los pilares fundamentales de mi vida, mi familia, cuyo amor y apoyo han sido inquebrantables. A mis queridos padres, Mario Cauti Rojas y

Mirian Mendoza Huachaca, les agradezco por ser mi fuente constante de inspiración y por alentarme a alcanzar mis metas con su inquebrantable respaldo.

A mis hermanos, Mayra y Arquímedes, cuya presencia y estímulo han iluminado mi camino en cada paso.

A mi abuelita María, un faro de amor y sabiduría en mi vida.

Este proyecto ha representado un desafío no solo ha sido académico, sino también una oportunidad de crecimiento personal y superación para mí. Qué este

logro sea un testimonio de lo que se puede lograr con esfuerzo, dedicación y el amor de aquellos que nos rodean. ¡A todos, gracias por ser parte esencial de este

capítulo tan significativo en mi vida!

AGRADECIMIENTOS

Es un honor dirigirme a ustedes con profunda gratitud por su destacada contribución al desarrollo de mi tesis. Quisiera expresar mi reconocimiento especial a la Dra. Paty Sheen, mi asesora, cuya mentoría excepcional, constante seguimiento, y la precisa presión ejercida y retroalimentación continua fueron esenciales para el avance significativo de este proyecto. De manera similar, extendiendo mi agradecimiento al Dr. Mirko Zimic, cuyas ideas visionarias han dejado una impronta inspiradora en cada etapa de este trabajo.

Un agradecimiento especial a mis mejores amigas por su soporte emocional durante más de 13 años Elayza, Mirtha, Keyssi, Mirtha y nuestro pequeño Mateito.

Asimismo, deseo expresar mi agradecimiento a mis colegas y amigos del laboratorio, Kiara, David, Ronny, Alonso, Renzo, Fresie, Maria del Carmen, Candy, Angela, Stef, Gabriel, Gustavo y Lewis cuya colaboración y compañía hicieron que los días y noches de trabajo fueran más llevaderas.

Mi reconocimiento se extiende también al personal del BSL3, al Sr. Jorge coronel, por su dedicación, capacitación y apoyo constante, así como a Nataly Bailón por compartir su experiencia en el análisis de resultados de TEMA y MODS.

Finalmente, pero no menos importante agradecer a la fuente de mi financiamiento que sin ellos nada hubiera sido posible Beca Milla Goñi 2021, Marco Milla y Maria

Goñi, y el fondo internacional International Centre for Genetic Engineering and

Biotechnology (ICGEB) Grant 2020.

FUENTES DE FINANCIAMIENTO

El financiamiento para llevar a cabo este proyecto fue posible gracias a la contribución de los fundadores de la Beca Milla Goñi 2021, Marco Milla y Maria Goñi, así como al respaldo del International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology (ICGEB) Grant 2020.

ESTUDIO DEL EFECTO DE MUTACIONES EN LA METALOCHAPERONA Rv2059 SOBRE LA CAPACIDAD ENZIMÁTICA DE LA PIRAZINAMIDASA DE Mycobacterium tuberculosis

INFORME DE ORIGINALIDAD

11 %	11 %	1 %	3 %
INDICE DE SIMILITUD	FUENTES DE INTERNET	PUBLICACIONES	TRABAJOS DEL ESTUDIANTE

FUENTES PRIMARIAS

1	repositorio.upch.edu.pe Fuente de Internet	6 %
2	Submitted to Universidad Peruana Cayetano Heredia Trabajo del estudiante	2 %
3	hdl.handle.net Fuente de Internet	1 %
4	repositorio.uni.edu.pe Fuente de Internet	<1 %
5	Submitted to uncedu Trabajo del estudiante	<1 %
6	eprints.uanl.mx Fuente de Internet	<1 %
7	bvs.sld.cu Fuente de Internet	<1 %

patents.google.com

TABLA DE CONTENIDOS

RESUMEN

ABSTRACT

I	INTRODUCCIÓN	1
II	ANTECEDENTES	3
III	MARCO TEÓRICO.....	9
IV	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	19
V	JUSTIFICACIÓN	20
VI	OBJETIVOS	21
VII	METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN	22
7.1	Tipo de estudio	23
7.2	Diseño de estudio	23
7.2.1	Análisis bioinformático	23
7.2.2	Estudio con la proteína Rv2059 recombinante nativa y mutantes.	24
7.2.3	Estudio en el modelo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	24
7.3	Área de estudio	26
7.4	Material biológico	26
7.4.1	Ensayo con la proteína recombinante.....	26
7.4.2	Ensayo utilizando el modelo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	27
7.5	Procedimiento experimental	30
7.5.1	Selección de mutaciones en el gen que codifica para la metalochaperona Rv2059 y ensayo de interacción entre Rv2059 y la enzima PZAsa de <i>M. tuberculosis</i>	30
7.5.2	Estudio con la proteína recombinante	36
7.5.2.1	Producción de la PZAsa recombinante y PZAsa quelada.	36
7.5.2.2	Producción de la proteína recombinante Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile. 39	
7.5.2.3	Ensayo de reactivación de la PZAsa-quelada (Apo) empobrecida en metales con Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile.	43
7.5.3	Estudio en el modelo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	45
7.5.3.1	Eliminación del gen Rv2059 en <i>M. tuberculosis</i> mediante ORBIT en <i>M. tuberculosis</i>	45
7.5.3.2	Restauración del gen Rv2059 en la cepa <i>M. tuberculosis</i> H37RV a través del plásmido integrativo pMV306hsp: Rv2059 Wt/ Glu341Gly y Val166Ile 54	
7.5.3.4	Determinación del eflujo de POA	58
7.5.3.5	Determinación de la susceptibilidad a PZA	59
7.5.4	ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	62

7.5.5	CONSIDERACIONES ÉTICAS.....	63
VIII	RESULTADOS.....	64
8.1	Selección de mutación en el gen Rv2059 usando un análisis bioinformático .	64
8.2	Ensayo con la proteína recombinante y Rv2059 nativa y mutantes y la enzima PZAsa	67
8.2.1	Estandarización de la expresión de la proteína recombinante Rv2059 nativa y mutantes.	67
8.2.2	Solubilización y replegamiento de la proteína recombinante Rv2059 nativa.	70
8.2.3	Cambio de buffer y concentración de la proteína Rv2059	71
8.2.4	Ensayo de reactivación de la proteína recombinante PZAsa en presencia de la metalochaperona Rv2059 Wt/Glu341Gly/ Val166Ile.....	72
8.3	Ensayo en la cepa H37Rv de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	75
8.3.1	Transformación del vector de recombinación pKM461.....	75
8.3.2	Electroporación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía..	76
8.3.3	Verificación del noqueo del gen Rv2059 en <i>M. tuberculosis</i> mediante la técnica de PCR y secuenciamiento.	78
8.3.4	Transformación de la cepa H37Rv Rv2059 KO con el plásmido integrativo PMV306hsp: Rv2059 Wt/Rv2059Glu341Gly /Val 166Ile	80
8.3.5	Medición del eflujo de ácido pirazinoico (POA) en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> Rv2059 KO complementada con el gen Rv2059 Wt, Glu341Gly y Rv2059Val166Ile.	83
8.3.6	Evaluación la Sensibilidad a las Drogas por el ensayo de microplacas de tetrazolio (TEMA)	86
IX.	DISCUSIÓN	87
X.	LIMITACIONES	97
XI.	CONCLUSIÓN.....	98
XII.	BIBLIOGRAFÍA.....	99
	ANEXOS	

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Mutaciones identificadas en el gen Rv2059 a partir del análisis de 3400 genomas secuenciados.	8
Tabla 2. Material biológico empleado para el estudio de proteína recombinante y en el modelo de <i>M. tuberculosis</i>	29
Tabla 3. Primers empleados para la verificación del noqueo del gen Rv2059.	51
Tabla 4. Resumen de mutaciones registradas en la metalochaperona Rv2059.	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de acción de pirazinamida.....	11
Figura 2. Plásmido integrativo pMV306hsp en un proceso de recombinación sitio específico en el ADNg de <i>M. tuberculosis</i>	17
Figura 3. Flujograma de trabajo experimental	25
Figura 4. Representación gráfica de los plásmidos pET24a(+) con el gen Rv2059 Wt/ Glu341Gly/Val166Ile.	27
Figura 5. Representación gráfica de los plásmidos pET24a (+) con el gen Rv2059 Wt/ Glu341Gly/Val166Ile.	28
Figura 6. Curva estándar POA en Buffer HEPES vs Absorbancia (450 nm).	38
Figura 7. Diseño del oligonucleótido ORBIT para el gen Rv2059 utilizando como molde el genoma de H37Rv.....	46
Figura 8. H37Rv Constructo ORBIT Rv2059.	51
Figura 9. Diseño del constructo “H37Rv: Constructo ORBIT Rv2059”.	52
Figura 10. Alineamiento del constructo nativo y ORBIT Rv2059 en Clustal W.....	53
57	
Figura 11. Esquema de trabajo para la evaluación de producción de POA de la cepa micobacteriana en una placa de MODS (24 pocillos).....	57
Figura 12. Curva estándar de POA en sobrenadante de cultivo de H37Rv vs Absorbancia a 450nm.....	59
Figura 13. Esquema para determinar la susceptibilidad micobacteriana.	61
Figura 14. Dinámica molecular de la estructura más favorable entre Rv2059 y la enzima PZAsa.....	65
Figura 15. Expresión de la proteína Rv2059 en <i>E. coli</i> (DE3) pLysS a condiciones estándares.....	68
Figura 16. Resumen de estandarización de la expresión de Rv2059 nativa.	69
Figura 17. Expresión estandarizada de la proteína recombinante Rv2059 nativa.	70
Figura 18. Electroforesis de la estandarización de la solubilización de la proteína Rv2059 nativa.....	71
Figura 19. Concentración de la proteína recombinante Rv2059	72
Figura 20. Reactivación de la proteína PZAsa-Apo en presencia de Rv2059	74
Wt, Glu341Gly y Val166Ile.....	74
Figura 21: Transformación de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv con el plásmido pKM461.....	75
Figura 22. Controles del proceso de transformación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía Rv2059 en <i>M. tuberculosis</i>	76
Figura 23: Transformación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía Rv2059.....	77
Figura 24. Corrida de electroforesis al 0.8% de los productos de PCR para verificar el	

noqueo del gen <i>Rv2059</i> en el genoma de <i>M. tuberculosis</i>	79
Figura 25. Verificación de la presencia del constructo ORBIT <i>Rv2059</i> en la cepa H37Rv <i>Rv2059</i> KO.	80
Figura 26. Proceso de eliminación o curación del plásmido pKM461 (Kan) en la cepa H37Rv <i>Rv2059</i> KO.....	81
Figura 27. Verificación de la integración del plásmido pMV306: <i>Rv2059</i> nativa, Glu341Gly y Val 166Ile mediante PCR.	82
Figura 28. Verificación de la integración del plásmido pMV306: <i>Rv2059</i> nativa o Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile en el genoma de <i>M. tuberculosis</i>	83
Figura 29. Eflujo de POA por la cepa H37Rv <i>Rv2059</i> KO y sus variantes.....	84
Figura 30. Eflujo de POA por la cepa H37Rv <i>Rv2059</i> KO y sus variantes complementadas.....	85
Figura 31. Evaluación de la sensibilidad antibiótica mediante TEMA.....	86

LISTA DE ABREVIATURAS

TB: Tuberculosis

M. tuberculosis: *Mycobacterium tuberculosis*

PZA: Droga Pirazinamida

POA: Ácido pirazinoico, el cual es el compuesto activo de la droga PZA.

Rv2059: Metalochaperona hipotética Rv2059 nativa

Rv2059 Wt: Metalochaperona recombinante Rv2059 nativa

Rv2059 Glu341Gly: Metalochaperona recombinante Rv2059 que presenta el cambio de Glutamina por Glicina en la posición 341

Rv2059 Val166Ile: Metalochaperona recombinante Rv2059 que presenta el cambio de Valina por Glicina en la posición 166.

PZAsa: Enzima pirazinamidasa de *M. tuberculosis*

PZAsa-Apo: Enzima pirazinamidasa sometida a un proceso de quelación con EDTA.

PZAsa Tx: Enzima pirazinamidasa control del proceso de quelación. Esta no recibe EDTA, solo experimenta las condiciones de estar a temperatura ambiente como la PZAsa-Apo.

H37Rv Rv2059 KO: Cepa H37Rv a la que se le eliminado el gen Rv2059 mediante el sistema ORBIT

H37Rv Rv2059 KO/ PMV306:Rv2059Wt: Cepa H37Rv a la que se le eliminado el gen Rv2059 mediante el sistema ORBIT y posteriormente integrado el plásmido pMV306 que carga el gen Rv2059 en su versión nativa.

H37Rv Rv2059 KO/ PMV306:Rv2059 Glu341Gly: Cepa H37Rv a la que se le eliminado el gen Rv2059 mediante el sistema ORBIT y posteriormente integrado el plásmido pMV306 que carga el gen Rv2059 que presenta la mutación no sinónima glutamina por glicina en la posición 341.

H37Rv:Rv2059 KO/ PMV306:Rv2059 Val166Ile: Cepa H37Rv a la que se le eliminado el gen Rv2059 mediante el sistema ORBIT y posteriormente integrado el plásmido pMV306 que carga el gen Rv2059 que presenta la mutación no sinónima Val 166 por isoleucina en la posición 166.

Flujo de POA: Medición del eflujo de ácido pirazinoico por la cepa de *M. tuberculosis*. El cual es medido usando el sobrenadante del cultivo donde ha crecido.

TEMA: Tetrazolium microplate assay (TEMA) o ensayo de microplacas de tetrazolium. Constituye una técnica para determinar la susceptibilidad antibiotica.

CMI (MIC): Concentración mínima inhibitoria

RESUMEN

La pirazinamida (PZA) desempeña un papel esencial en el tratamiento de la tuberculosis. Aunque la resistencia a esta droga se ha vinculado principalmente a mutaciones en el gen *pncA*, hasta un 30% de casos de resistencia no presentan tales alteraciones genéticas. En este estudio analizó cómo mutaciones en la metalochaperona Rv2059 podrían alterar su capacidad para activar la enzima PZAsa y con ello una posible contribución a la resistencia a la droga PZA.

La metalochaperona Rv2059 tiene la capacidad de activar la metaloenzima pirazinamidasa (PZAsa), lo que sugiere un posible papel en el mecanismo de acción y resistencia a la PZA. Investigamos dos mutaciones en Rv2059 con el fin de encontrar algún efecto en su actividad de entrega de metales, una en el sitio de coordinación de metal (Glu341Gly) y otra en un lugar distante a éste (Val166Ile), utilizando ensayos con proteínas recombinantes y en la bacteria *M. tuberculosis*. Los resultados del primer ensayo ,usando proteínas recombinantes, confirmaron que la proteína recombinante Rv2059 Wt podía reactivar la proteína recombinante PZAsa desprovista de metales (PZAsa-Apo). Sin embargo, las proteínas mutantes Rv2059 Glu341Gly y Rv2059 Val166Ile no mostraron diferencias significativas en el proceso de reactivación en comparación con la proteína Rv2059 nativa ($p=0.22$ y $p=0.23$ respectivamente). Por otro lado, la eliminación de la metalochaperona en *M. tuberculosis* a través de un proceso de remoción pareció afectar la entrega de metales a la enzima PZAsa o perturbar el mecanismo de activación de la prodroga PZA, lo que resultó en resistencia, como se evidenció en los resultados de TEMA (MIC: 200 $\mu\text{g/ml}$) y en la notable reducción del flujo de POA en comparación con la cepa de referencia H37Rv ($p<0.001$). En cuanto a las mutantes, parecieron

modificar el flujo de POA (H37Rv:Rv2059Glu341Gly ($p=0.001$), H37Rv:Rv2059 Val166Ile ($p=0.002$)), pero la concentración inhibitoria mínima (MIC) no experimentó alteraciones en comparación con la cepa de referencia H37Rv (MIC: 50 $\mu\text{g/ml}$). En resumen, nuestros hallazgos indican que la metalochaperona Rv2059 podría desempeñar un papel importante en el mecanismo de activación de la PZA, y que las mutaciones estudiadas no afectan la actividad de la metalochaperona Rv2059 y con ello no están relacionadas con la resistencia a PZA. Este estudio contribuye al entendimiento de cómo las metalochaperonas pueden influir en los mecanismos de resistencia a las drogas y mutaciones en la mismas podrían estar viéndose compensadas por el mismo sistema para evitar la pérdida de la función de la proteína.

Palabras clave: Metalochaperona Rv2059, PZA, PZAsa, POA, mutantes.

ABSTRACT

Pyrazinamide (PZA) plays an essential role in the treatment of tuberculosis. Although resistance to this drug has been primarily linked to mutations in the *pncA* gene, up to 30% of resistance cases do not present such genetic alterations. This study analyzes how mutations in the metallochaperone Rv2059 could alter its capacity to activate the enzyme pyrazinamidase (PZAsa), thereby potentially contributing to PZA resistance.

The metallochaperone Rv2059 can activate the metalloenzyme pyrazinamidase (PZAsa), suggesting a possible role in the mechanism of action and resistance to PZA. We investigated two mutations in Rv2059 to determine their effect on its metal delivery activity: one in the metal coordination site (Glu341Gly) and another in a distal site (Val166Ile), using assays with recombinant proteins and in the bacterium *M. tuberculosis*.

The results of the initial assay confirmed that the wild-type (Wt) Rv2059 protein could reactivate the recombinant PZAsa protein deprived of metals (PZAsa-Apo). However, the Rv2059 Glu341Gly and Rv2059 Val166Ile mutants did not show significant differences in the reactivation process compared to the Rv2059 Wt protein ($p=0.22$ and $p=0.23$, respectively).

On the other hand, the removal of the metallochaperone in *M. tuberculosis* appeared to affect the metal delivery to the PZAsa enzyme or disrupt the activation mechanism of the prodrug PZA, resulting in resistance. This was evidenced by the TEMA results (MIC: 200 $\mu\text{g/ml}$) and the notable reduction in POA flow compared

to the reference strain H37Rv ($p < 0.001$).

Regarding the mutants, they seemed to modify the POA flow (H37Rv:Rv2059Glu341Gly, $p = 0.001$; H37Rv:Rv2059 Val166Ile, $p = 0.002$), but the minimum inhibitory concentration (MIC) did not change compared to the reference strain H37Rv (MIC: 50 $\mu\text{g/ml}$).

In summary, our findings indicate that the metallochaperone Rv2059 may play an important role in the activation mechanism of PZA. The studied mutations do not affect the activity of the Rv2059 metallochaperone and, therefore, are unrelated to PZA resistance. This study contributes to understanding how metallochaperones can influence drug resistance mechanisms and suggests that the system may compensate for mutations in these proteins to avoid the loss of protein function.

Keywords: Metallochaperone Rv2059, PZA, PZAsa, POA, mutants.

I INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad respiratoria transmitida por la inhalación de aerosoles con bacilos de *Mycobacterium tuberculosis*, que han sido expulsados por una persona enferma (1). Los pacientes con TB pueden llegar a desarrollar una enfermedad activa, lo cual incluye síntomas, o una infección latente. Para el tratamiento de la TB activa se utilizan una variedad de fármacos; sin embargo, la droga pirazinamida (PZA) ha demostrado alta efectividad contra los bacilos en la infección latente y ha sido posible la reducción del tiempo del tratamiento de 12 a 6 meses (2).

Sin embargo, en años recientes se ha observado un aumento en la cantidad de informes sobre resistencia a este fármaco, lo que suscita alarma a nivel global (2). El mecanismo de acción y resistencia a la PZA no han sido completamente dilucidadas. La PZA opera como un profármaco que se incorpora al citoplasma de las micobacterias mediante difusión pasiva, transformándose en ácido pirazinoico (POA) por la acción de la enzima bacteriana nicotinamidasa-pirazinamidasa. El POA, la entidad activa del fármaco, es posteriormente excretado de los bacilos a través de un sistema de eflujo (3). En el medio extracelular ácido, el POA se protona y reingresa al citoplasma microbiano. Esta reentrada conlleva la liberación de protones intracelulares, induciendo la acidificación del citoplasma y favoreciendo la acumulación intracelular del POA (1). Esto genera una alteración de la permeabilidad y el transporte de la membrana micobacteriana, lo que conduce a la muerte celular. Las fallas en la acción de la PZAsa, activador de la PZA, son claves para la generación de la resistencia (3). Además, se conoce que la metalochaperona Rv2059 de *M. tuberculosis* tiene la capacidad de activar a la PZasa in vitro, por lo

que podría ejercer un rol importante en el mecanismo de acción de la PZA (4). En ese sentido, la presente investigación tiene por objetivo conocer el efecto de las mutaciones en la metalochaperona Rv2059 sobre su capacidad para activar la enzima PZAsa de *M. tuberculosis in vivo* y estudiar el efecto de la remoción del gen Rv2059 en la resistencia a PZA.

El conocimiento del mecanismo de acción y resistencia a PZA permitiría contribuir al conocimiento del mecanismo de acción de esta droga y mayor detección de cepas resistentes; por consiguiente, los pacientes tendrían la posibilidad recibirían un tratamiento adecuado con mejores posibilidades de cura.

II ANTECEDENTES

La tuberculosis (TB) representa un desafío global significativo, impactando a aproximadamente 10 millones de individuos cada año. La TB se mantiene como una de las causas predominantes de fallecimiento debido a infecciones respiratorias a nivel mundial (1). La gravedad de esta enfermedad se intensifica debido a la coinfección con el VIH y el surgimiento de cepas del bacilo de *M. tuberculosis* que son resistentes a múltiples medicamentos (MDR) y, en casos aún más complicados, extremadamente resistentes (XDR) (2) (3). La resistencia a los fármacos plantea un desafío adicional en el manejo efectivo de la tuberculosis, subrayando la necesidad de estrategias de tratamiento más eficaces y la importancia de la prevención de la resistencia a los medicamentos

La pirazinamida es un medicamento esencial de primera línea para el tratamiento de la TB, y juntamente con las drogas isoniacida y rifampicina constituyen la clave del tratamiento moderno contra la tuberculosis (4). Su utilización permite reducir el tiempo de tratamiento a la mitad (de 9-12 a 6 meses) y hasta el momento es el único fármaco que tiene una acción eficiente en el estado latente de los bacilos tuberculosos (5). Sin embargo,, recientemente se ha observado una creciente prevalencia de resistencia a este medicamento, un fenómeno que genera alarma a nivel internacional (6). Aunque la PZA es crucial en el tratamiento, su mecanismo de acción y las vías de resistencia aún no se han esclarecido en su totalidad (6).

El mecanismo principal de resistencia a PZA es la pérdida de la actividad de la PZAsa y por lo tanto la imposibilidad de catalizar la conversión de PZA a POA.

La tasa de salida del ácido pirazinoico (POA) es la base de la prueba de Wayne, considerado hasta el momento como el mejor predictor de resistencia a PZA por su alta sensibilidad y especificidad (70,83% - 92,85% y 100% respectivamente) (7). La tasa de salida de POA se ha asociado con los siguientes factores: Actividad de la PZAsa, concentración de PZAsa intracelular y eficacia del sistema de bomba de salida (8). La PZAsa defectuosa se encuentra con frecuencia en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA (9-13). Un análisis de 10209 aislamientos de *M. tuberculosis*, se observó que mutaciones en la región promotora y en la secuencia codificante del gen *pncA* tenían la capacidad de predecir la resistencia a PZA con 91,3% de sensibilidad y 96,8% de especificidad. (14).

La PZAsa es una metaloenzima ubicua presente en procariotas y eucariotas, y se expresa constitutivamente en *M. tuberculosis*. La PZAsa presenta una cavidad catalítica con un sitio activo y un sitio de unión a metales (MCS) (15; 16; 17). El Zn^{2+} y el Fe^{2+} son los metales encontrados en distintas PZAsas en estudios de cristalización. La PZAsa de *Pyrococcus horikoshii* conjuga con Zn^{2+} (15); la PZAsa de *Acitenobacter baumani* cocrystalizada con nicotinamida contenía Zn^{2+} y Fe^{2+} en una proporción 1: 1 (16) y la PZAsa de *M. tuberculosis* se cristalizó con éxito con Fe^{2+} (17).

La PZAsa de *M. tuberculosis* se inactiva mediante la eliminación de iones divalentes y se reactiva agregándolos (18 ,19). La reactivación de la PZAsa de *M. tuberculosis* se logra agregando Fe^{2+} y Mn^{2+} (19). Sin embargo, Sheen et al. mostraron la reactivación de la enzima *in vitro* utilizando Co^{2+} , Mn^{2+} y Zn^{2+} , pero no con Fe^{2+} y mostró que el Zn^{2+} estaba presente en la PZAsa recombinante

expresada en *E. coli* (PZAse-EC) (19). Asimismo, un estudio demostró que Zn^{2+} mostraba una energía de unión más alta al MCS de PZAse frente a Fe^{2+} y Mn^{2+} (20) y una revisión de la base de datos de proteínas (Protein Data Bank) mostró que de las 332 proteínas reportadas con un sitio de coordinación metálico idéntico a la PZAse, el 57.8% se unen a Zn^{2+} y un porcentaje menor a Fe^{2+} y Mg^{2+} (21). Indicando que Zn^{2+} es el ion más probable con el que continuamente conjuga la PZAse.

Un estudio de reactivación de la PZAse con metales, en la que se usó la PZAse quelada (Apoenzima: Eliminación de metales unidos a la enzima), se mostró que la PZAse quelada requería hasta 300 veces más Zn^{2+} para su reactivación (20). Estos resultados muestran que la PZAse podría requerir un proceso asistido (ejm: Una metalochaperona) para obtener los iones. Esta propuesta se ve respaldada por la observación de que las concentraciones intracelulares de proteínas y metales en una célula típica existen en una proporción de 1:1 *in vivo* (22).

Las metalochaperonas son transportadores que facilitan la entrega de iones metálicos a metaloenzimas. La mayoría de estas son proteínas integrales, que funcionan atrapando metales del citosol, en un compartimiento, y transfiriéndose a una proteína aceptora (23). Se tiene poco registro de la función de metalochaperonas en *M. tuberculosis* y su asociación con la resistencia. Pero se cuenta con la descripción de metalochaperonas en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (24).

En *E. coli*, ZnuA es una proteína del periplasma clave del sistema de absorción de Zn^{+2} . ZnuABC en *E. coli* contribuye en el crecimiento y patogenicidad bacteriana (25; 26). ZnuABC funciona de la siguiente manera: ZnuA capta Zn^{+2} libre y lo transfiere a ZnuB, una proteína transmembrana que en colaboración con ZnuC transporta el ión al citoplasma (26). Recientemente se demostró que ZnuA, en una concentración de 200 μM , tiene la capacidad de reactivar hasta en un 135% la actividad enzimática de PZAsa, desprovista de metales, de *M. tuberculosis in vitro* (27). Lo que indica que ZnuA tiene la capacidad de entregar el ión Zn^{+2} a PZAsa y activarla con un alto porcentaje de éxito. Partiendo de ello, metalochaperonas similares podrían tener la misma actividad.

En una reciente revisión realizada por Masiag A, et al. sobre el genoma de *M. tuberculosis* se reportó una metalochaperona Zn^{+2} tipo ABC denominado Rv2059 (27; 28). Un estudio posterior, demostró que esta metalochaperona tiene capacidad de reactivar PZAsa empobrecida en metales hasta en un 69% con una concentración de 1 μM (4). Este mismo estudio evaluó una cepa de *M. tuberculosis* noqueada en el gen *Rv2059* y observó una ligera tendencia a reducir la tasa de salida de POA. Los autores señalan que no se realizaron suficientes repeticiones, no se hizo el secuenciamiento de la región noqueada y sugieren verificar nuevamente estos análisis considerando más controles en el ensayo. (4)

Mutaciones con sentido o missense en proteínas de carácter enzimático pueden causar una variación en la estructura conformacional e incluso la pérdida de la capacidad catalítica de la enzima. Las proteínas con función ADN metiltransferasas

o desmetilasas dependientes de zinc presentan una región rica en cisteína en el extremo N-terminal (ADD) de su secuencia. Esta región contiene dos sitios diferentes de dedos de zinc (PHD-like y GATA-like) necesarios para la unión al cofactor metálico zinc y la interacción con la proteína receptora. ADD ha demostrado ser un blanco para las mutaciones encontradas en el gen de metiltransferasa (50% de las mutaciones missen) (29). La mayoría de estas mutaciones afecta la integridad estructural del dominio ADD y los otros están cerca de los residuos de unión a metal, por lo que es probable que afecten la interacción con la proteína receptora que finaliza en la pérdida de la actividad catalítica (30,31). Por otro lado, la generación de mutaciones en regiones cerca al sitio de coordinación de metaloproteínas generan una variación en la conformación o coeficiente de relajabilidad de la estructura que causa la variación en su actividad, ya sea potenciándola o haciéndola ineficiente (30,31).

Con el objetivo de conocer las mutaciones en el gen Rv2059 que alteren la interacción de la proteína Rv2059 y la enzima PZAsa de *M. tuberculosis*. 21 mutaciones fueron identificadas a partir de la revisión de una base de datos de 3400 genomas secuenciados de aislados clínicos de *M. tuberculosis* (Tabla 1). Esta base de datos pertenece al Grupo de Tuberculosis del Perú.

Tabla 1. Mutaciones identificadas en el gen *Rv2059* a partir del análisis de 3400 genomas secuenciados.

Posición	RESUMEN DE MUTACIONES
2315733	Ala187Val (gcc/gTc)
2316098	Ala309Thr (gcg/Acg)
2316233	Ala354Ser (gct/Tct)
2315353	Arg60Arg (cgg/cgA)
2315851	Asn226Asn (aac/aaT)
2315748	Asp192Ala (gac/gCc)
2315703	Gln177Arg (cag/cGg)
2316195	Glu341Gly (gag/gGg)
2315210	Gly13Ser (ggc/Agc)
2315696	Gly175Ser (ggt/Agt)
2315386	His71Gln (cac/caA)
2315726	Leu185Phe (ctc/Ttc)
2315248	Leu25Leu (ctc/ctT)
2315403	Pro77Leu (cca/cTa)
2315722	Ser183Ser (tcg/tcT)
2316123	Thr317Lys (aca/aAa)
2316214	Thr347Thr (acc/acT)
2315669	Val166Ile (gtc/Atc)
2315736	Val188Ala (gtg/gCg)
2315943	Val257Ala (gtc/gCc)
2315437	Val88Val (gta/gtG)

La tabla presenta las mutaciones identificadas en diversas posiciones del gen *Rv2059*. Cada mutación ocurre de manera única y aislada en el gen, sin concurrencia de múltiples mutaciones simultáneas. Cada entrada detalla la posición específica, el cambio de aminoácido y las secuencias de nucleótidos correspondientes.

III MARCO TEÓRICO

Biología de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis es un bacilo que requiere oxígeno para vivir y se caracteriza por su lento crecimiento, ya que necesita de 14 a 21 días para desarrollarse hasta ser visible en cultivos. La composición de su pared celular es crucial para su capacidad de resistir y ser virulento, ya que actúa como una defensa contra los medicamentos y otras sustancias dañinas. (2)

De todas las especies pertenecientes al complejo de *Mycobacterium*, *M. tuberculosis* es la única que muestra susceptibilidad al medicamento PZA. Las otras especies del género presentan resistencia innata a este fármaco debido a una variedad de mecanismos, incluyendo mutaciones en los objetivos potenciales del POA, un sistema de expulsión deficiente, y mutaciones en el gen *pncA* específicamente. (32,33)

Pirazinamida (PZA)

La pirazinamida se destaca como un componente esencial en el régimen inicial para abordar la tuberculosis (9). Cuando se combina con isoniazida y rifampicina, esta estrategia terapéutica logra disminuir a la mitad el período necesario para el tratamiento, de entre nueve a doce meses a tan solo seis meses (3). Singularmente, este medicamento es el único conocido por afectar directamente a los bacilos tuberculosos en su estado inactivo (3).

El rango de administración de PZA se encuentra generalmente entre 30 a 40 mg/kg; sin embargo, dosis que exceden los 40 mg/kg pueden inducir toxicidad hepática (10). La fase crítica de aplicación de PZA se sitúa en los iniciales dos meses del tratamiento. Más allá de este lapso, su contribución es limitada, probablemente debido a la alteración del pH hacia una condición más alcalina en las áreas afectadas (10).

Mecanismo de acción de PZA

La Pirazinamida (PZA) es más efectiva en condiciones ácidas, beneficiándose del ambiente generado por la inflamación in vivo, así como en las condiciones específicas utilizadas para su estudio en laboratorio (3). Se ha notado que la eficacia de PZA aumenta cuando la actividad metabólica del *M. tuberculosis* disminuye (3). Los detalles sobre cómo actúa este medicamento se han explicado previamente en la sección de introducción y se ilustran en la Figura 1.

Por otro lado, el *M. tuberculosis* tiene un sistema de expulsión para el ácido pirazinoico (POA) menos eficaz en comparación con otras especies de micobacterias, como *M. smegmatis* o *M. bovis*. Esta característica facilita la acumulación de POA dentro de las células de *M. tuberculosis*, lo que lo hace susceptible a la acción de la PZA (33,34).

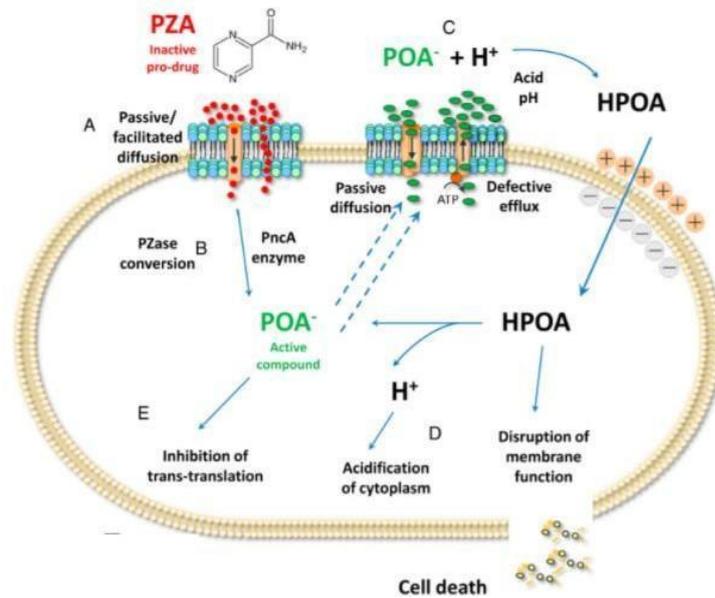


Figura 1. Mecanismo de acción de pirazinamida.

Fuente: Miotto et al. (29).

Pirazinamidaza (PZAsa)

La PZAsa es una metaloenzima tipo nicotinamidasa-pirazinamidasa ubicua presente en procariontas y eucariotas. Se expresa constitutivamente en *M. tuberculosis* y es importante en la vía de salvataje de la nicotina adenina dinucleótido (NAD) al catalizar la deaminación de nicotinamida en nicotinato, importante en distintas reacciones de intercambio de electrones, protones y producción de energía en células (3).

La (PZAsa) posee una cavidad catalítica distintiva, que incluye un sitio activo para la coordinación de metales (MCS), tales como el zinc (Zn⁺²) y el hierro (Fe⁺²) (15,16,17). Los aminoácidos relevantes en el sitio activo que interactúan con el sustrato son el ácido aspártico en la posición 8 (Asp8), la lisina en la posición 96

(Lys96) y la cisteína en la posición 138 (Cys138). Para el sitio de coordinación de metales, los residuos de histidina en las posiciones 51 (His51) y 71 (His71), junto con el ácido aspártico en la posición 49 (Asp49), son fundamentales (17). Estas áreas son cruciales para la función catalítica de la PZAsa, facilitando su capacidad para interactuar eficazmente con sustratos y metales específicos.

Mecanismo de resistencia a PZA

El mecanismo principal de resistencia a PZA es la pérdida de la actividad de la PZAsa y por lo tanto la imposibilidad de catalizar la conversión de PZA en POA. La PZAsa defectuosa se encuentra con frecuencia en cepas de *M. tuberculosis* resistentes a PZA (11), y varios estudios han demostrado una asociación entre la resistencia a PZA y mutaciones en el gen *pncA*, que codifica PZAsa (12-15).

Sin embargo, se ha reportado cepas resistentes a PZA que no presentan mutaciones en el gen *pncA* por lo cual se estudian otras vías, entre ellas fallas en la toma de PZA y mecanismos alternativos que comprometen la actividad catalítica de PZAsa como alteraciones proteínas transportadoras de metales conocidas como metalochaperonas o mutaciones en genes de bombas de eflujo que permiten la salida de POA (24).

Metalochaperona

Las metalochaperonas son transportadores proteicos que facilitan la entrega de iones metálicos a metaloenzimas. La mayoría de estas son proteínas integrales, que funcionan quelando metales del citosol, en un compartimiento, y transfiriéndose a una proteína aceptora (24). Se tiene poco registro de la función de metalochaperonas en *M. tuberculosis* y su asociación con la resistencia. Pero se cuenta con la descripción de algunas metalochaperona tipo ABC, ATPasa en bacterias Gram negativas como *Escherichia coli* (27).

ZnuA es una metalochaperona del periplasma clave del sistema de absorción de Zn^{+2} ZnuABC en *E. coli* y contribuye en el crecimiento y patogenicidad bacteriana (25) (26). ZnuA tiene la capacidad de reactivar la actividad enzimática de PZAsa, desprovista de metales, de *M. tuberculosis in vitro* (4). Lo que indica que ZnuA tiene la capacidad de entregar el ion Zn^{+2} a PZAsa y activarla con un alto porcentaje de éxito.

Metalochaperona Rv2059

Rv2059 es una proteína tipo metalochaperona presente en *M. tuberculosis* que no ha sido descrita por completo. Pero, se conoce que es un transportador de Zn^{2+} tipo ABC con la capacidad de facilitar la interacción del cofactor metálico Zn^{+2} (al unir el cofactor a los residuos metálicos de Rv2059 H75, H135 y E199) y la enzima PZAsa y reactivarla hasta en un 69% (4).

Asimismo, ha sido catalogada como un gen no esencial y análisis proteómicos mencionan que podría localizarse a nivel de la pared celular o membrana citoplasmática (35). Pero su ubicación real y estructura cristalina aún no han sido descritas.

Herramientas bioinformáticas

PyMol v.2.4.1: PyMol se destaca por su versatilidad en la bioinformática estructural. En primer lugar, permite la generación de mutantes de proteínas al modificar secuencias de aminoácidos específicas, lo que resulta crucial para prever el impacto de mutaciones en la estructura y función de las proteínas. Además, ofrece la capacidad de crear impresionantes representaciones en 3D de estructuras moleculares, incluyendo proteínas, ADN, ARN y otros componentes biológicos, lo que facilita la visualización y comprensión de su arquitectura tridimensional. Por último, PyMol posibilita la eliminación selectiva de partes de proteínas, lo que es útil para investigar cómo regiones específicas influyen en la estructura y función, permitiendo un análisis detallado de dominios, motivos o regiones críticas (36).

HADDOCK v.2.4: HADDOCK se destaca como una herramienta poderosa de acoplamiento molecular, siendo fundamental para la predicción de interacciones entre moléculas, como proteínas y ligandos. A través de análisis de fuerzas y energías en interacciones moleculares, HADDOCK permite la determinación de afinidad y estabilidad en uniones biomoleculares, revelando cómo las moléculas se unen para formar complejos esenciales en procesos biológicos. Además, esta herramienta puede predecir diversos modos de unión entre moléculas, lo que es crucial para comprender sus interacciones bajo distintas condiciones o conformaciones. Finalmente, HADDOCK se utiliza en la investigación de diseño de fármacos para identificar compuestos candidatos y comprender cómo interactúan con sus objetivos moleculares, ofreciendo una valiosa contribución al desarrollo de terapias farmacológicas (37).

Método de Wayne cuantitativo

El método de Wayne es una prueba colorimétrica utilizada para evaluar la sensibilidad de *M. tuberculosis* a PZA. Este método pone de manifiesto la presencia del ácido pirazinoico por la formación de una sal ferrosa de color naranja-rosado en 4 días. Las cepas de *M. tuberculosis* que son sensibles a la PZA poseen la pirazinamidasa que metaboliza la PZA con formación del ácido pirazinoico. Mientras, las cepas que resulten PZA-resistentes han perdido la actividad de esta enzima y no hay viraje de color en su reacción al agregar sulfato de amonio ferroso (38,11). El método de Wayne es considerado hasta el momento como el mejor predictor de resistencia a PZA por su alta sensibilidad y especificidad (70,83% - 92,85% y 100% respectivamente) (11).

La variante cuantitativa del ensayo de Wayne tiene como objetivo medir de manera cuantitativa la respuesta de las cepas de *M. tuberculosis* a la PZA. Esto implica la cuantificación del metabolismo de la PZA y la producción de ácido pirazinoico (POA) por parte de las cepas de *M. tuberculosis*. Esto se logra utilizando espectrofotometría visible, que mide la absorción de luz a diferentes longitudes de onda para determinar la concentración de POA producido. (39)

ORBIT

ORBIT (Recombinación mediada por oligonucleótido seguida del direccionamiento por una integrasa Bxb1) es una técnica de edición genómica que se vale de la reacción recombinante inducida por oligonucleótidos junto con la incorporación precisa mediada por la integrasa Bxb1, todo en un solo paso, con el objetivo de crear etiquetas genéticas cromosómicas, eliminaciones genéticas o sustituciones de promotores en *M. smegmatis* o *M. tuberculosis*. Esta metodología es pionera en la obtención de cepas recombinantes que se pueden seleccionar por resistencia a fármacos sin necesidad de plásmidos de doble cadena de ADN específicos ni sustratos de recombinación producidos mediante PCR. La única necesidad para la modificación genética es un oligonucleótido sintético específico para el gen objetivo (38). Este oligonucleótido de direccionamiento, de cadena simple, lleva un sitio *attP* del fago Bxb1 flanqueado por 45 a 70 bases de homología con el blanco cromosómico y se co-electropora con un plásmido que carga el gen o secuencia de interés y un sitio *attB* Bxb1(38). El huésped micobacteriano alberga un plásmido que codifica para la anelasa RecT de fago Che9c y la integrasa del fago Bxb1. La anelasa RecT facilita la unión del oligonucleótido con la hebra retardataria del ADN durante la replicación, estableciendo el sitio *attP* en una posición específica del cromosoma determinada por la secuencia del oligonucleótido. Paralelamente, durante la misma fase de crecimiento, la integrasa Bxb1 induce la recombinación en sitios concretos entre el plásmido portador con *attB* y el sitio *attP* proveniente del oligonucleótido. En este proceso, es la secuencia del oligonucleótido la que determina dónde se insertará la secuencia de interés que el plásmido transporta. Puede realizarse

variaciones de acuerdo con el objetivo del trabajo en el plásmido de carga (40).

Plásmidos integrativos

Los plásmidos tipo integrativos son herramientas fundamentales en la edición genética de bacterias, ya que permiten la introducción estable de material genético externo en el genoma bacteriano. En el caso de *M. tuberculosis*, el plásmido pMV306hsp es ampliamente utilizado debido a su capacidad para integrarse en el genoma de esta bacteria patógena de forma precisa y controlada. El proceso de integración implica la recombinación entre los sitios attP y attB del plásmido y el genoma de *M. tuberculosis* (41). El pMV306hsp se basa en un sistema de integración/conexión que utiliza la integrasa del micobacteriófago L5 (L5-att/int) y sus correspondientes sitios de unión de fagos (attP). Este enfoque proporciona una herramienta común para la ingeniería genómica de bacterias, permitiendo la integración específica de genes exógenos en su genoma y avanzar en la investigación en este campo (42)

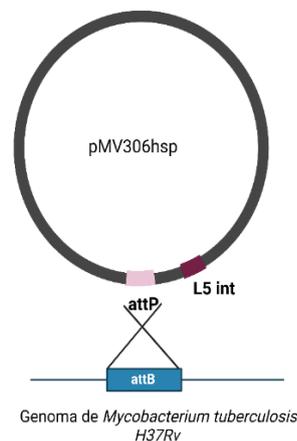


Figura 2. Plásmido integrativo pMV306hsp en un proceso de recombinación sitio específico en el ADNg de *M. tuberculosis*

El diagrama ilustra la integración del plásmido pMV306hsp en el sitio attB del genoma de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv a través de la recombinación mediada por el integrase L5 (L5 int) y el sitio attP del plásmido.

TEMA

El tetrazolium microplate assay (TEMA) es una técnica bioquímica que se utiliza para medir la viabilidad celular y evaluar la actividad metabólica en cultivos celulares o muestras biológicas. Se basa en la capacidad de las células vivas para reducir sales de tetrazolio a formazanos coloreados, proporcionando una medida indirecta de la actividad celular y la viabilidad (43). Sus utilidades incluyen la evaluación de la viabilidad celular, estudios de toxicidad, screening de fármacos, estudios de proliferación celular, investigación en enfermedades y control de calidad en cultivos celulares (44). En el TEMA, se agrega una solución de tetrazolio al cultivo celular o microorganismo después de la exposición a compuestos de interés, y las células vivas reducen el tetrazolio a formazanos, que se vuelven morados u otro color visible. El grado de morado indica la actividad metabólica y la viabilidad, y se utiliza en la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) al observar un cambio de color menor a medida que se varían las concentraciones de agentes antimicrobianos, identificando así la MIC (44)

IV PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La pirazinamida constituye una de las drogas clave en el tratamiento moderno contra la tuberculosis, debido a su capacidad de actuar en la fase latente de la enfermedad y reducir el tiempo de tratamiento a la mitad. Por lo que resulta de importancia la resistencia que ha generado *M. tuberculosis* hacia esta droga. Se conoce que fallas en la actividad enzimática de pirazinamidasa, activador de PZA, son claves para la generación de esta resistencia (36). Por lo que mutaciones en el gen que codifica a la enzima (*pncA*) ha logrado explicar en gran medida esta resistencia, sin embargo, no sería el único factor implicado en la alteración de la actividad enzimática dado que se han reportado cepas que son resistentes a PZA, pero no presentan mutaciones en el gen *pncA*. Frente a ese vacío de conocimiento se ha explorado el rol de una metalochaperona denominada Rv259, proteína que tiene la capacidad de activar a la metaloenzima PZAsa en un ensayo *in vitro*.

Hasta el momento no se conoce por completo el rol que tiene la metalochaperona Rv2059 en la activación de la enzima PZAsa y si mutaciones en ella pueden afectar su rol de entrega de metales a la enzima, lo cual podría afectar el metabolismo de la PZA. Por lo tanto, la presente investigación busca responder a la pregunta de si las mutaciones en la metalochaperona Rv2059 afectan su capacidad para activar la enzima PZAsa de *M. tuberculosis*. Para el desarrollo de este objetivo, se propone evaluar la actividad enzimática de la PZAsa, tomando como indicador la producción de POA, en presencia de la metalochaperona Rv2059 nativa y con mutaciones inducidas a partir de la identificación de estas en una base de datos de 3400 genomas secuenciados de individuos con tuberculosis. Así como en el modelo de *M. tuberculosis* que expresa la metalochaperona nativa y con las mutaciones.

V JUSTIFICACIÓN

Las alteraciones en la funcionalidad de la enzima PZAsa explican en gran medida la resistencia generada por *M. tuberculosis* a la droga PZA. La metalochaperona Rv2059 ha demostrado reactivar PZAsa en ensayos *in vitro*, por lo que conocer si las mutaciones identificadas en la metalochaperona Rv2059, a partir de una base de datos de secuenciamiento, afectan su capacidad para activar a la PZAsa, que a su vez podría reducir la actividad enzimática de PZAsa, ayudaría a comprender aún más si las mutaciones están implicadas en el mecanismo de resistencia que ha generado la micobacteria contra esta droga. Conocer la importancia de esta metalochaperona en *M. tuberculosis* permitiría comprender de manera integral el procesamiento de la droga PZA en la micobacteria y encontrar posibles blancos de diagnóstico para identificar resistencia a esta droga. Así como mutaciones en el gen que codifica la enzima PZAsa, *pncA*, logran explicar en gran medida la resistencia a PZA. También, mutaciones en esta metalochaperona podrían responder a aquellos casos de resistencia donde no se registran mutaciones en *pncA*. Igualmente, apoyaría al desarrollo de herramientas mejoradas para detectar la resistencia a la PZA, lo que tendría implicaciones significativas en el diagnóstico clínico. Reforzar el diagnóstico de resistencia involucra una correcta elección de regímenes de medicamentos para el paciente con tuberculosis, que conducen a mejores resultados en la reducción de cepas extremadamente resistentes, más complejas de tratar.

VI OBJETIVOS

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto de las mutaciones en la metalochaperona Rv2059 sobre su capacidad para reactivar la PZAsa recombinante y en la resistencia a PZA en *M. tuberculosis*

6.2 Objetivos específicos

- Seleccionar las mutaciones presentes en el gen Rv2059 que alteren la interacción de la proteína Rv2059 y la enzima PZAsa de *M. tuberculosis*.
- Evaluar la actividad enzimática de PZAsa-quelada en presencia de la metalochaperona Rv2059 nativa y mutante.
- Evaluar el eflujo de POA y resistencia a PZA en *M. tuberculosis* H37Rv en la cual ha sido removido el gen Rv2059 y complementado con Rv2059 nativa y mutante.

VII METODOLOGÍA DE LA INVESTIGACIÓN

En este estudio se evaluó la actividad catalítica de la enzima PZAsa utilizando proteínas recombinantes. Este método incluyó la presencia de la metalochaperona recombinante Rv2059 con mutaciones, así como la enzima PZAsa desprovista de metales (quelada). Simultáneamente, aplicamos este ensayo en un modelo de *M. tuberculosis*, que expresaba la misma metalochaperona con las mutaciones. En ambos enfoques, empleamos el método cuantitativo de Wayne, reconocido como la prueba estándar para evaluar la susceptibilidad a la PZA. De esta manera, abordamos la actividad enzimática de PZAsa en dos contextos: uno que involucraba proteínas recombinantes y otro que utilizaba la bacteria *M. tuberculosis*. Se recurre a este método porque permite visualizar la formación del producto de la actividad catalítica de la enzima PZAsa, ácido pirazinoico, que es la forma activa de la PZA contra la bacteria. Por lo que la cantidad de ácido pirazinoico o POA sirve como un indicador de la actividad enzimática de PZAsa.

Para realizar la modificación genética en la micobacteria y con ello lograr la expresión de la metalochaperona Rv2059 con las mutaciones seleccionadas de la base de datos se ha elegido utilizar un nuevo sistema de ingeniería genética que ha logrado acoplar la hibridación recombinogénica de un oligonucleótido y la inserción sitio específica de un plásmido integrativo en un solo paso, denominado ORBIT. Este método ha aprovechado trabajos anteriores como el realizado en el laboratorio de G. Hatfull con el sistema de integración fago Bcb1 y el sistema de recombinación Che9 RecET y otras técnicas muy utilizadas como el del plásmido integrativo para realizar modificación de genes. El esquema de trabajo se ve resumido en la Figura 3.

7.1 Tipo de estudio

Este estudio tiene un enfoque analítico- experimental.

7.2 Diseño de estudio

7.2.1 Análisis bioinformático

Dos mutaciones en el gen Rv2059 fueron seleccionadas mediante el análisis de las 21 mutaciones identificadas a partir de la base de datos de 3400 genomas de *M. tuberculosis* (Datos no publicados) (Tabla 1). La base de datos provenía de pacientes con tuberculosis generada por el Grupo de Tuberculosis del Perú, al cual el laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de LID- UPCH tenía acceso. Las dos mutaciones fueron seleccionadas por su probable potencial efecto en la interacción entre las proteínas Rv2059 y PZAsa. Para lograrlo, se tuvieron en cuenta los siguientes criterios de selección: El tipo de mutación, que eran mutaciones con sentido o missense; debían ubicarse en el sitio de coordinación de metal o cerca de él; su frecuencia de aparición en la base de datos; y, finalmente, el cambio de energía de interacción entre el modelo estructural de Rv2059 nativo y mutante (21 variaciones de Rv2059) frente a la estructura de PZAsa. Este último criterio se basó en un análisis in silico donde se modeló la proteína Rv2059 y la enzima PZAsa de *M. tuberculosis* en el programa HADDOK (45-47). Las mutaciones se insertaron en el modelo estructural de la proteína nativa Rv2059, generando así 21 modelos mutantes de Rv2059 en la plataforma PyMOL (46). Utilizando el mismo programa se simuló la interacción de la proteína PZAsa frente a las 21 variaciones de Rv2059 (Rv2059-mut). Esta interacción dio como resultado un valor de energía de interacción o energía de Gibbs (G) que se comparó con la energía generada por el modelo inicial (Rv2059 nativa PZAsa),

cuya diferencia resultó en un valor de doble delta de G. A un mayor valor de esta diferencia hubo un mayor efecto causado por la mutación, criterio que se tomó en cuenta en la selección de las dos mutantes.

7.2.2 Estudio con la proteína Rv2059 recombinante nativa y mutantes.

Para este estudio se produjeron las proteínas recombinantes Rv2059-nativa y Rv2059-*mut* (con las 2 mutaciones seleccionadas), la enzima PZAsa-nativa y PZAsa-quelada (agotamiento de metales post producción de la proteína recombinante). La capacidad de la metalochaperona Rv2059 nativa y -mut para reactivar la PZAsa-quelada se determinó mediante el método de Wayne cuantitativo que detecta la producción de POA que la enzima PZAsa activa produce como resultado de la catálisis de la droga PZA. El POA es revelado con sulfato de amonio ferroso que emite un color y posteriormente se medirán los valores de absorbancia (Abs) a 450 nm (48,49). La curva estándar de Abs vs. [POA] fue determinada para calcular la concentración de POA producido. Finalmente, se comparó las concentraciones de POA ([POA]) generada por PZAsa-quelada en presencia de Rv2059 nativo y Rv2059 mutante. El control positivo fue la PZAsa nativa y el control negativo fue la PZAsa-quelada.

7.2.3 Estudio en el modelo de *Mycobacterium tuberculosis*

La cepa de *M. tuberculosis* fue modificada a nivel cromosomal para permitir la expresión de la metalochaperona Rv2059 con las mutaciones seleccionadas. La modificación se realizó utilizando mutagénesis dirigida en base al sistema ORBIT de recombinación sitio específico. La producción de POA fue medida en las cepas modificadas (H37Rv-Rv2059-mut (ORBIT)) utilizando el ensayo de Wayne cuantitativo. El control positivo de la producción de POA fue la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv nativa.

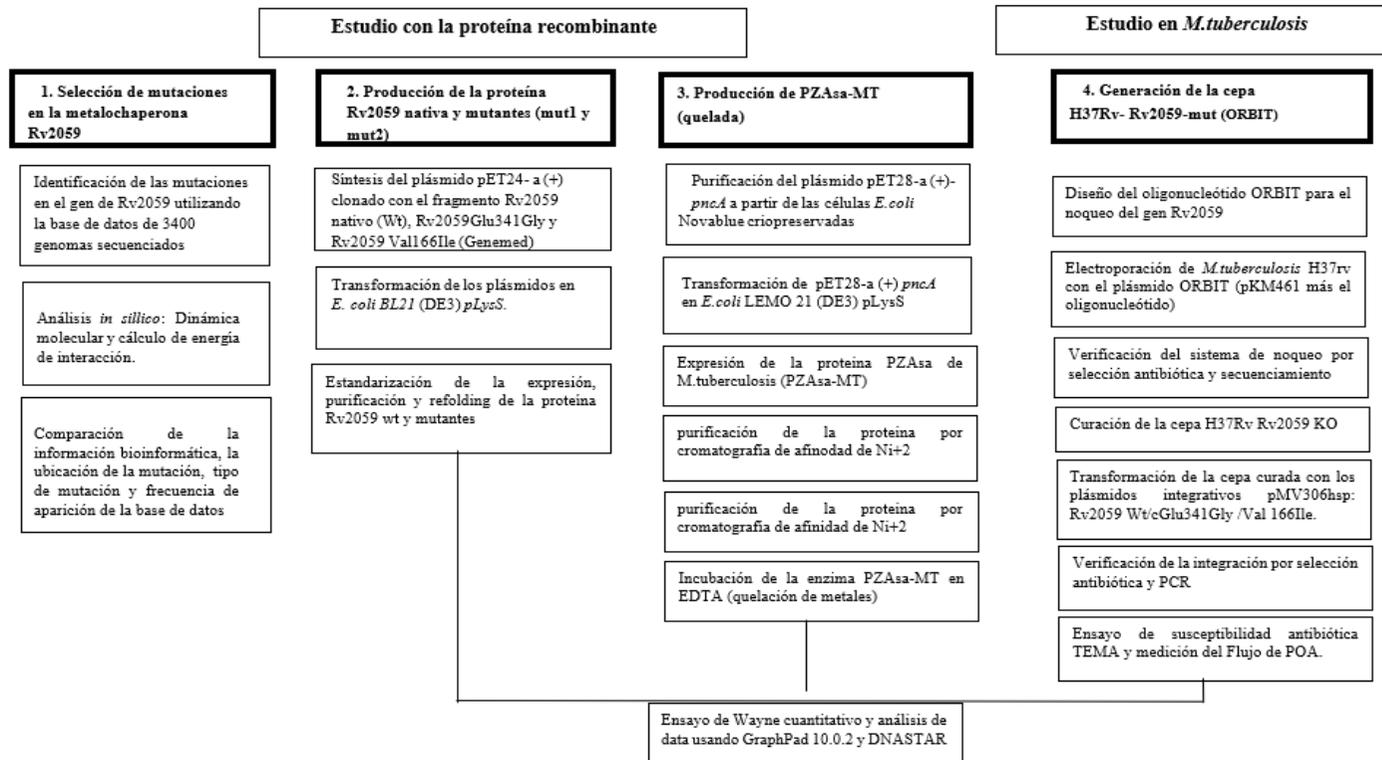


Figura 3. Flujograma de trabajo experimental

El diagrama muestra los pasos para evaluar el efecto de mutaciones en *Rv2059* en la actividad enzimática de PZAasa. Se seleccionan mutaciones en la metalochaperona *Rv2059*, se producen proteínas recombinantes (PZAasa, *Rv2059* nativa y versiones mutantes), y se generan cepas de *M. tuberculosis* H37Rv modificadas genéticamente para expresar *Rv2059* nativa y mutantes. En ambos casos, se mide la producción de ácido pirazinoico utilizando el ensayo cuantitativo de Wayne.

7.3 Área de estudio

El estudio se realizó en el Laboratorio de Bioinformática y Biología Molecular de los Laboratorios de Investigación y Desarrollo (BBM-LID) de la Facultad de Ciencias y Filosofía, y el Laboratorio de Tuberculosis con nivel de bioseguridad III de la Universidad Peruana Cayetano Heredia.

7.4 Material biológico

7.4.1 Ensayo con la proteína recombinante

La proteína Rv2059, en sus versiones Rv2059-Wt y las dos variantes con las mutaciones seleccionadas (Rv2059Glu341Gly y Rv2059Val166Ile), fueron producidas de manera recombinante. Las tres proteínas se generaron a partir de la síntesis de los plásmidos recombinantes por GeneMed Biotechnologies: pET24-a(+>::Rv2059 Wt, pET24-a(+>::Rv2059Glu341Gly, y pET24-a(+>::Rv2059Val166Ile (Figura 4). La proteína recombinante PZAsa, en sus variantes nativa, quelada y PZAsa-Tx (control de quelación), se produjo a partir del plásmido pET28-a (+)::*pncA*, propiedad del BBM-LID.

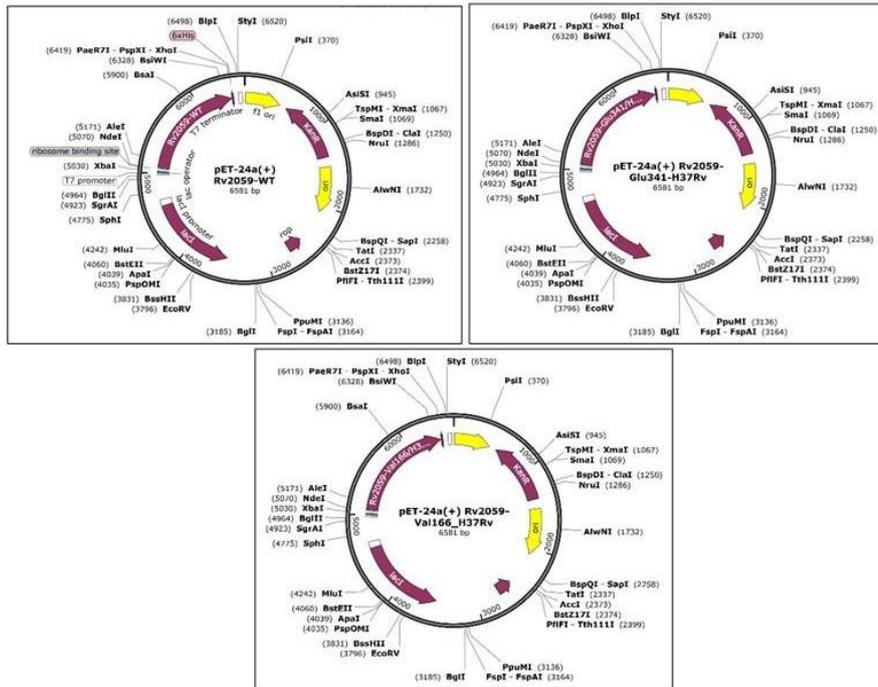


Figura 4. Representación gráfica de los plásmidos pET24a(+) con el gen Rv2059 Wt/ Glu341Gly/Val166Ile.

Fuente: SnapGene2023

7.4.2 Ensayo utilizando el modelo de *Mycobacterium tuberculosis*

Se empleó la cepa *M. tuberculosis* H37Rv, transformada inicialmente con el plásmido pKM461, que contiene el gen de una anelasa, la relaxasa RecT y la integrasa Bxb1 del profago Che9c. Posteriormente, la cepa fue sometida a una segunda transformación con un oligonucleótido sintético que posee un sitio attP central y regiones flanqueantes específicas que reconocen las secuencias flanqueantes del gen Rv2059 en el genoma de la micobacteria, además del plásmido de carga ORBIT (pKM464), que incluye un marcador de resistencia a higromicina para facilitar su selección. Para generar las cepas con las

mutaciones Rv2059Glu341Gly y Rv2059Val166Ile en el gen Rv2059, se utilizó el plásmido integrativo pMV306hsp, que porta el gen Rv2059 en sus tres variantes (Figura 5), diseñado por nuestro equipo y verificado y sintetizado por GeneMed Biotechnologies.

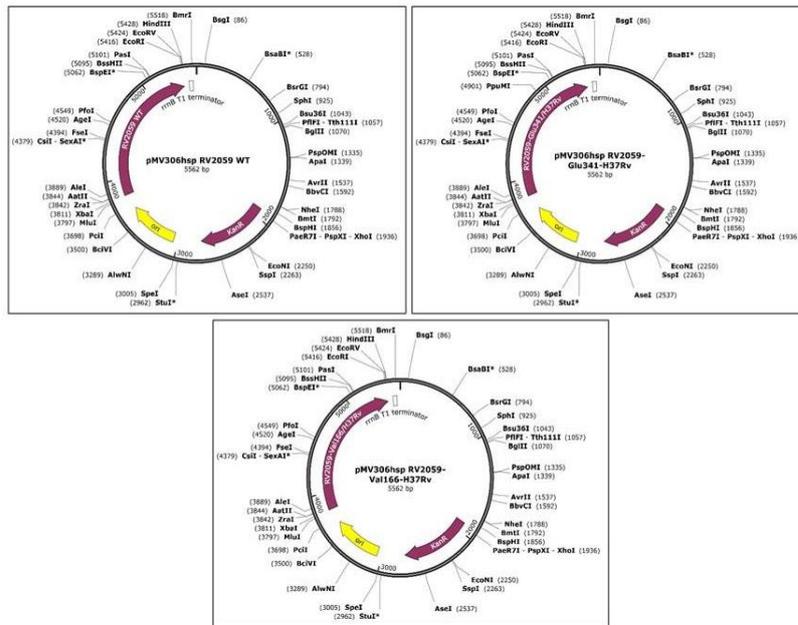


Figura 5. Representación gráfica de los plásmidos pET24a (+) con el gen Rv2059 Wt/ Glu341Gly/Val166Ile.

Fuente: SnapGene2023

Se emplearon las siguientes cepas y recursos biológicos (Tabla 2).

Tabla 2. Material biológico empleado para el estudio de proteína recombinante y en el modelo de *M. tuberculosis*.

MATERIAL BIOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS	AMBIENTE DE TRABAJO
Ensayo con la proteína recombinante		
PZAsa PZAsa-quelada	Proteína recombinante: Gen <i>pncA</i> clonado en pET28a [<i>pncA</i> ::kanR] y expresado en <i>E.coli</i> LEMO BL21 (DE3)pLysS. Tratada con EDTA	Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH
Proteína Rv2059 mutante Rv2059 Glu341Gly Rv205 Val166Ile	Gen sintetizado en pET24-a (+) por Genemed. Expresión en <i>E. coli</i> BL21 (DE3)pLysS	Genemed Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH
Ensayo en <i>M. tuberculosis</i>		
<i>M.tuberculosis</i> H37Rv	Cepa de referencia. Sensible a medicamentos	Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH
Plásmido pKM461	Vector que expresa Int/ Bxb 1 en exposición a ATC. Resistente a Kanamicina (Kan)	Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH
Oligonucleótido Target	De cadena simple con un sitio attP para recombinación	Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH
Plásmido ORBIT (pKM464)	Vector con un sitio attB de recombinación y el marcador de selección para higromicina (HgrR)	Laboratorio de Bioinformática y Biología molecular-LID-UPCH

La tabla detalla los diferentes tipos de materiales biológicos utilizados en los ensayos, incluyendo sus características específicas y el entorno de trabajo correspondiente donde se llevaron a cabo los estudios.

7.5 Procedimiento experimental

7.5.1 Selección de mutaciones en el gen que codifica para la metalochaperona Rv2059 y ensayo de interacción entre Rv2059 y la enzima PZAsa de *M. tuberculosis*.

a) Modelado de la proteína nativa o tipo salvaje de Rv2059

- i) La estructura predicha de Rv2059 se descargó de la "Base de Datos de Estructuras de Proteínas AlphaFold" (<https://alphafold.ebi.ac.uk/entry/O07257>). Los residuos 1-81 y 357-511 en los extremos N y C, respectivamente, no tenían una estructura secundaria asignada, por lo que se eliminaron ya que se consideraron irrelevantes para el acoplamiento molecular con PZAsa. Esto se hizo manualmente con PyMol v.2.4.1 (50).
- ii) Se añadieron átomos de hidrógeno a la estructura con el servidor web H++ (51) a pH=7.0 y todas las opciones por defecto. Se identificaron los residuos coordinantes y los átomos donantes de metal basándose en centros metálicos y secuencias reportadas en la literatura, y se corrigió el estado de protonación de estos residuos. La geometría de coordinación se determinó mediante inspección visual y se añadió el metal al centro geométrico formado por los átomos donantes.
- iii) Minimización inicial. El sistema de metaloproteína en agua e iones se construyó con AmberTools20-tleap (52). Se utilizó el campo de fuerza ff14SB de Amber (52) para la proteína y se creó una caja periódica de 12 Å de distancia de la superficie de la metaloproteína con agua de tipo TIP3P. Se utilizaron los parámetros frcmod.ions11m_126_tip3p para los iones y el metal, y se trabajó con NaCl a una concentración de 0.154 M añadido mediante el método de división

(52). Se obtuvieron los archivos de topología y coordenadas prmtop e inpcrd. Luego, se añadieron los enlaces y las constantes de fuerza entre el metal y los átomos coordinantes utilizando AmberTools20-parmed (52) con un valor de 2.1 Å y 50 kcal/mol, respectivamente. Los archivos resultantes se convirtieron en topologías y coordenadas para Gromacs 19 utilizando AmberTools20-parmed (52). Se aplicó un restringimiento armónico a los enlaces relacionados con el metal y se minimizó el sistema en Gromacs (52,53).

iv) Optimización geométrica del metal y los residuos coordinantes. El metal se extrajo junto con los residuos de la primera esfera de coordinación (MBS) en Pymol de la metaloproteína minimizada en iv. Se añadieron átomos de hidrógeno a los grupos carbonilo y amino de los residuos para completar el octeto en IQmol (54), y se optimizó la geometría con Gaussian 09 (55) manteniendo los carbonos alfa inmóviles. La optimización se llevó a cabo con el método DFT (56), funcional B3LYP (57-59), conjunto de bases potenciales de núcleo efectivo SDD (60) para el metal y 6-31G(d,p) (12) para el resto de los átomos, teniendo en cuenta la dispersión de Grimme (61). Las coordenadas MBS optimizadas se insertaron en la estructura de la metaloproteína obtenida de 6 y se guardaron como la estructura final a parametrizar. Se verificó y corrigió si fuera necesario la orientación adecuada de los átomos en la MBS.

v) Parametrización (MCPB.py). La metaloproteína se parametrizó utilizando AmberTools20-MCPB.py (52), que consta de 3 cálculos en Gaussian 09: optimización de la distancia de enlace metal-ligando, obtención de las constantes de fuerza y cálculo de las cargas parciales del metal y su entorno de coordinación.

MCPB.py extrae el MBS (modelo pequeño y grande) de la metaloproteína y genera los archivos de entrada para Gaussian 09 con opciones de cálculo predefinidas, que solo se cambiaron para el funcional y el conjunto de bases. La optimización de los enlaces de coordinación y la obtención de las constantes de fuerza se obtuvieron a partir de cálculos de Gaussian con el modelo pequeño bajo condiciones reportadas en la literatura (57,58,59): método DFT, funcional B3LYP, conjunto de bases SDD de potencial de núcleo efectivo para el metal y 6-31G(d,p) para el resto de los átomos (H, C, N, S y O). Las cargas parciales se obtuvieron con el modelo grande bajo condiciones reportadas en la literatura (62,63,64). El modelo grande se optimizó bajo las mismas condiciones que el modelo pequeño y las cargas parciales de la geometría resultante se calcularon mediante un cálculo de punto (sin optimizar) con el método DFT, funcional B3LYP y conjunto de bases 6-311++G(3df,3pd) para todos los átomos.

vi) Minimización final. Con AmberTools20-MCPB.py se extrajeron las distancias de enlace de coordinación, las constantes de fuerza y las cargas parciales obtenidas de los cálculos. Se creó una estructura pdb de la metaloproteína, un archivo atleap, mol2 del metal y residuos coordinantes, y frcmod con los parámetros MBS con los que se construirá el sistema de metaloproteína en agua y iones en AmberTools20-tleap. Se utilizó el campo de fuerza ff14SB de Amber para la proteína y se creó una caja periódica de 12 Å de distancia de la superficie de la metaloproteína con agua de tipo TIP3P. Se utilizaron parámetros de frcmod.ions11m_126_tip3p para NaCl con una concentración de 0.154 M añadida mediante el método de división. Se obtuvieron los archivos de topología y coordenadas prmtop e inpcrd del sistema.

Los archivos resultantes se convirtieron luego en topologías y coordenadas para Gromacs utilizando AmberTools20-parmed. El sistema se minimizó en Gromacs y la macromolécula minimizada se extrajo en formato pdb.

Finalmente, la metaloproteína obtenida en vii se renumeró según la secuencia original de aminoácidos del modelo AlphaFold y se cambiaron los nombres de los residuos según la convención seguida en el software Haddock.

b) Dinámica Molecular y Muestreo de Conformaciones

Realizamos una simulación de dinámica molecular de la proteína pirazinamidasasa (PDB ID 3PL1), sin iones metálicos, para obtener un conjunto de diferentes conformaciones para modelar el acoplamiento molecular con cada una de ellas. Todas estas conformaciones se utilizaron para realizar el acoplamiento molecular con cada una de las metalochaperonas candidatas. La dinámica molecular se realizó utilizando el software GROMACS v2019.3. Para ello, la proteína se centró en una caja cúbica con espaciado de 1.5 nm y se solvató con moléculas de agua de tipo TIP3P. Se añadieron iones de cloro (Cl) y sodio (Na) a una concentración de 0.15M para neutralizar el sistema. Luego, el sistema se minimizó energéticamente utilizando el algoritmo de paso descendente, con un máximo de nsteps = 5000. La temperatura y la presión se equilibraron utilizando el ensamblaje NVT y NPT, respectivamente. La temperatura se equilibró con el termostato de Berendsen a 298.15 K, durante 2 ns; mientras que la presión se equilibró a 1 bar con el barostato de Parrinello-Rahman, durante 4 ns. Finalmente, se realizaron 2 ejecuciones de producción, con un paso de integración de 2 fs utilizando el algoritmo de integrador leap-frog. Se utilizó el algoritmo LINCS para restringir las interacciones durante la

equilibración, y se utilizó el algoritmo Particle-Mesh Ewald para restringir las interacciones a larga distancia.

Con la trayectoria resultante, se realizaron ensayos de agrupación de RMSD de los carbonos alfa ($C\alpha$ -RMSD) utilizando valores de valla desde 0.3 Å hasta 3.4 Å, en incrementos de 0.1 Å. Para ello, se utilizó el software Wordom v0.22, considerando solo los residuos en un diámetro de 10 Å alrededor del sitio de coordinación. Posteriormente, se utilizó un enfoque similar al método del codo para seleccionar el menor número de grupos con la mayor distancia entre grupos, con la necesidad de reducir el costo computacional. Al graficar todos los umbrales de RMSD versus el número de grupos, identificamos que la agrupación con un RMSD de 3.4 Å era la más adecuada, que contenía 8 conformaciones que se utilizaron en los ensayos posteriores de acoplamiento molecular proteína-proteína.

c) Acoplamiento Molecular de Rv2059 y PZAsa

Acoplamos los conjuntos de conformaciones de PZAse (obtenidos durante la agrupación basada en $C\alpha$ -RMSD) contra la estructura modelada de Rv2059 utilizando Haddock v.2.4 local release (65). Se ha demostrado que Rv2059 reactiva una PZAsa desprovista de metal (66). Esto implica que durante la reactivación, la esfera de coordinación de Rv2059 debe estar cerca de la de PZAsa. Por lo tanto, para predecir la posible interacción que adoptan las dos proteínas durante la transferencia de metal, realizamos un enfoque de acoplamiento focalizado. En él, definimos como residuos activos de ambas proteínas a los involucrados en la coordinación del metal. Es decir, His137, His197, Glu261 y Glu341 para Rv2059; y Asp49, His51, His57 y

His71 para PZAs. No se definieron residuos pasivos.

Dos mil estructuras fueron modeladas para la fase rígida; de éstas fueron seleccionadas las mejores 200 (basadas en las puntuaciones de Haddock) para el recocido simulado semi-flexible y el refinamiento flexible final. Las soluciones de ambos pasos de acoplamiento se agruparon en base al porcentaje de contactos comunes (FCC) utilizando un umbral de 0.6 Å. Calculamos las puntuaciones Haddock medias del grupo utilizando las 4 estructuras con los valores más bajos. Luego, clasificamos los grupos, siendo los que tenían las puntuaciones Haddock medias más bajas los más favorables. Se seleccionó la estructura más favorable del mejor grupo para un análisis adicional. Además, se recuperaron las estructuras más favorables de otros grupos con puntuaciones con desviaciones estándar superpuestas a las de los grupos superiores.

Se midió una distancia entre el centro de masas de los residuos de coordinación de PZAs y el metal de Rv2059 en los complejos recuperados. Se seleccionó la estructura con la menor distancia para un análisis adicional.

d) Cálculo de la energía de interacción entre la PZAs y Rv2059 Wt y mutantes

El complejo seleccionado en el acoplamiento entre Rv2059 y PZAs se utilizó para calcular la energía de afinidad en FoldX, utilizando la función AnalyseComplex (67). También se introdujeron mutaciones a Rv2059 mapeadas por nuestro grupo en el complejo utilizando el software MODELLER V.10.1 (68,69). Las energías de los complejos mutantes también se calcularon utilizando el mismo procedimiento.

7.5.2 Estudio con la proteína recombinante

7.5.2.1 Producción de la PZAsa recombinante y PZAsa quelada.

a) Transformación de pET28a (+)::pncA en LEMO (DE 3) pLysS

El procedimiento se llevó a cabo conforme a lo descrito por Sheen et al., 2020 (1). Las células LEMO (DE3) pLysS fueron tratadas con CaCl₂ y posteriormente transformadas con el plásmido recombinante pET28a(+)::pncA mediante shock térmico. Las cepas transformadas se sembraron en agar LB suplementado con kanamicina (40 µg/ml) y cloranfenicol (10 µg/ml). Más detalles del proceso, ver Anexo 01 y Anexo 02

b) Expresión y purificación de PZAsa-Mtb

Para la expresión de PZAsa-Mtb, se cultivó una colonia de las células transformadas en 50 ml de caldo LB con kanamicina (40 µg/ml) y cloranfenicol (30 µg/ml) a 37 °C y 225 rpm durante 18 horas. Posteriormente, se transfirieron 25 ml del cultivo a un matraz con 400 ml de caldo LB con los respectivos antibióticos a 37 °C en agitación hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀) de 0.6-0.8. Se tomó 1 ml de muestra de caldo como control (no inducido) y se indujo la expresión con 0.7 mM IPTG durante 3 horas a 37 °C y 225 rpm. Al finalizar el periodo de inducción, se tomó una alícuota como control inducido y se ajustó al OD del control no inducido. La expresión de PZAsa-Mtb se corroboró mediante SDS-PAGE al 12%. Luego, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y se suspendió

el pellet en 20 ml de buffer de unión (20 mM de buffer fosfato pH 7.4, 500 mM de NaCl y 20 mM de imidazol). La muestra se sonificó durante 3 ciclos de 1 minuto (1 segundo ON/1 segundo OFF) con intervalos de 5 minutos en hielo y se centrifugó a 12,500 rpm durante 20 minutos a 4 °C. El sobrenadante se filtró con un filtro de 0.2 µm, se almacenó a 4 °C y se tomó una alícuota de 50 µl para verificarla por SDS-PAGE. Asimismo, el pellet se resuspendió en buffer A (8 M urea, 1 M Tris-HCl pH 8.0 y 500 mM NaCl) y se tomó una alícuota de 50 µl.

El producto filtrado se purificó por cromatografía de afinidad mediante His-tagged Fusion Protein Purification (GE Healthcare). La columna se equilibró con 15 ml de buffer de unión (20 mM de buffer fosfato, 0.5 M NaCl, 20 mM imidazol pH 7.4), se pasó el sobrenadante y se lavó con 15 ml de buffer de lavado (20 mM de buffer fosfato, 0.5 M NaCl, 35 mM imidazol, 10% glicerol pH 7.4), seguido de una gradiente de buffers de lavado de 40 y 60 mM de imidazol, con la adición de 2% de glicerol a la concentración de 40 mM. La columna fue lavada con agua Milli-Q y guardada en etanol al 20% a 4 °C. Finalmente, se cuantificó la concentración de PZAsa-Mtb mediante la técnica de Bradford. Los detalles adicionales del proceso se encuentran en el Anexo 03.

c) Quelación de PZAsa recombinante

PZAsa-Mtb se concentró en buffer Hepes 50 mM pH 6.4 a una concentración de 100 µM. El procedimiento se realizó conforme a lo detallado en la Tabla 1. Ambas reacciones (control de quelación y PZAsa-Mtb quelada) se incubaron toda la noche (18 horas) a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó tres

veces la muestra quelada y el control con buffer Hepes 50 mM pH 7.4 mediante ultrafiltración con Amicon 10 kDa (Millipore). La concentración de proteína se cuantificó utilizando la prueba de Bradford (1).

d) Elaboración de la curva estándar de POA

Se realizó la curva estándar con diferentes concentraciones de POA en un ensayo de Wayne modificado (39): 0.2; 1; 2.5; 5; 7.5; 10; 12.5; 15; 17.5 y 20 mM. Estas concentraciones se prepararon en una solución con buffer Hepes 100 mM, pH 6.4. Se tomaron 100 μ l de cada concentración de POA y se les agregaron 10 μ l de sulfato de amonio ferroso (SAF) al 20%, seguidos de 445 μ l de glicina HCl 0.2 M, pH 3.4. El ensayo se realizó por triplicado y las longitudes de onda se midieron a 450 nm en un espectrofotómetro para placas de 96 pocillos (Figura 6).

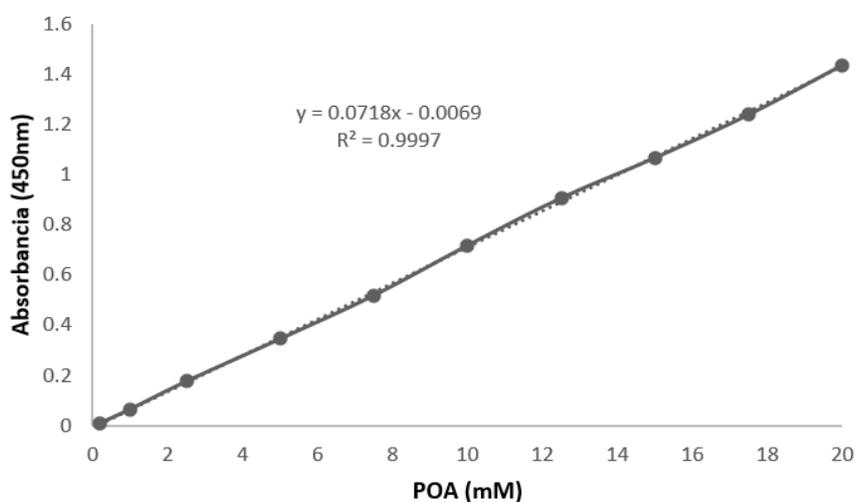


Figura 6. Curva estándar POA en Buffer HEPES vs Absorbancia (450 nm).

La gráfica muestra la relación lineal entre la concentración de POA (mM) y la absorbancia a 450 nm. Cada punto representa el promedio de tres réplicas, indicando un excelente ajuste de los datos

7.5.2.2 Producción de la proteína recombinante Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile.

La síntesis de la secuencia nativa (Rv2059-Wt) (NCBI: NC_000962.3) y de las dos secuencias del gen Rv2059 con las mutaciones (Val166Ile y Glu341Gly) en el vector pET24-a(+) fue llevada a cabo por GeneMed Biotechnologies. Las secuencias fueron optimizadas para su expresión en *Escherichia coli* y diseñadas con una etiqueta de His en el extremo C-terminal para su posterior purificación mediante cromatografía de afinidad.

a) Transformación de pET24a (+)::Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile en *E.coli*

BL21 (DE3) pLysS

Las células de expresión *E. coli* (DE3) pLysS fueron tratadas con CaCl₂ y posteriormente transformadas con el plásmido recombinante pET24a(+)::Rv2059 (Rv2059 Wt/Glu341Gly/Val166Ile) mediante shock térmico (1). Las cepas transformadas se sembraron en agar LB con kanamicina (40 µg/ml) y cloranfenicol (30 µg/ml) para su selección e incubadas a 37 °C durante la noche. Para más detalles del proceso, ver Anexo 01 y Anexo 02

b) Expresión y purificación de Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile

La expresión de la proteína recombinante Rv2059, tanto nativa como en sus variantes mutantes, se llevó a cabo siguiendo el mismo protocolo estandarizado; por lo tanto, solo se describirá el procedimiento para la proteína nativa o wild type.

El protocolo estándar del laboratorio se realizó de la siguiente manera: se cultivó una colonia de las células transformadas en 50 ml de caldo LB con kanamicina (40 µg/ml) y cloranfenicol (30 µg/ml) a 37 °C y 225 rpm durante 18 horas. Posteriormente, se transfirieron 25 ml del cultivo a un matraz con 400 ml de caldo LB con los respectivos antibióticos, incubándose a 37 °C en agitación hasta alcanzar una OD600 de 0.6-0.8. Se tomó 1 ml de muestra de caldo como control no inducido y se indujo la expresión con 1 mM de IPTG durante 4 horas a 37 °C y 225 rpm. Transcurrido el tiempo de inducción, se tomó una alícuota como control inducido y se ajustó al OD del control no inducido. Los resultados se evaluaron mediante SDS-PAGE al 12%. Sin embargo, la observación de la SDS-PAGE al 12% no mostró ninguna expresión, por lo que se procedió a una estandarización variando parámetros: tipo de célula de expresión (*Escherichia coli* DE3, DE3 pLysS, Rosetta y Lemo), concentración de IPTG (0.1, 0.5, 0.7 y 1 mM), medio de cultivo (LB, LB suplementado con glucosa al 0.5%, 1%, 3% y 5%, y medio TB), proporción de volumen de cultivo/cantidad de oxígeno disponible en el matraz (1/4 y 1/10), OD600 de inducción (0.6-0.8 y 1.2) y tiempo de expresión (4 y 6 horas).

Se logró un alto nivel de expresión bajo las siguientes condiciones: se cultivó una colonia transformada de *E. coli* DE3 (pLysS) (pET24a-Rv2059) en 50 ml de medio de cultivo Terrific Broth (TB) con cloranfenicol (30 µg/ml) a 37 °C y 225 rpm durante 18 horas. Posteriormente, se transfirieron 30 ml del cultivo saturado a un matraz Erlenmeyer (capacidad 3 L) con 300 ml de caldo TB con kanamicina (40 µg/ml) (1/10) y se incubaron en agitación a 37 °C hasta alcanzar una OD600 de 1.1-1.2. La expresión se indujo con 1 mM de IPTG durante 5 horas a 37 °C y 225 rpm. Luego, la muestra se centrifugó a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C.

Se descartó el sobrenadante y se almacenó el pellet a -70 °C hasta su uso, por un máximo de 20 días. La expresión se verificó mediante SDS-PAGE al 12% y Western Blot. Este último se realizó bajo las siguientes condiciones: bloqueo con albúmina de suero bovino (BSA) durante 1 hora y 30 minutos a temperatura ambiente; incubación con anticuerpo primario anti-His (1:5000) durante 16 horas en agitación a temperatura ambiente; incubación con anticuerpo secundario anti-mouse (1:2500) durante 1 hora y 30 minutos; y revelado en PBS + H₂O₂ + DAB.

c) **Solubilización y replegamiento de Rv2059 nativa de cuerpos de inclusión**

Los resultados de la SDS-PAGE al 12% mostraron la naturaleza insoluble de la proteína Rv2059, por lo que se siguió el protocolo de solubilización y replegamiento de proteínas de cuerpos de inclusión (Anupam Singh et al., 2015) (3) con modificaciones. El pellet celular, producto de dos procesos de expresión, se resuspendió en 50 ml de buffer de lisis en frío (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, pH 7.4) y se sonicó durante un ciclo de 5 minutos (5 s ON, 10 s OFF) a 40% de amplitud, manteniendo la temperatura baja en

hielo. La suspensión se centrifugó a 14,000 g durante 20 minutos a 4 °C, descartando el sobrenadante. El pellet se resuspendió en 50 ml de buffer de lavado A (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 1% Triton X-100, pH 7.5) en frío y se centrifugó nuevamente. Posteriormente, se lavó el pellet con 25 ml de buffer de lavado B (50 mM Tris-HCl, pH 7.4) y se centrifugó. Este paso se repitió, y finalmente, el pellet se resuspendió en 2 ml de agua MilliQ, midiéndose la concentración de proteínas totales mediante NanoDrop 2000c. Se agregaron 5 mg de CI en un tubo de microcentrífuga con 1 ml de buffer de solubilización (50 mM Tris-HCl, 5 mM EDTA, 6 M urea, pH 7.4) y se dejó en un agitador 3D (KJMR-V) a temperatura ambiente durante 16 horas. Los microtubos se centrifugaron a 14,000 g por 30 minutos y se almacenó la proteína solubilizada (sobrenadante) en hielo. La proteína solubilizada se añadió por goteo al buffer de refolding (50 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 10% (w/v) sacarosa, pH 7.4), generando una dilución 1/10. Finalmente, se incubó por 4 horas a 4 °C y se filtró la fracción renaturada usando un filtro de membrana PVDF de baja unión a proteínas de 0.45 µm para remover posibles agregados.

d) Concentración de la proteína re-plegada Rv2059 nativa recombinante

Para el cambio de buffer y la concentración de la solución con la proteína renaturada, se utilizó un filtro Amicon Ultra de 10 kDa (UFC901008, Merck). La columna Amicon se acondicionó con 10 ml de agua Milli-Q y se centrifugó a 4000 g durante 10 minutos. Luego, se añadieron 10 ml de buffer HEPES 50 mM y se centrifugó nuevamente. En la columna acondicionada, se incorporó la solución con la proteína renaturada y se realizaron centrifugaciones a 3000 g durante 15 minutos hasta pasar toda la solución. Se redujo el volumen a 3 ml y se añadió 5 veces el volumen de buffer HEPES 50 mM. Al finalizar el último lavado, se cuantificó la proteína mediante el método de Bradford y se almacenó a 4 °C por no más de 24 horas.

7.5.2.3 Ensayo de reactivación de la PZAsa-quelada (Apo) empobrecida en metales con Rv2059 Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile.

Para evaluar si la metalchaperona recombinante Rv2059 Wt y las mutantes Rv2059 Glu341Gly y Val166Ile tenían la capacidad de reactivar la PZAsa recombinante de *M. tuberculosis* (PZAsa-MT) quelada o desprovista de metales (PZAsa-Apo) *in vitro*, se tituló 3uM de PZAsa-Apo, una concentración previamente reportada por nuestro laboratorio para evaluar ensayos de reactivación (19). Esta concentración de PZAsa-Apo se expuso a diferentes concentraciones de: 0.05uM, 0.1uM, 0.5uM, 0.7uM, 1uM y 2uM durante 1h a 37°C en tampón HEPES 50mM (pH=6.5). La actividad PZAsa se midió monitoreando la aparición de ácido pirazinoico durante el tiempo de incubación descrito previamente por Sheen et al: Se añadió PZA (20 mM) y después de 3 min la reacción se detuvo con glicina-HCl pH 3,4 (2M) (19). El POA producido después de

la hidrólisis de PZA se reveló con sulfato ferroso de amonio (SAF) al 20%. Para precipitar las sales, se centrifugó 10,000rpm por 5 minutos, y se midió la densidad óptica (OD) a 450nm en placas de 96 pocillos (19). Como parte del control negativo se realizó la inactivación de la proteína recombinante Rv2059 mediante un ciclo de choque térmico de 100 °C durante 30 min seguido de 1 min en hielo. Para ello se usó 0.5uM y 1uM de Rv2059. Asimismo, se realizó una desactivación enzimática con papaina (1:25). Luego, las proteínas inactivadas térmicamente se evaluaron en una reacción de Wayne antes detallada para evaluar la reactivación de PZAse-MT-Apo.

Cálculo de la actividad enzimática de PZAsa recuperada

Para el cálculo de la actividad enzimática recuperada se generó una curva estándar de Absorbancia (450nm) vs mM POA. Para ello se usaron las siguientes concentraciones de POA y se revelaron en una reacción de Wayne previamente detallada: 0.2, 1, 2.5, 5, 7.5, 10, 12.5, 15, 17.5 y 20mM de POA.

Se reportó la actividad enzimática recuperada de PZAsa como mMPOA x mg PZAsa-1 x min-1 utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{mMPOA x mg PZAsa-1 x min-1} = (\text{mMPOA/mgPZAsa})/3\text{min}$$

Donde:

$$\text{mMPOA} = \text{Absorbancia corregida (450nm)} - (-0.00697)/0.0718^*$$

$$\text{mg PZAsa} = [\text{uM PZAsa}] * 24 \text{ kDa}$$

* Se aplica la ecuación de la recta generada por la recta Abs (450nm) vs mMPOA

7.5.3 Estudio en el modelo de *Mycobacterium tuberculosis*

7.5.3.1 Eliminación del gen Rv2059 en *M. tuberculosis* mediante ORBIT en *M.*

tuberculosis

a) Diseño del oligonucleótido guía

Durante la duplicación del cromosoma bacteriano, el oligonucleótido guía en la técnica ORBIT (oligonucleótido ORBIT) debe ser empleado como un fragmento de Okazaki direccionado al gen diana. Por tanto, las secuencias flanqueantes de los oligonucleótidos guía deben ser el reverso complementario de la hebra rezagada de cada gen diana que se desea eliminar.

El diseño del oligonucleótido guía comienza con una secuencia precursora de oligo. Para ello, se utilizó la secuencia genómica de *M. tuberculosis H37Rv* (NCBI: GCA_000263135.1) y se identificó el gen Rv2059 (NCBI: NC_000962.3). Los extremos flanqueantes de la secuencia precursora del oligonucleótido estuvieron compuestos por 70 bases (Figura 7, bloque verde). Un extremo contenía 40 bases antes y 10 codones después del gen Rv2059 inscritos en el genoma de *M. tuberculosis* (2315134...2315203), mientras que el otro extremo se compuso por 70 bases de la secuencia del gen Rv2059 (2316088...2316157) con la finalidad de no interferir en la expresión del gen Rv2060 (MTVO19.01) (Figura 7). La secuencia attP (5'GGT TTG TCT GGT CAA CCA CCG CGG TCT CAG TGG TGT ACG GTA CAA ACC 3'), reconocida por la integrasa Bxb1, se insertó en el medio de las secuencias flanqueantes diseñadas para el gen diana. Para seleccionar la secuencia final

que dará lugar a los oligonucleótidos guía de cada gen, se siguió la siguiente regla: “la secuencia del oligonucleótido guía corresponderá a la hebra codificante (5´ a 3´) si el gen diana se transcribe hacia la secuencia ori, o a la hebra rezagada o molde (3´ a 5´) si el gen diana se transcribe hacia la región contraria” (3). Para el gen Rv2059, la secuencia del oligonucleótido corresponde a la hebra molde: 5´GGC CAC CTG CAG TTC GTC GGT CGC CGC GGT AGG TGTCTGCGGGTTAACCAGCAACGCCGCGACCTCACGG. CTCCGGTGACAAGGATCACCGGGGTGGCCACCGTCCTCCTTATCG ATAACAGTTTTTCATTATTGCGACGTC 3´, en la cual señalamos en negro la secuencia del sitio de recombinación attP.

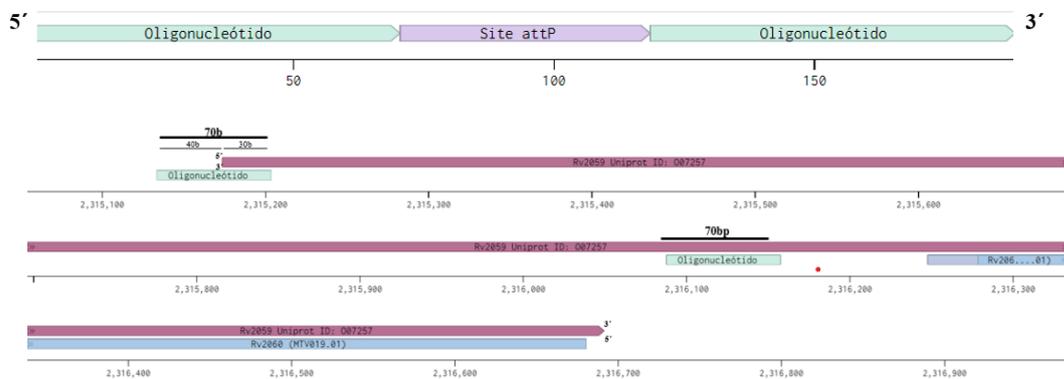


Figura 7. Diseño del oligonucleótido ORBIT para el gen Rv2059 utilizando como molde el genoma de H37Rv.

Fuente de diseño: Plataforma Benchling

b) Transformación del vector pKM461 en *M. tuberculosis* H37Rv

Se cultivaron dos asadas de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* en 5 ml de caldo 7H9 enriquecido con 10% OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa), 0.2% de glicerol y 0.05% de Tween 80 a 37 °C en agitación constante (200 rpm) durante 10 días. Luego, se transfirieron 3 ml del cultivo saturado a un matraz con 50 ml de caldo 7H9 enriquecido y se incubaron en agitación constante a 37 °C hasta alcanzar una OD de 0.6-0.8. Posteriormente, se añadieron 5 ml de glicina 2 M. El cultivo con glicina añadida se incubó a 37 °C en agitación constante durante 16 horas. Posteriormente, las células fueron cosechadas por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 17 °C y suspendidas en 10 ml de glicerol al 10%. Este paso se repitió dos veces. Finalmente, las células competentes se suspendieron en 1 ml de glicerol al 10% (3).

Se alicuotaron 200 µl de células competentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadieron 5 µl del plásmido pKM461 (30 ng/µl). Con ayuda de una micropipeta, se suspendió la mezcla y se transfirió la suspensión celular a una cubeta de electroporación (gap de electrodo de 0.2 cm, BTX). La suspensión celular se electroporó con un pulso de 2.5 kV, 25 µF, 1000 ohms, con un tiempo de pulso óptimo de 22 ms. Inmediatamente, se recuperó la suspensión celular en 5 ml de medio 7H9 enriquecido y se incubó a 37 °C en agitación constante durante 16 horas. Después de ello, las células se recuperaron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 17 °C y se prepararon diluciones del cultivo en medio 7H9 enriquecido (1:100, 1:1000). Finalmente, se sembraron 1 µl de la muestra directa

y las respectivas diluciones, de manera independiente, en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico (25 µg/ml de kanamicina) y se incubaron a 37 °C durante 3 semanas.

Como controles de electroporación, se sembraron en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico, las muestras directas de las cepas H37Rv que fueron electroporadas con agua PCR (control de agua) y electroporadas solas (control de cepa). El agua PCR que se empleó en el control de electroporación fue la misma que se utilizó para preparar el plásmido pKM461 a la concentración deseada.

c) Transformación del vector de selección pKM464 y el oligonucleótido guía.

A partir de una muestra criopreservada de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* transformada con el plásmido pKM461, se agregaron 500 µl de suspensión celular a un matraz con 50 ml de medio 7H9-OADC-Tween 0.05% suplementado con kanamicina (20 µg/ml). Las cepas se cultivaron bajo agitación constante (200 rpm) a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica (OD) de 0.8-1.0. Se adicionó anhidrotetraciclina (ATC) a una concentración final de 500 ng/ml y se continuó la incubación a 37 °C con agitación constante durante 8 horas. Posteriormente, se añadieron 5 ml de glicina 2 M al cultivo, manteniéndolo a 37 °C con agitación constante por 16 horas adicionales. Las células se recolectaron mediante centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 17 °C y se lavaron con 30 ml de glicerol al 10%. Este procedimiento de lavado se repitió dos veces. Finalmente, las células recolectadas por centrifugación se resuspendieron en 1

ml de glicerol al 10%. Se alicuotaron 400 μ l de células competentes en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se añadieron 10 μ l del plásmido pKM464 (40 ng/ μ l) y 3 μ l del oligonucleótido guía Rv2059 (10 μ M). Con ayuda de una micropipeta, se resuspendió la mezcla y se transfirió la suspensión celular a una cubeta de electroporación (gap de electrodo de 0.2 cm, BTX). La suspensión en la cubeta fue electroporada con un pulso de 2.5 kV, 25 μ F, 1000 ohms, con un tiempo de pulso óptimo de 22 ms (3). Inmediatamente, se recuperó la suspensión celular en 5 ml de medio 7H9 enriquecido y se incubó a 37 °C en agitación constante durante 16 horas. Después de ello, las células se recuperaron por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos a 17 °C y se prepararon diluciones del cultivo en medio 7H9 enriquecido (1:10, 1:60). Finalmente, se sembraron 300, 100 y 50 μ l de la muestra directa y las dos diluciones, de manera independiente, en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico (25 μ g/ml de kanamicina y 50 μ g/ml de higromicina). Se incubaron a 37 °C durante 3 semanas.

Como controles de electroporación, se sembraron en placas 7H10-OADC con y sin antibiótico, las muestras directas de las cepas H37Rv que fueron electroporadas solo con el plásmido pKM464 (control de oligo), solo con agua PCR (control de agua) y electroporadas solas (control de cepa). El agua PCR que se empleó en el control de electroporación fue la misma que se utilizó para resuspender el plásmido pKM461 y los oligonucleótidos guía.

d) Verificación del noqueo del gen Rv2059 mediante la técnica de PCR y secuenciamiento

Las cepas H37Rv transformantes se verificaron mediante análisis de PCR. Para ello, se extrajo DNA genómico de las cepas seleccionadas en Kanamicina e Higromicina mediante la técnica fenol-cloroformo, para más detalles del proceso ver Anexo 04 . El resultado esperado de esta técnica es el reemplazo del gen Rv2059, seguido de la integración del plásmido pKM464 por su región attB en el sitio attP generando extremos attL y attR (Figura 8). A este constructo integrado a nivel genómico lo denominamos H37Rv Constructo ORBIT Rv2059 (Figura 8). Los primers fueron diseñados para verificar la presencia de este constructo (Tabla 3) y los productos de amplificación se enviaron a secuenciar a la empresa Biotecnológica POSMAGEN. El resultado del secuenciamiento completo se muestra en el Anexo 06.

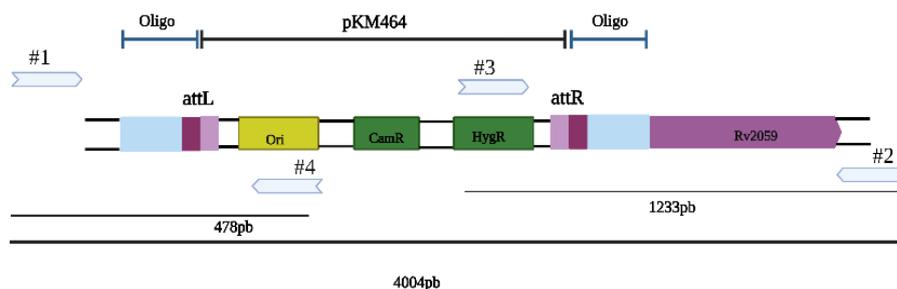


Figura 8. H37Rv Constructo ORBIT Rv2059.

Muestra la integración del oligonucleótido y plásmido de carga pKM464 en *M. tuberculosis*

Tabla 3. Primers empleados para la verificación del noqueo del gen Rv2059.

Cepa	#	Primer forward	#	Primer reverse	Tamaño de Producto de PCR
H37Rv : Rv2059 KO	1	GGGGCACCCTTCCTTCGAAGC T	2	AAACGGGCGCCGTCTAC GAC	478 pb aprox.
	3	GACCAACATCTTCGTGGACCT	4	CCTGTCGGGTTTCGCCA C	1233pb aprox.

Los primers 1 y 2 se diseñaron a partir del genoma de H37Rv *M. tuberculosis*. Mientras 3 y 4 fueron diseñados a partir del plásmido pKM464.

Diseño del constructo “H37Rv Constructo ORBIT Rv2059”

Para el análisis de los resultados de secuenciamiento, se generó una secuencia denominada H37Rv: Constructo ORBIT Rv2059, esperada en caso de que la integración del oligonucleótido y el plásmido pKM464 en el genoma de *M. tuberculosis* haya sido exitosa. La construcción de esta secuencia consideró inicialmente la integración del oligonucleótido (attB) y la eliminación del gen Rv2059 en el genoma de *M. tuberculosis*. El oligonucleótido debía unirse con las secuencias complementarias en el gen Rv2059 (2315134...2315203 y 2316088...2316157), proporcionando la especificidad necesaria para eliminar la secuencia entre estas dos regiones

(2315204...2316087). Posteriormente, el plásmido pKM464, portador del sitio attP complementario al sitio attB, debía recombinarse con el oligonucleótido, formando un sitio denominado attL (representado en color rosa). La integración de este plásmido (color marrón = secuencia del plásmido, color amarillo = Ori, y color verde = marcadores de resistencia) permitió la inserción del cassette de resistencia a la higromicina, facilitando su selección (Figura 9).

Es importante destacar que la secuencia del gen Rv2059 en color morado, correspondiente al fragmento que no se eliminó, se mantuvo para evitar afectar el marco de lectura del gen Rv2060, como se mencionó en el apartado de metodología “Diseño del oligonucleótido guía” (Figura 9). Este constructo se diseñó en el programa Benchling 2023, usando el genoma completo de *M. tuberculosis* (NC_000962.3:2315174-2316709) junto con las secuencias de los sitios attB y attP para identificar la secuencia CORE y la secuencia del oligonucleótido diseñado para Rv2059.

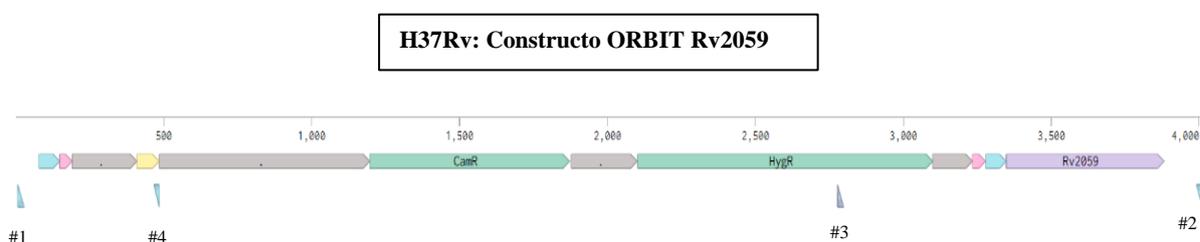


Figura 9. Diseño del constructo “H37Rv: Constructo ORBIT Rv2059”.

Oligonucleótido (color celeste), plásmido pKM464 (color marron, amarillo y verde) , recombinación del sitio attP y attB (color rosa). Asimismo, se muestra la secuencia de Rv2059 que no se llegó a eliminar en el noqueo por ORBIT. El constructo tiene un tamaño de 4004 bp tomando como punto de inicio y final el reconocimiento de los primers #1 y #2.

Una vez generado el constructo, se utilizó Clustal W en la plataforma DNASTAR Navigator 2023 para realizar el alineamiento de verificación con la secuencia nativa H37Rv. La secuencia nativa muestra la región íntegra antes del noqueo del gen Rv2059

en el genoma de *M. tuberculosis*. Los números (#1, #2, #3 y #4) indican las posiciones de los primers diseñados para verificar el noqueo, facilitando la comparación de secuencias al alinearlas desde la misma posición inicial y terminal. El constructo nativo tiene un tamaño de 1759 bases, mientras que el constructo ORBIT Rv2059 mide 4004 bases, ya que incluye el oligonucleótido y el plásmido pKM464 integrados (Figura 10).

El alineamiento Clustal W permitió rastrear toda la secuencia, comenzando desde las regiones más conservadas y extendiéndose hacia las menos conservadas. Esto reveló la similitud en las primeras bases correspondientes a la región upstream del gen Rv2059 y la zona del oligonucleótido, el cual, al integrarse, conserva parte de la secuencia del gen (cuadrante rojo de la derecha). En el lado izquierdo, se encuentra una región más grande similar a H37Rv porque durante el noqueo con ORBIT no se eliminó todo el gen (Figura 10).

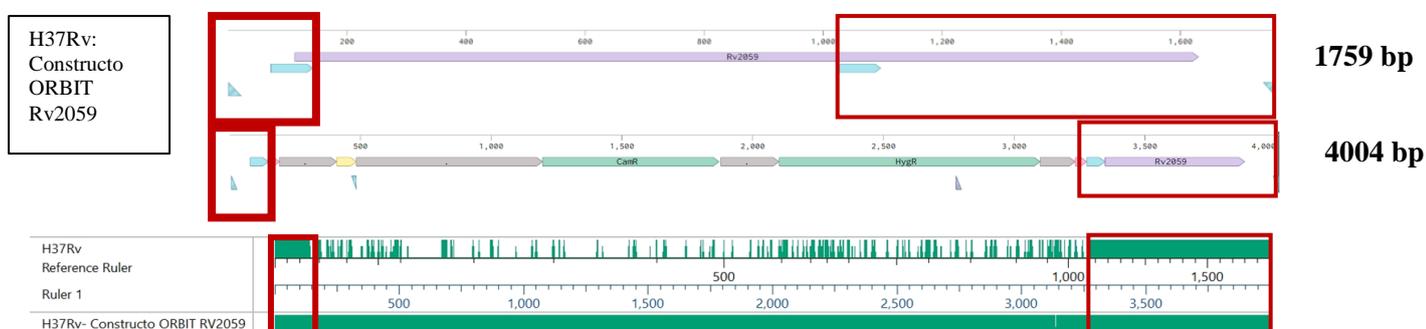


Figura 10. Alineamiento del constructo nativo y ORBIT Rv2059 en Clustal W.

El resultado de alineamiento se muestra en el cuadro inferior de color verde, donde las regiones enmarcadas en rojo son las que presentan similitud en base a lo esperado confirmado el correcto diseño del constructo.

7.5.3.2 Restauración del gen Rv2059 en la cepa *M. tuberculosis* H37RV a través del plásmido integrativo pMV306hsp: Rv2059 Wt/ Glu341Gly y Val166Ile

Previo a transformar la cepa H37Rv:Rv2059 KO con el plásmido integrativo pMV306hsp, se realizó un proceso de curación del plásmido pKM461 debido a que ambos plásmidos (pKM461 Y pMV306hsp) otorgaban resistencia al mismo antibiótico kanamicina (Kan-R). Para ello se siguió el protocolo de curación detallada por Murphy et al, 208 como sigue:

La cepa noqueada mediante el uso de ORBIT se transformó con el plásmido pKM512 (Zeo-R), el cual contiene los genes de escisión Bxb1 (gp47 e Int) y el gen sacR. El plásmido pKM512 transformado en la cepa de *M. tuberculosis*, es portador del gen sacRB que codifica la levansacarasa. El gen SacRB es responsable de la hidrólisis de la sacarosa y de la formación de levanos, que son polímeros de fructosa de gran masa molecular. Dichos levanos se concentran en el espacio periplásmico, causando toxicidad para la bacteria (70). Esta toxicidad ejerce una presión selectiva que favorece la eliminación de las cepas que contienen el plásmido pKM512, permitiendo que las bacterias que han perdido el plásmido sobrevivan y continúen su crecimiento (70,71). Para la selección de las células transformantes, se utilizó zeocina a una concentración de 25 µg/ml (71). Esto permitió la eliminación del plásmido pKM461 (Kan^r) debido a la incompatibilidad entre plásmidos.

Después de aislar las colonias transformantes, se les permitió crecer durante toda la noche en un medio líquido 7H9 que contenía 500 ng/ml de

anhidrotetraciclina (ATC) para expresar las enzimas gp47 a Int que eliminaron el plásmido integrativo pKM464 (Hygro-R). Luego, estas células se sembraron en placas de agar 7H10 que contenían un 10% de sucrosa. El propósito de este paso era eliminar el plásmido pKM512. (70)

Finalmente, las colonias que crecieron en el medio con un 10% de sucrosa se sembraron en placas de agar 7H10, 7H10-Hyg y 7H10-Zeo. Se observó que las colonias sensibles a la higromicina también eran sensibles tanto a la kanamicina como a la zeocina, confirmando así la efectividad del proceso de selección y eliminación del plásmido pKM512.

Una vez curada la cepa del plásmido pKM512 se transformó con el plásmido integrativo pMV306hsp: Rv2059 Wt/Glu342Gly y Val166Ile de manera independiente y se seleccionó las cepas transformantes en medio 7H10 kanamicina (25ug/ml). El método de integración sigue un tipo de recombinación tipo específica, ya que se encuentra mediado por la presencia del sitio AttP en el plásmido pMV306 (GAGCGGGCGACGGGAATCGAACCCGCGTAGCTAGTTTGGGAAGA) y el sitio attB en el genoma de *M. tuberculosis* (GCT CAA TGG TAG AGC CCT AGT CTT CCA AAC TAG CGA CGC GGG TTC GAT TCC CGT CGC CCG CTC). Cabe recalcar que este sitio attB es innato de la cepa mycobacteriana. pMV306 KanR. Se emplearon los primers Forward: 5' AACGCGGCCTTTTTACGGTTCCT 3' y Reverse: 5' CCAGTCTTTCGACTGAGCCTTTC 3' para verificar la integración del

plásmido en el genoma de la micobacteria transformada. El proceso de amplificación por PCR se llevó a cabo con las siguientes condiciones de ciclaje: Desnaturalización inicial a 95°C durante 2 minutos, seguida de 40 ciclos de desnaturalización a 95°C durante 30 segundos, alineamiento a 60°C durante 30 segundos, y extensión a 72°C durante 1 minuto. Finalmente, se realizó una extensión final a 72°C durante 5 minutos y se mantuvo a 4°C.

7.5.3.3 Evaluación de la producción de ácido pirazinoico (POA) en la cepa H37Rv Rv2059KO/ Rv2059Wt, Rv2059Glu341Gly y Rv2059Val166Ile

El ensayo de cuantificación de POA de las cepas **H37Rv Wt, H37Rv Rv2059 KO** y las cepas H37Rv Rv2059KO en las que se restauró la actividad del gen con el plásmido integrativo pMV306: **Rv2059Wt, Rv2059Glu341Gly y Rv2059Val166Ile**.

Se siguió el siguiente protocolo para evaluar cada cepa: Se tomaron dos asadas de un cultivo sólido de *Mycobacterium* de 3 semanas de crecimiento. Se inoculó en un tubo estéril con 7 perlas de vidrio (ZIRCONIA/Silica 2.3mm, BioSpec) y 100 µl de la solución salina tween o SST (0.85% NaCl , 10% Tween 80 y Bicarbonato 7% a pH= 6.5). Se disgregó la cepa con ayuda de un asa de siembra y de un vortex por 2 min. Se dejó reposar 10min para evitar la liberación de aerosoles. Seguidamente, se agregó 3ml de la solución SST y se homogenizó con ayuda del vortex durante 20 seg. Después de 15minutos, se transfirió el sobrenadante a un tubo de vidrio sin perlas y se ajustó la turbidez a un MacFarland 2 (OD=0.5) con medio 7H9+OADC en un tubo de 50ml (Falcon) a un volumen

final de 30ml. Finalmente, se transfirió 1.8ml del tubo a 12 pozos de una placa de 24 pozos (Figura 11). Al día 4, se agregó 200 µl de agua (H2O) a los pozos controles y 200 µl de 8 mg/ml de PZA a los 6 pozos con tratamiento (Concentración. final: 800 ug/ml, 6.5 mM).

El registro de mediciones se hizo al día 0, 2, 4, 6, 8 y 10, post agregación de agua o Pirazinamida, de la siguiente manera: Se tomó 1 mL del pozo Control y del pozo Tratamiento al día 0 (de acuerdo con el día que corresponda), se centrifugó a 16 000 g por 10 min y el sobrenadante fue inactivado usando un termoblock (Eppendorf ThermoMixers) a 95°C por 30 min (Figura 11). Las muestras inactivadas fueron almacenadas a -20°C hasta su lectura en el ensayo de Wayne cuantitativo.

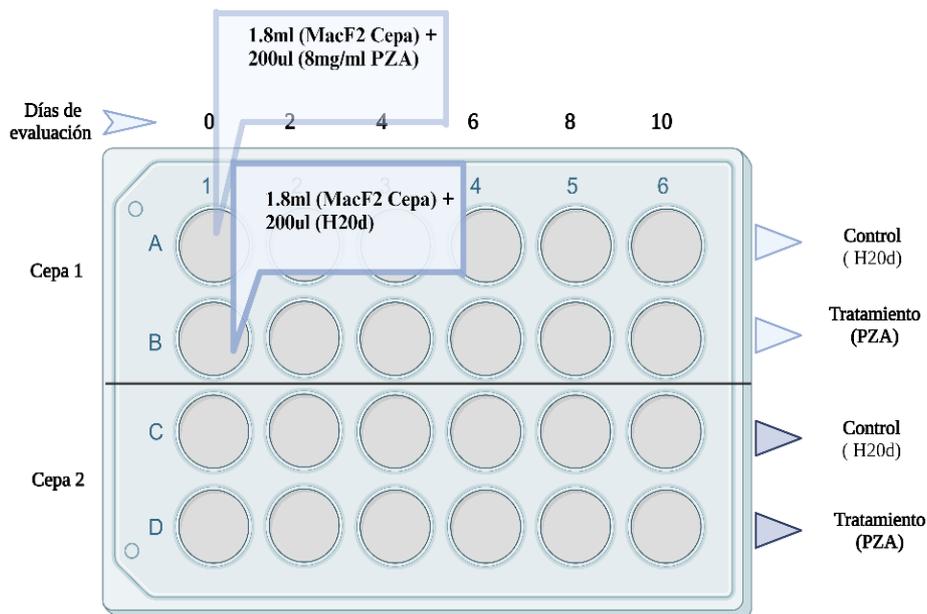


Figura 11. Esquema de trabajo para la evaluación de producción de POA de la cepa micobacteriana en una placa de MODS (24 pocillos).

El diagrama muestra el procedimiento para evaluar la producción de ácido pirazinoico (POA) de dos cepas micobacterianas en una placa de MODS de 24 pocillos. Cada tratamiento incluye un control (H2O) y un tratamiento con pirazinamida (PZA), con mediciones realizadas en varios días de evaluación (0, 2, 4, 6, 8, y 10).

7.5.3.4 Determinación del eflujo de POA

Para la determinación del flujo de POA se usó la reacción cuantitativa de Wayne, donde se procesaron los sobrenadantes colectados del día 0 al día 10. La reacción se basó en agregar en un tubo de 1.5ml 400 μ l del sobrenadante almacenado a -20 °C y 40 μ l de SAF 10%. Posteriormente, se centrifugó el tubo de reacción durante 5 minutos a 14,000 rpm, se dispensaron 100 μ l del sobrenadante por triplicado en una placa de 96 pozos y se realizó la lectura en un lector de placas (ER-500, SINNOVA) a 450 nm. De esta manera se procesaron todos los sobrenadantes que pertenecieron a una repetición. Los ensayos se realizaron por triplicado.

Los datos de densidad óptica (OD) obtenidos se corrigieron restando los valores de OD de las mediciones de los datos control por cada día. Los valores en mM de POA se obtuvieron reemplazando los valores de OD del tratamiento, corregidos, en la curva estándar.

Curva estándar de POA

La curva estándar se elaboró a partir de un stock de POA de 10 mM suspendido en el sobrenadante de cultivo de H37Rv (previamente esterilizado utilizando filtros de 0.22 μ m en un área de bioseguridad nivel 3 (BSL3)), generando 14 puntos de evaluación (0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 mM de POA) en un volumen de 400 μ l cada uno. Se agregaron 40 μ l de SAF al 10%, se centrifugó y se midió por triplicado utilizando un lector de placas a 450 nm (Figura 12).

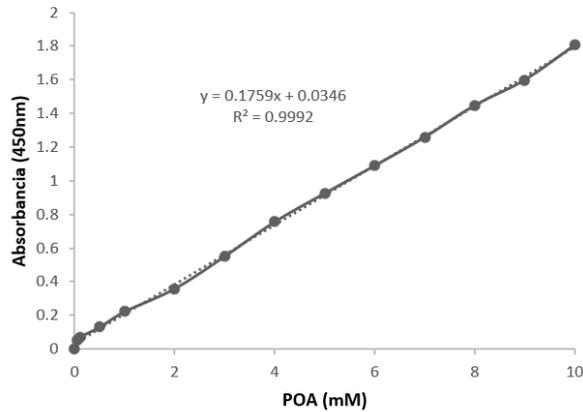


Figura 12. Curva estándar de POA en sobrenadante de cultivo de H37Rv vs Absorbancia a 450nm

La gráfica muestra la relación lineal entre la concentración de POA (mM) y la absorbancia a 450 nm. Cada punto representa el promedio de tres réplicas, indicando un excelente ajuste de los datos

7.5.3.5 Determinación de la susceptibilidad a PZA

Para determinar la concentración mínima inhibitoria (CIM) de la droga PZA para cada una de las cepas H37Rv generadas, se utilizó el método TEMA. Se evaluaron las cepas frente a dos compuestos de referencia: POA (compuesto activo de PZA) e isoniacida (control positivo bactericida).

Se utilizó la cepa en medio agar 7H10, cultivada durante 3 a 4 semanas. Se inocularon 2 asadas de la cepa en un tubo de vidrio con 4 a 5 beads y 100 µl de tween 80 al 10%. La mezcla se agitó vigorosamente en un vortex durante 2 minutos y se dejó reposar 5 minutos. Luego, se añadieron 3 ml de solución salina tamponada (SST) y se agitó brevemente en el vortex durante 30 segundos. La muestra se dejó en reposo durante 15 a 20 minutos. Después, se transfirió el sobrenadante, excluyendo los beads, a un nuevo

tubo de vidrio. La turbidez se ajustó a McFarland #1 usando SST. Para lograr una dilución 1/25, se combinaron 7.2 ml de medio 7H9 con 0.3 ml de la cepa ajustada a McFarland #1 en un tubo Falcon, homogeneizando la mezcla.

La dilución de las drogas y la inoculación de la cepa se realizaron según el protocolo establecido. Inicialmente, se llenaron los pozos de los bordes con 200 µl de agua destilada para mantener la humedad durante la incubación. Luego, se agregaron 100 µl de medio 7H9+ADC en las columnas 3 a 11 y desde las filas B a G. Además, se añadieron 100 µl de las drogas en concentración 2x en las columnas 2 y 3, asignando cada fila a una droga diferente. Usando una multipipeta, se realizaron diluciones seriadas de las drogas, mezclándolas cinco veces, y transfiriendo 100 µl desde la columna 3 hasta la columna 10, eliminando el volumen sobrante para igualar todos los pozos a 100 µl. Luego, se añadieron 100 µl de la cepa diluida 1/25 a todos los pozos desde la columna 2 hasta la 11, siendo la columna 11 el control de crecimiento de la cepa, que contenía solo medio 7H9 y la cepa. La placa se incubó a 37°C (Figura 13).

En el quinto día de incubación, se agregaron 50 µl de la mezcla Tetrazolium-Tween al pozo B11, seguido de una incubación durante 24 horas. Al día siguiente, si se observaba un cambio de color de azul a amarillo, se añadía el colorante a todos los pozos, seguido de una nueva incubación de 24 horas. Si no se detectaba el cambio de color en el día 5, se coloreaba el siguiente pozo (C11) en el séptimo día. Este proceso se repetía en los días 9, 11, 13 y 15. Finalmente, la Concentración Inhibitoria Mínima (MIC) de la droga se determinaba en el pozo donde no se observaba el cambio de color, indicador crucial en la evaluación de la susceptibilidad de las cepas (Figura 13).

Interpretación de resultados:

Clasificamos las variantes de *M. tuberculosis* como susceptibles o resistentes según los valores de MIC reportados (72,73,74). Las cepas se definieron como resistentes si la MIC era mayor al valor reportado. Para la pirazinamida (PZA) ($\leq 50-100 \mu\text{g/ml}$), isoniacida (INH) ($\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ a $0.5 \mu\text{g/ml}$) y POA ($100 \mu\text{g/ml}$). Asimismo, los resultados fueron producto de 3 repeticiones

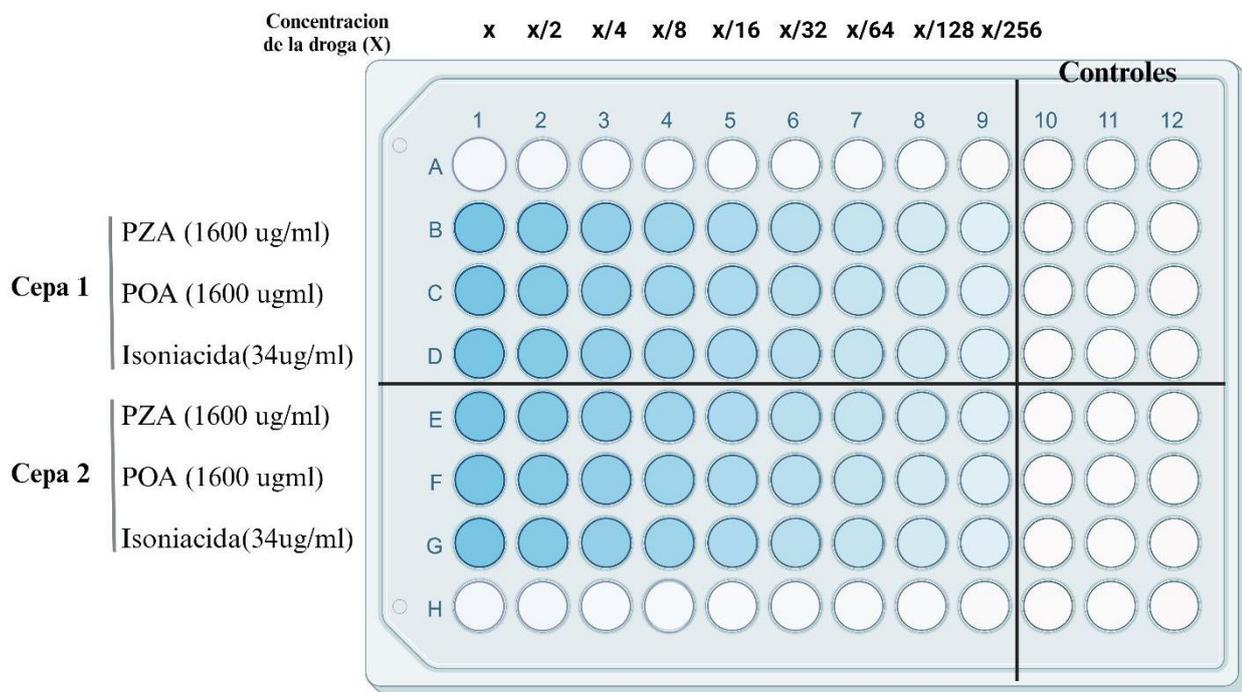


Figura 13. Esquema para determinar la susceptibilidad micobacteriana.

El esquema muestra el procedimiento para evaluar la susceptibilidad de dos cepas de Mycobacterium (Cepa 1 y Cepa 2) a las drogas pirazinamida (PZA), ácido pirazinoico (POA) e isoniacida en una placa de 96 pocillos utilizando el método TEMA
Fuente de diseño: Biorender

7.5.4 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los efectos del tratamiento (Rv2059 WT, Rv2059 Glu341Gly, Rv2059Val166Ile) sobre la actividad de PZAse-Apo se presentan como media \pm desviación estándar (DE). Los datos se analizaron mediante análisis de varianza (ANOVA) de una o dos vías para la comparación de múltiples grupos, utilizando GraphPad Prism 10.0.2. Se consideraron estadísticamente significativos los valores de p inferiores a 0,05.

El análisis del flujo de POA producido, evaluado en días, por las variantes de la cepa H37Rv se llevó a cabo utilizando un modelo de regresión lineal múltiple que incluye un término de interacción. El análisis estadístico se realizó con un nivel de significancia del 0,05 utilizando el paquete estadístico Stata 18.0 y graficado con el software GraphPad Prism 10.0.2

Los alineamientos se realizaron usando los softwares Geneius Prime 2023 y DNASTAR Navigator 17.

Los análisis estadísticos de los experimentos se realizaron utilizando tres replicas, asegurando así la significancia estadística de los resultados obtenidos.

7.5.5 CONSIDERACIONES ÉTICAS

El trabajo de tesis formó parte de un proyecto principal que se encuentra registrado en el sistema de SIDISI de la Universidad Peruana Cayetano Heredia con el siguiente código 204725 y nombre “Role of a metallochaperone in the mechanisms of action and resistance to pyrazinamide a in *Mycobacterium tuberculosis*”

La inscripción de este trabajo como tesis de maestría se realizó en el Sistema Descentralizado de Información y Seguimiento a la Investigación (SIDISI)- Dirección Universitaria de Investigación, Ciencia y Tecnología (DUICT) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia (UPCH). Posteriormente, fue evaluado por el Comité de Ética de la UPCH (CIE-UPCH) previamente a su ejecución.

VIII RESULTADOS

8.1 Selección de mutación en el gen Rv2059 usando un análisis bioinformático

La estructura más favorable del grupo superior mostró una distancia de 14.923 Å entre el centro de masa de los residuos de PZAse involucrados en la coordinación y el metal de la estructura de Rv2059. La estructura más favorable del otro grupo tenía una distancia de 15.969 Å entre los mismos puntos. Seleccionamos la estructura más favorable del grupo superior para el análisis siguiente, ya que su distancia es la más baja (Figura 14).

Curiosamente, el nitrógeno delta de His 57 está en proximidad cercana al átomo de zinc. Esto podría sugerir una posible interacción inicial en la que el residuo de histidina comienza a "atraer" al átomo de metal, desestabilizándolo de la esfera de coordinación de Rv2059 y atrayéndolo al sitio de unión de metal de PZAse. Esto se confirmará en simulaciones de dinámica molecular pendientes de 2 μ s del complejo.

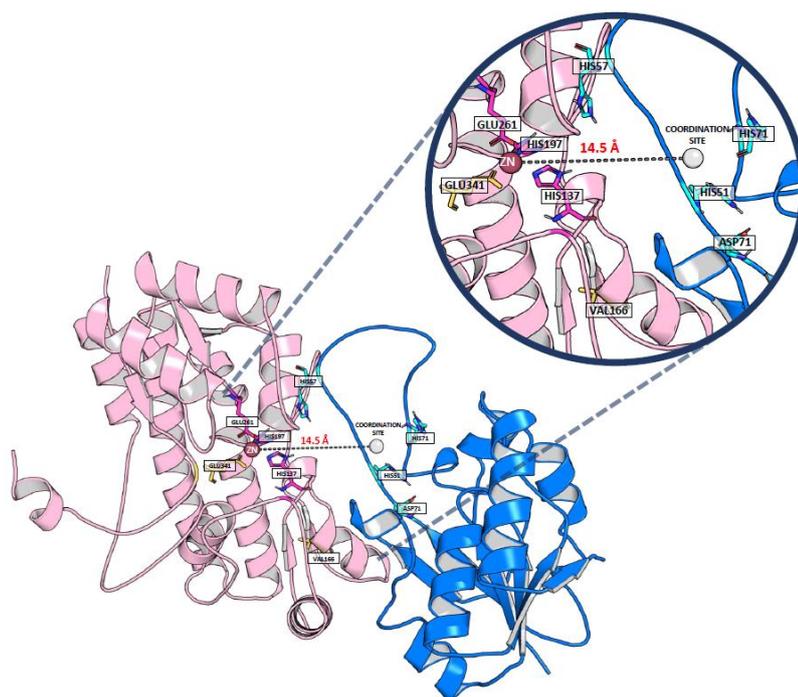


Figura 14. Dinámica molecular de la estructura más favorable entre Rv2059 y la enzima PZAsa.

Los residuos de coordinación de PZAsa (azul) se representan como varillas y sus átomos de carbono se muestran en cian. Los átomos que no son de carbono se colorearon siguiendo la convención CPK. El átomo de zinc se muestra como una esfera gris. El centro de masa de los residuos involucrados en la coordinación del metal en PZAsa se representa como una esfera blanca. Rv2059 (rosa) muestra los aminoácidos que presentan la mutación seleccionada Glu341Gly y Val166Ile (amarillo).

Una vez generado el modelo, se insertaron las 16 mutaciones registradas. En la tabla inferior (Tabla 4) se muestra el doble delta de G de cada una de ellas y en base a la energía más negativa que nos indica que esa mutación genera una reducción entre la interacción PZAsa Rv2059 se seleccionó Glu341Gly. Asimismo, esta mutante constituye uno de los aminoácidos que conforma la triada de coordinación de Rv2059 para el ion Zinc. Por otro lado, el número de frecuencia en la base de datos es menor por lo que se esperaría que el impacto sea mayor. Además, el cambio de un aminoácido sin carga a uno con carga genera la repulsión (en discusión comparar con la mutación en

PZAsa)

Tabla 4. Resumen de mutaciones registradas en la metalochaperona Rv2059.

RESUMEN DE MUTACIONES EN RV2059	N° de repeticiones	Uniprot: Rv2059 (O07257)	
		ΔG	$\Delta\Delta G$
Ala187Val (gcc/gTc)	1	-5.01	-0.19
Ala309Thr (gcg/Acg)	1	-4.80	0.01
Ala354Ser (gct/Tct)	1	-4.92	-0.10
Asn226Asn (aac/aaT)	1	-4.91	-0.09
Asp192Ala (gac/gCc)	8	-5.65	-0.83
Gln177Arg (cag/cGg)	9	-4.91	-0.10
<u>Glu341Gly (gag/gGg)</u>	1	-6.01	<u>-1.19</u>
Gly175Ser (ggt/Agt)	1	-4.95	-0.13
Leu185Phe (ctc/Ttc)	199	-5.07	-0.26
Ser183Ser (tcg/tcT)	2	-4.93	-0.11
Thr317Lys (aca/aAa)	313	-4.83	-0.01
Thr347Thr (acc/acT)	1	-4.82	0.00
<u>Val166Ile (gtc/Atc)</u>	540	-4.88	<u>-0.07</u>
Val188Ala (gtg/gCg)	1	-5.15	-0.33
Val257Ala (gtc/gCc)	1	-4.82	0.00
Val88Val (gta/gtG)	1	-4.76	0.06
	1081		
PZAsa Wt /Rv2059Wt		-4.82	

La tabla muestra las mutaciones identificadas en la metalochaperona Rv2059, incluyendo el cambio de aminoácido, el número de repeticiones, y los valores de ΔG y $\Delta\Delta G$. Las mutaciones seleccionadas se encuentran subrayadas en plomo.

8.2 Ensayo con la proteína recombinante y Rv2059 nativa y mutantes y la enzima PZAsa

8.2.1 Estandarización de la expresión de la proteína recombinante Rv2059 nativa y mutantes.

La expresión de la proteína recombinante Rv2059 requirió de un proceso de estandarización, debido a que los parámetros estándares produjeron limitada expresión (Figura 15) que no tuvo éxito. Para ello, se evaluaron distintas células de expresión *Escherichia coli* (DE3, DE3 pLyss, Rosseta y Lemo), así como concentraciones de IPTG (0.1, 0.5, 0.7 y 1mM), temperatura (37°C, 30°C, 14°C), medio de cultivo (LB, LB suplementado con glucosa al 0.5, 1 y 3 y 5%, medio TB), proporción de volumen cultivo/ cantidad de oxígeno disponible en el matraz (1/4 y 1/10), OD600 de inducción (0.6-0.8 y 1.2) y tiempo de expresión (4 y 6h). Finalmente se obtuvo una adecuada expresión de la proteína nativa Rv2059 bajo condiciones de IPTG 1mM y 4h de inducción a un OD de 1.2 utilizando como medio de cultivo Terrific Broth (TB) Figura (16), Figura (17).

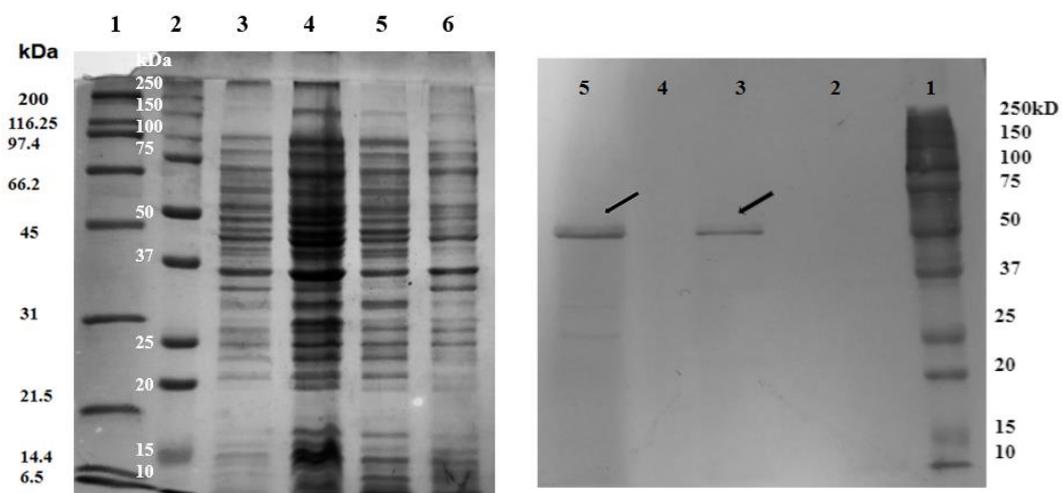


Figura 15. Expresión de la proteína Rv2059 en *E. coli* (DE3) pLysS a condiciones estándares.

La imagen de la izquierda es el resultado SDS-PAGE 12% 1. Marcador Broad Range 2. Marcador Dual color 3. Fracción no inducida 4. Fracción inducida *E. coli* DE3 pLysS, OD=0.6-0.8, 1mM IPTG, 37°C, 4h 5. Fracción soluble 6. Fracción insoluble. La imagen de la derecha es el resultado del ensayo de Western Blot de las mismas muestras 1. Marcador Dual color 2. Fracción no inducida 3. Fracción inducida (extracto crudo) 4. Fracción soluble 5. Fracción insoluble. 6. Control positivo (PZA_{sa}-Mtb).

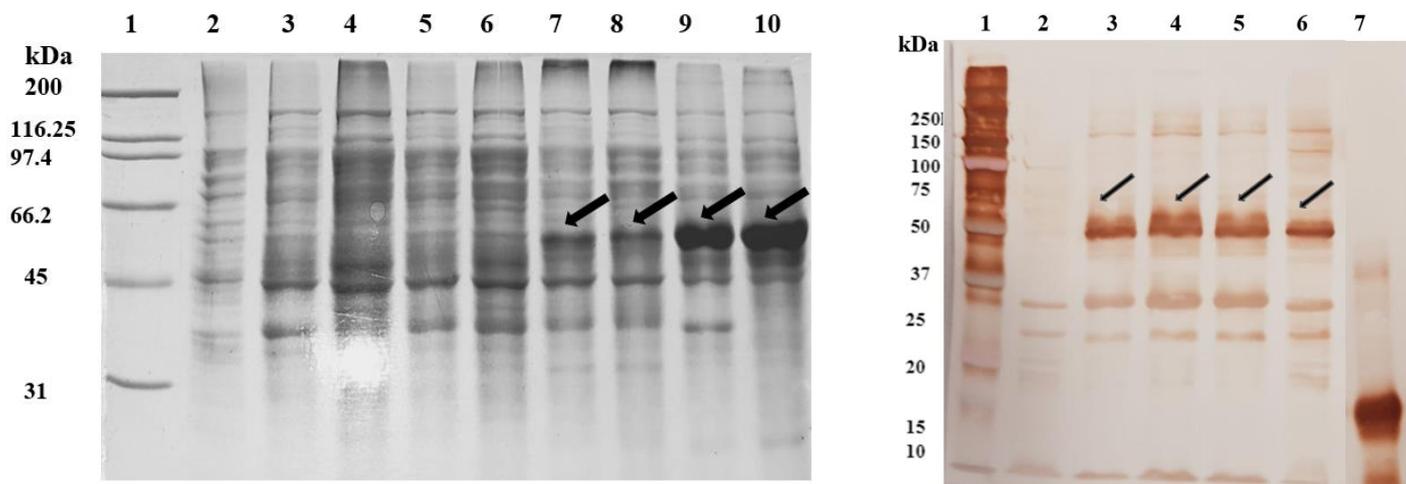


Figura 16. Resumen de estandarización de la expresión de Rv2059 nativa.

A la izquierda, resultado de SDS-PAGE de distintas condiciones de expresión detalladas en el inferior. A la derecha, evaluación confirmatoria por Western Blot de la presencia de Rv2059 en las 4 condiciones que permitieron visualizar a la proteína en el SDS-PAGE. Peso molecular Rv2059: 48kDa

1. Marcador Broad range
2. Fracción no inducida
3. Fracción inducida insoluble *E. coli* LEMO DE3, caldo LB, IPTG 1mM, OD600=0.6-0.8
4. Fracción inducida insoluble *E. coli* LEMO DE3, caldo TB, IPTG 1mM OD600=1.2
5. Fracción inducida insoluble *E. coli* Rosseta, caldo LB, caldo LB, IPTG 1uM, OD600=0.6-0.8
6. Fracción inducida insoluble *E. coli* Rosseta, caldo TB, caldo LB, IPTG 1uM, OD600=1.2
7. Fracción inducida insoluble *E. coli* (DE3), caldo LB, IPTG 1mM OD600=1.2
8. Fracción inducida insoluble *E. coli* (DE3)pLyss, caldo TB, 5h, IPTG 1mM OD600= 1.2
9. Fracción inducida insoluble *E. coli* (DE3) PLyS, caldo TB, 6h, IPTG 1mM, OD600=1.2

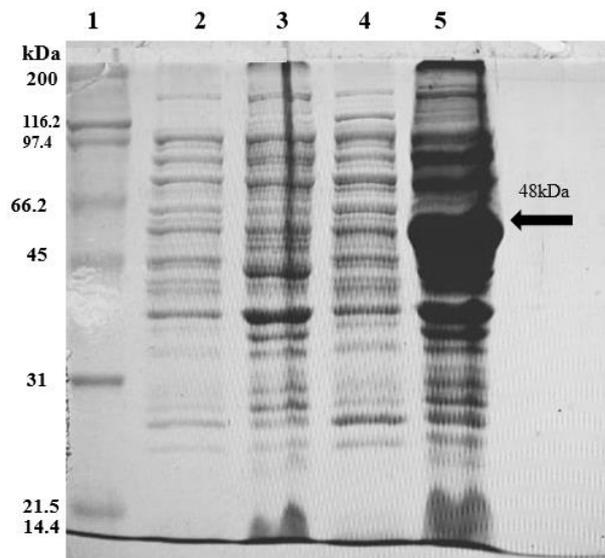


Figura 17. Expresión estandarizada de la proteína recombinante Rv2059 nativa.

La flecha en negro señala a la proteína de interés presente en el carril 5 **1.** Marcador Broad range **2.** Fracción no inducida soluble **3.** Fracción no inducida insoluble **4.** Fracción inducida soluble **5.** Fracción inducida insoluble.

8.2.2 Solubilización y replegamiento de la proteína recombinante Rv2059 nativa.

La expresión de la proteína Rv2059 nativa mostró que esta es insoluble, por lo cual se aplicó una metodología de solubilización y replegamiento. El paso 7 de este protocolo detallado en la metodología que implica el tiempo de incubación, tipo de movimiento y los tiempos en vortex fueron estandarizados (Figura 18), obteniendo una mayor recuperación de la proteína Rv2059 en la fracción soluble y con menos presencia de otras proteínas a 10h, en movimiento 3D a temperatura ambiente s (Figura 18 B, carril 4).

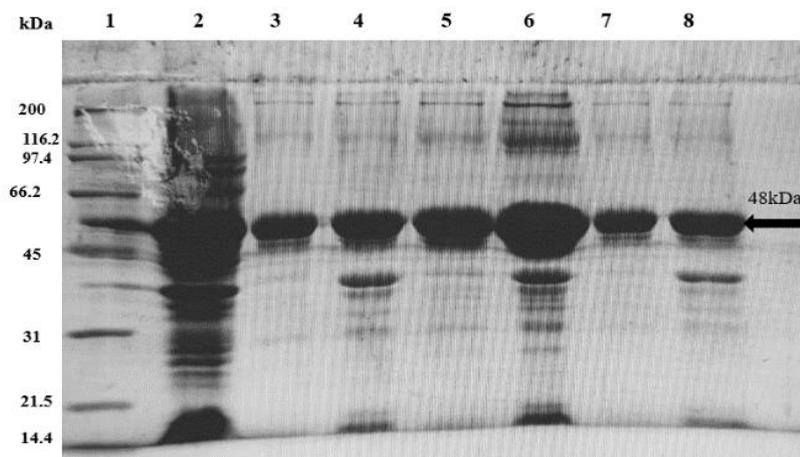


Figura 18. Electroforesis de la estandarización de la solubilización de la proteína Rv2059 nativa.

1. Marcador Broad range. El pellet en buffer de solubilización fue expuesta a diferentes condiciones para la liberación de la proteína Rv2059 a la fracción soluble: **2.** 1h incubación en shaker 3D, vortex cada hora. **3.** 3h de incubación en shaker automatico 3D. **4.** 5h incubación en shaker 3D, vortex cada hora. **5.** 10h de incubación en shaker automático 3D **6.** 5h de incubación en shaker automático 2D. **7.** 10h incubación en shaker 2D.

8.2.3 Cambio de buffer y concentración de la proteína Rv2059

La proteína renaturada en Buffer HEPES 50mM mediante el cambio de buffer por el Amicon Millipor 10kDa permitió eliminar residuales de Urea y componentes del buffer de refolding que podrían interferir en las reacciones posteriores con la proteína Rv2059. Asimismo, se concentró la solución hasta un volumen final de 2ml, dando como resultado final una concentración ~70ug/ml mediante la cuantificación por Bradford. (Figura 19).

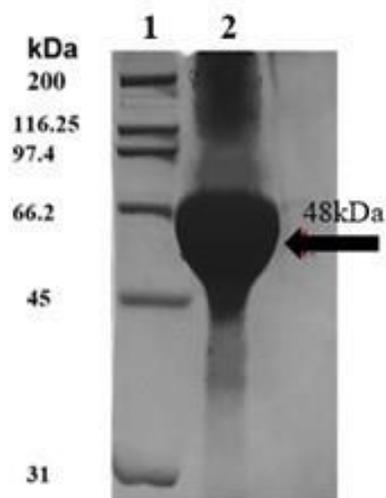


Figura 19. Concentración de la proteína recombinante Rv2059

Corrida electroforética de la proteína recombinante soluble Rv2059. 1. Marcador Broad range 2. proteína Rv2059 renaturada o refoldeada concentrada.

8.2.4 Ensayo de reactivación de la proteína recombinante PZAsa en presencia de la metalochaperona Rv2059 Wt/Glu341Gly/ Val166Ile

La PZAsa quelada (PZAsa-Apo) fue expuesta a un gradiente de concentraciones de la metalochaperona recombinante Rv2059 en las tres versiones trabajadas: Rv2059 Wt, Rv2059 Glu341Gly y Rv2059 Val166Ile. El proceso de quelación de la PZAsa redujo la actividad enzimática en un 73.86%. Mientras tanto, la actividad de la PZAsa Control Quelación (PZAsa-ControlQ) disminuyó un 12% debido a la exposición a la temperatura ambiente durante 18 horas (Figura 20) (Anexo 2).

La PZAsa recupera su actividad del 77.32% para Rv2059 Glu341Gly, 67.24% para Rv2059WT y 68.68% para Rv2059 Val 166Ile (Figura 20) (Ver Anexo 05). Asimismo, se observa que solo la metalochaperona sometida a tratamiento térmico y enzimático

reduce su actividad en un promedio de 21% para las tres versiones de la metalochaperona. Esto nos indica el tratamiento ha sido agresivo para reducir la actividad de Rv2059 hasta alcanzar un valor casi similar al de la PZAsa -Apo (27 %). Se debe considerar que los OD obtenidos en todas las reacciones han sido normalizados restándolos con el OD generado por la interacción de la PZAsa-Apo y el buffer donde se encontraba la metalochaperona. Esta normalización explicaría los valores por debajo de la PZAsa-Apo por parte de nuestros controles.

Es importante señalar que los controles (Rv2059Tx y Rv2059 DE) no fueron evaluados para todas las concentraciones, solo para las concentraciones 0.5uM y 1uM por el tiempo limitado del estudio y porque el mayor pico de reactivación se observó a 0.5uM de proteína recombinante (77.23% de reactivación) (Ver esquema completo en la Figura 20)

En este último grafico (Figura 20, B) no se observa una diferencia significativa entre la actividad enzimática mostrada por las 3 versiones de la metalochaperona Rv2059expuesta la PZAsa-Apo ($p>0.05$).

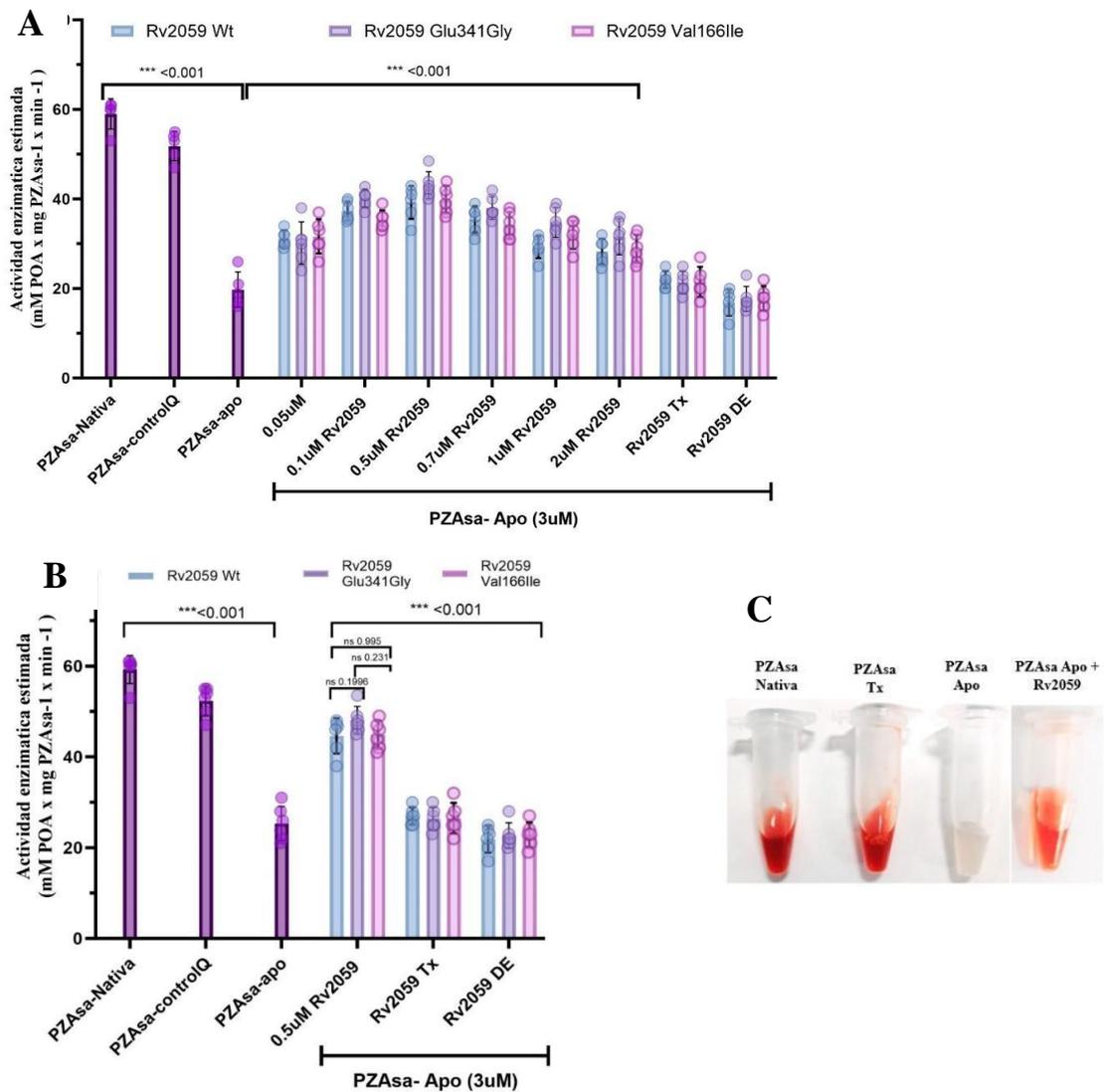


Figura 20. Reactivación de la proteína PZAsa-Apo en presencia de Rv2059 Wt, Glu341Gly y Val166Ile.

A. Actividad enzimática recuperada de la PZAsa-Apo frente a la metalochaperona Rv2059 Wt, Glu341Gly y Val166Ile en una gradiente de concentraciones (0.05, 0.1, 0.5, 0.7, 1 y 2 μ M). Actividad enzimática de la PZAsa-Apo frente a la metalochaperona sometida a tratamiento térmico (Rv2059 Tx) y digestión enzimática (Rv2059 DE). **B.** Reactivación de PZAsa-Apo en presencia de Rv2059 a una concentración de 0.5 μ M y **C.** Método de wayne cualitativo, muestra el grado de reactivación de la PZAsa-Apo frente a la metalochapeorna Rv2059 en su versión nativa y mutantes

8.3 Ensayo en la cepa H37Rv de *Mycobacterium tuberculosis*

8.3.1 Transformación del vector de recombinación pKM461

La Figura 21 muestra el crecimiento de las cepas H37Rv electroportadas con el plásmido pKM461 (KanR) en placas de 7H10 con kanamicina (Figura 20A) y los controles del proceso (control de agua y control de cepa), no crecieron en las placas de 7H10 con kanamicina (Figura 21C y 21E); y crecieron únicamente en las placas de 7H10 (Figura 21D y 21F). Los controles mostraron que las cepas aisladas en las placas con antibiótico corresponden a cepas de H37Rv que incorporaron el plásmido pKM461, y no corresponde a una posible contaminación durante el proceso de electroporación o contaminación en el agua PCR que se usó a diluir los plásmidos.

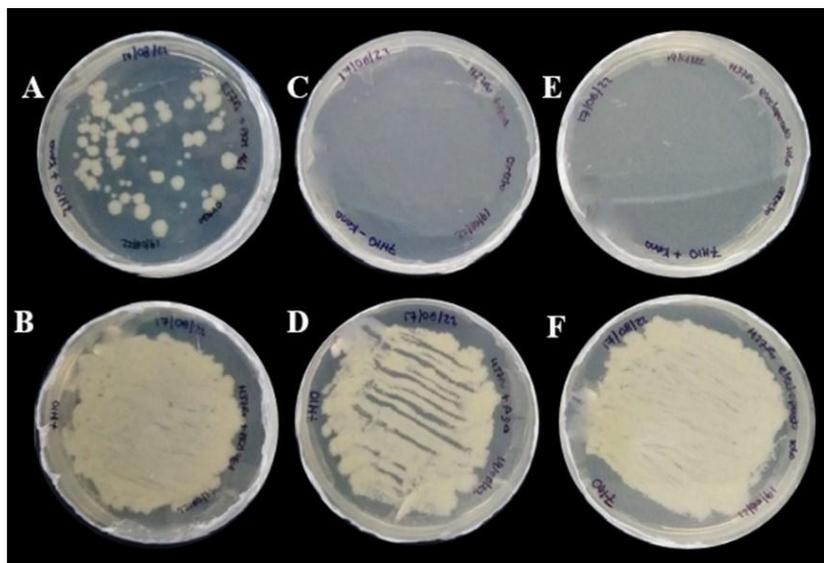


Figura 21: Transformación de *M. tuberculosis* H37Rv con el plásmido pKM461. A. H37Rv electroportado con el plásmido pKM461 sembrados en placas 7H10+Kanamicina. B. H37Rv electroportado con pKM461 sembrados en placas 7H10. C. H37Rv electroportado con agua PCR sembrados en placas 7H10+Kanamicina (control de agua). D. H37Rv electroportado con agua PCR sembrados en placas 7H10 (control de agua). E. H37Rv electroportado solo sembrados en placas 7H10+Kanamicina (control de cepa). F. H37Rv electroportado solo sembrados en placas 7H10 (control de cepa).

8.3.2 Electroporación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía

La Figura 22 y 23 muestra el crecimiento de las cepas H37Rv (pKM461-KanR) transformadas con el plásmido pKM464 (HygR) y el oligonucleótido guía en placas de 7H10 con kanamicina e hygromicina para todas las diluciones de siembra realizadas. Los controles del proceso fueron los esperados (control de oligo, control de agua y control de cepa), no crecieron en las placas de 7H10 con kanamicina e higromicina (Figura 22 A, C, E); y crecieron únicamente en las placas de 7H10 con kanamicina (Figura 22 B, D, F).

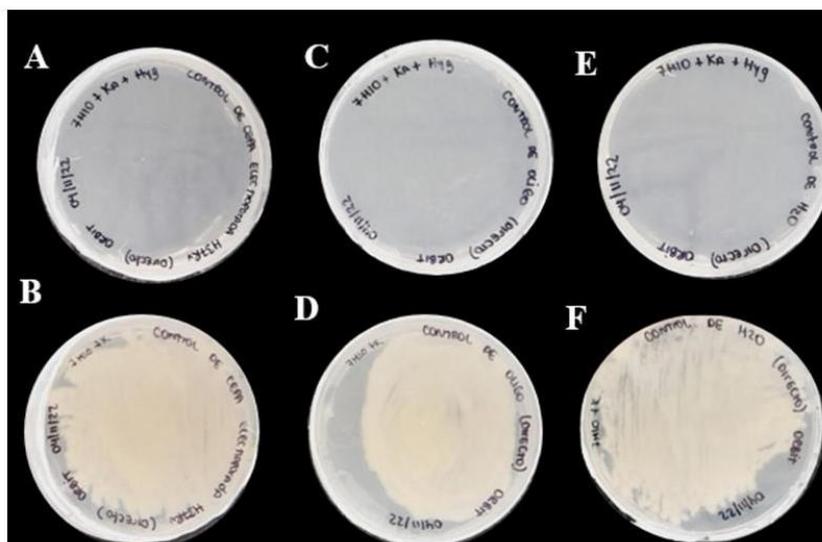


Figura 22. Controles del proceso de transformación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía Rv2059 en *M. tuberculosis*.

A. H37Rv (KanR) electroporado solo sembrados en placas 7H10+ Kanamicina+ higromicina (control de cepa). **B.** H37Rv (KanR) electroporado solo sembrados en placas 7H10+ Kanamicina. **C.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (control de oligo). **D.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina. **E.** H37Rv (KanR) electroporado con agua, utilizada para diluir los plásmidos, sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (control de agua). **F.** H37Rv (KanR) electroporado con agua sembrados en placas 7H10+ Kanamicina (control de agua).

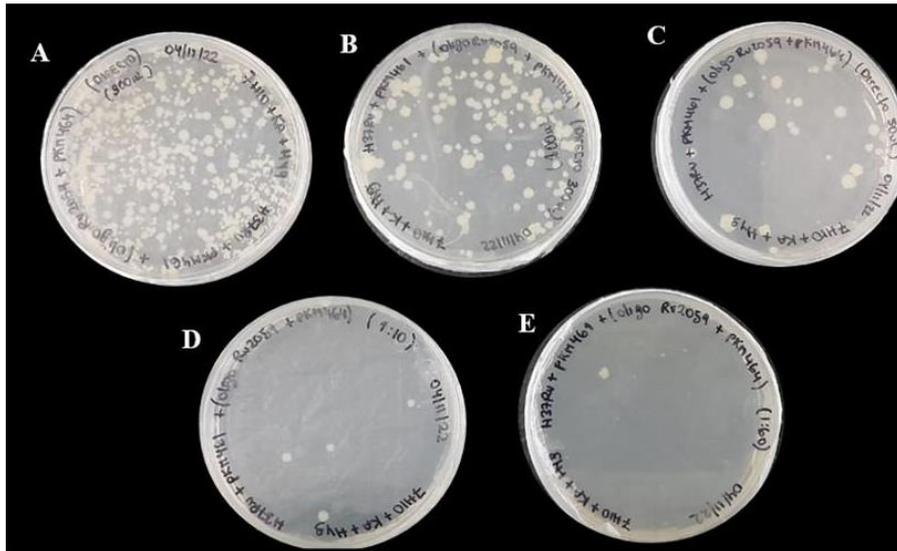


Figura 23: Transformación del vector de selección pKM464 y oligonucleótido guía Rv2059.

A. H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2059 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (300 µl directo). **B.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2059 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (100 µl directo). **C.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2059 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (100 µl directo). **D.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2059 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (1:10). **E.** H37Rv (KanR) electroporado con pKM464 + oligo Rv2059 sembrados en placas 7H10+ Kanamicina + Higromicina (1:60).

Estos controles nos sirvieron para garantizar que las colonias aisladas en placas con Kanamicina e Higromicina corresponden únicamente a las cepas KO del gen diana Rv2059 que lograron integrar el vector suicida pKM464 (HygR) en la ubicación del cromosoma donde se recombinó antes el oligonucleótido guía, el cual eliminó el gen diana. De acuerdo con ello, no se encontró crecimiento de cepas H37Rv (KanR) electroporadas solo con el plásmido pKM464 (control de oligo) en placas de 7H10 con kanamicina e higromicina (**Figura 22C**), contrario a lo que se evidenció en las placas de 7H10 con kanamicina (**Figura 22D**).

Por otro lado, se evaluó alguna posible contaminación durante el proceso de electroporación o contaminación en el agua PCR que se usó a diluir los plásmidos, cuyos resultados mostraron esterilidad (**Figuras 22E**).

8.3.3 Verificación del noqueo del gen *Rv2059* en *M. tuberculosis* mediante la técnica de PCR y secuenciamiento.

Se obtuvieron los productos de amplificación laterales: 478pb con los primers #1 y #2 y 1233pb con los primers #3 y #4. Asimismo, se logró amplificar el amplicón mayor correspondiente a 4004pb con los primers #1 y #2 (Figura 24 A). Los tamaños corresponden a los esperados por el diseño de nuestro **H37Rv: Constructo Rv2059 ORBIT** (Figura 24 B). Todos los productos de PCR mencionados fueron secuenciados y se muestran su alineamiento a continuación.

A



B

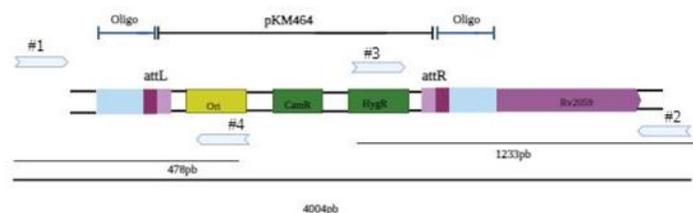


Figura 24. Corrida de electroforesis al 0.8% de los productos de PCR para verificar el noqueo del gen *Rv2059* en el genoma de *M. tuberculosis*.

A. Se muestra el resultado representativo del procesamiento de una muestra de ADN_g de la cepa recombinante H37Rv (pKM461) +oligonucleótido guía Rv2059 y plásmido pKM464 1 Producto de PCR con los primer #1 y #4 2. Producto de PCR con los primer #3 y #2 3. Producto de PCR con los primer #1 y 2#. **B.** Diseño del noqueo del gen Rv2059 en el genoma de *M. tuberculosis*. Plásmido pKM464 y oligonucleótido guía integrados.

Se usó como secuencia de referencia **H37Rv: Constructo Rv2059 ORBIT** para el alineamiento múltiple (MAFFT) (75) con los resultados de secuenciamiento realizados por la empresa pSOMAGEN. Se enviaron a secuenciar 5 amplicones en total. El amplicon generado por el juego de primers #1#4 y #3 y 2 para ambas colonias transformantes seleccionadas en hygromicina (H37Rv: Rv2059 KO). Asimismo, se intentó amplificar la secuencia con los primer #1 y #2, sin embargo, solo pudo lograrse para la colonia 2 en un momento.

Los amplicones generados por los primers #1y #4 empalman con la primera parte del constructo (478b) y los amplicones generados por los primers #2 y #3 (1233b) lo hacen con la zona final del constructo. Esto se observa para ambas colonias. Asimismo, se muestra que el amplicon de 4004b que solo se observó en el gel por única vez al momento de secuenciarlo solo leyó una secuencia de 907 bases y se empalma con la región central lateral derecha del constructo. Sin embargo, vemos que a pesar de no amplificar todo el fragmente la zona que empalma guarda similitud con el constructo. Estos resultados confirman la presencia de la secuencia H37Rv: ORBIT Rv2059 en las clonas donde se realizó el noqueo del gen Rv2059 (Figura 25). El resultado del secuenciamiento se muestra en el Anexo 06

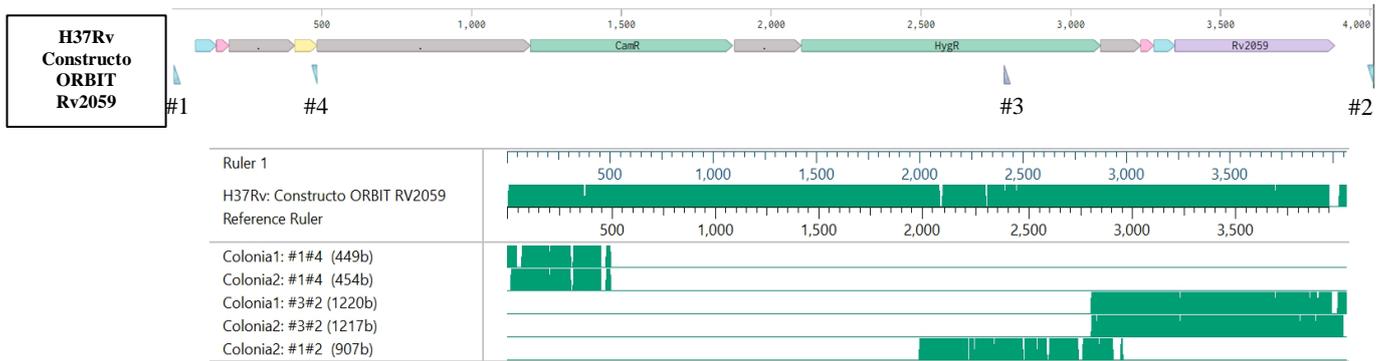


Figura 25. Verificación de la presencia del constructo ORBIT Rv2059 en la cepa H37Rv Rv2059 KO.

Se muestra una imagen del diseño del constructo H37Rv Constructo ORBIT Rv2059, con las zonas de reconocimiento de los dos pares de cebadores (1,2 y 3,4) diseñados para verificar la presencia de este en el genoma de *M. tuberculosis* a partir de las colonias transformadas. En la parte inferior, vemos una tabla de resultados de alineamiento, donde se usó el constructo como referencia. Las zonas verdes corresponden a las regiones conservadas en el constructo que se alinean correctamente con la secuencia proveniente de las colonias transformadas.

8.3.4 Transformación de la cepa H37Rv Rv2059 KO con el plásmido integrativo

PMV306hsp: Rv2059 Wt/Rv2059Glu341Gly /Val 166Ile

Previo a la transformación con el plásmido integrativo pMV306, con el fin de restaurar la actividad del gen Rv2059 Wt e introducir las versiones mutantes Rv2059Glu341Gly y Rv2059 Val 166Ile, se tuvo que curar la cepa H37Rv Rv2059 KO como se detalla en la figura 25. Para este proceso de curación elimino la resistencia de la cepa noqueada a la droga kanamicina, lo que permitió la transformación con el plásmido integrativo. Se verificó su presencia a nivel genómico mediante PCR, obteniendo un amplicón de 1861bp en base al diseño de primers que reconocen parte del plásmido y el gen Rv2059 (Figura 26).

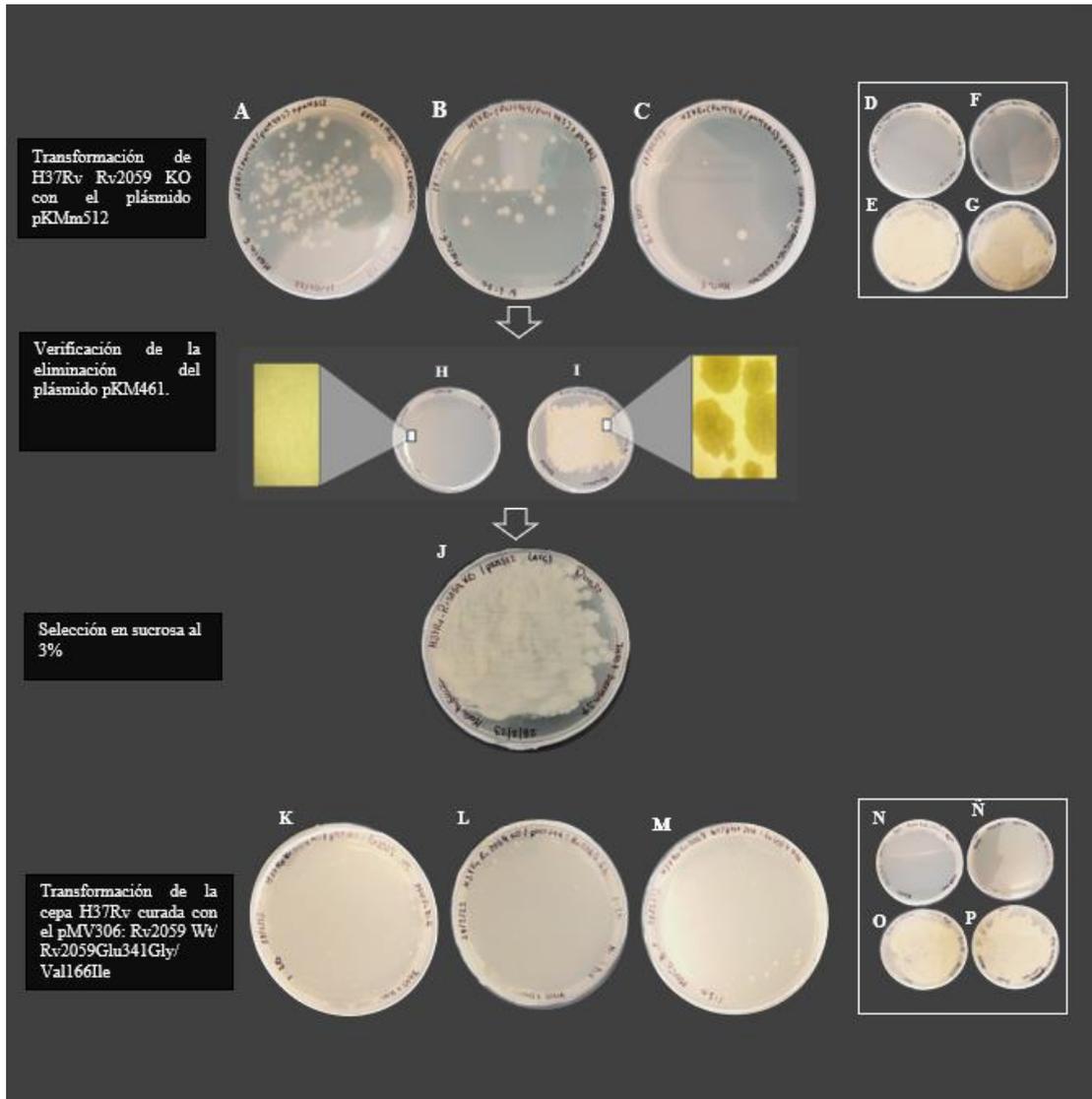


Figura 26. Proceso de eliminación o curación del plásmido pKM461 (Kan) en la cepa H37Rv Rv2059 KO.

La imagen muestra el proceso detallado de curación del plásmido pKM461 en la cepa *H37Rv Rv2059 KO*. (A-C) Transformación de la cepa con el plásmido pKM461. (D-F) Verificación de la eliminación del plásmido pKM461 mediante selección en medios adecuados. (G-I) Análisis de la eliminación del plásmido. (J) Selección en sacarosa al 3% para asegurar la eliminación del plásmido. (K-M) Transformación de la cepa curada con el plásmido pMV306 que expresa Rv2059 Wt, Rv2059 Glu341Gly, o Rv2059 Val166Ile. (N-P) Verificación final de la cepa transformada

Se verificó la integración del plásmido pMV306 mediante la amplificación por PCR de una región del plásmido (Figura 27-B, área sombreada), donde se confirmó el tamaño esperado de 1861 bp mediante una corrida electroforética (Figura 27-A). La información de la secuencia fue validada mediante secuenciamiento (Figura 28). Para observar el resultado del secuenciamiento completo, ver Anexo 07.)

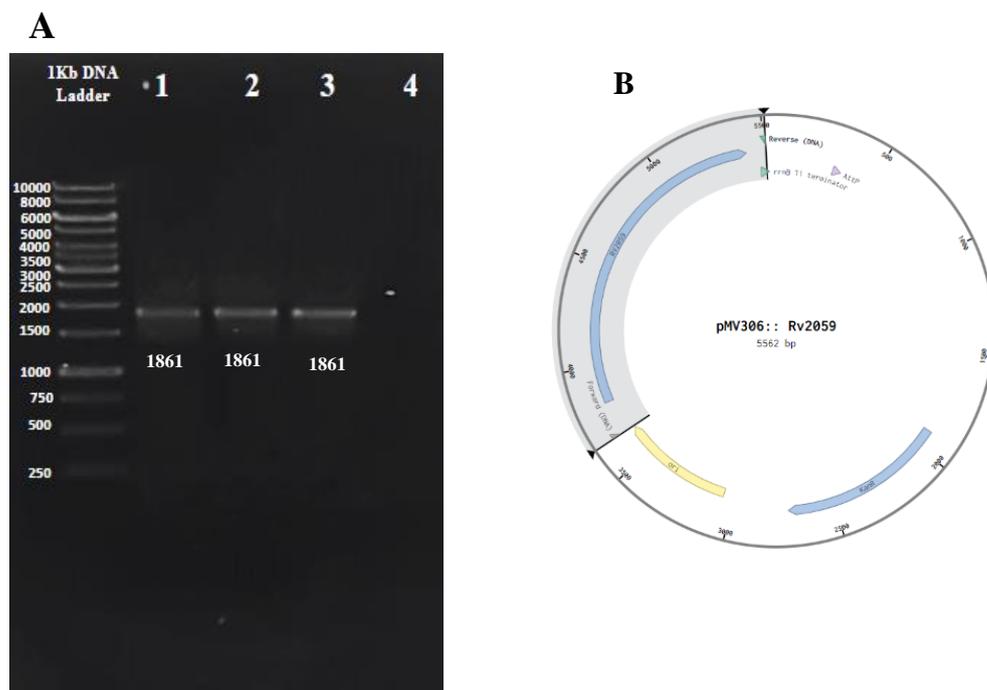


Figura 27. Verificación de la integración del plásmido pMV306: Rv2059 nativa, Glu341Gly y Val 166Ile mediante PCR.

A. Electroforesis del producto de PCR para las muestras provenientes del ADNg de la cepa 1. H37Rv: pMV306:Rv2059 Wt 2. H37Rv: pMV306:Rv2059 Glu341Gly 3. pMV306:Rv2059 Val166Ile y la 4. cepa H37Rv **B.** Representación gráfica del sitio de unión de los cebadores para el ensayo de PCR, mostrando una región que no se ve alterada al integrarse al genoma ya que está lejos del sitio de recombinación, los cuales generan un amplicón de 1861bp



Figura 28. Verificación de la integración del plásmido pMV306: Rv2059 nativa o Wt/ Glu341Gly/ Val166Ile en el genoma de *M. tuberculosis*.

El alineamiento de los resultados de secuenciación se realizó usando Clustal Omega.

8.3.5 Medición del eflujo de ácido pirazinoico (POA) en *Mycobacterium tuberculosis* Rv2059 KO complementada con el gen Rv2059 Wt, Glu341Gly y Rv2059Val166Ile.

La concentración de eflujo de POA se estimó a partir del ensayo de Wayne cuantitativo tomando como muestras el sobrenadante de cultivo de la cepa diana en los días 0, 2, 4, 6, 8 y 10 posteriores a la adición de la droga PZA (800 ug/ml) y agua como se detalla en apartado de metodología. Los valores normalizados fueron reemplazados en la ecuación de la recta (Figura 29) y observamos que el comportamiento de la producción de POA hasta el día 10 no es recta sino más bien una curva que llega a una posible meseta donde lo que indicaría que la droga se ha consumido por completo (Figura 29). Por lo que optamos por tomar los valores hasta el día 6 de medición, que es el punto hasta donde se observa un comportamiento más lineal y sería ese momento donde se observa mejor el consumo o metabolismo de la droga PZA y por ende el eflujo de POA. En base a este grafico (Figura 30), la cepa H37Rv:Rv2059 KO muestra una producción de POA menor a cepa de referencia (H37Rv) ($p < 0.001$) en base a las comparaciones de

pendientes. Asimismo, las variantes de la cepa, donde la actividad del gen Rv2059 fue restaurado mostraron un comportamiento H37Rv:Rv2059Glu341Gly ($p=0.001$), H37Rv:Rv2059 Val166Ile ($p=0.002$), siendo la cepa H37Rv: Rv2059 Wt la que guardo mayor similitud a la cepa de referencia, aunque no sea estadísticamente similar ($p=0.002$).

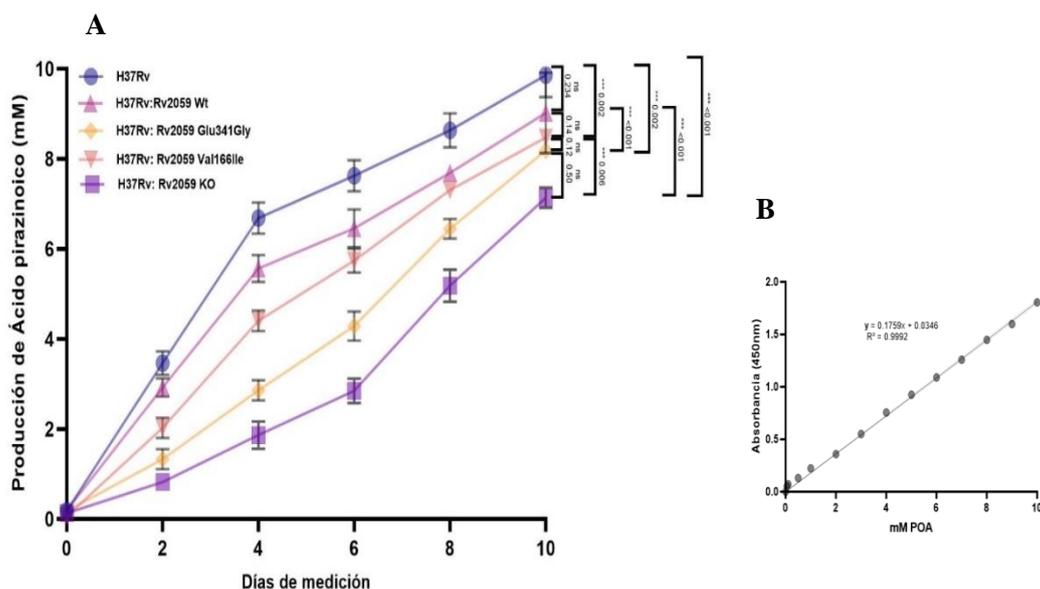


Figura 29. Eflujo de POA por la cepa H37Rv Rv2059 KO y sus variantes.

A. Producción de ácido pirazinoico por la cepa H37Rv Rv2059 KO y sus variantes complementadas con el plásmido integrativo pMV306hsp: Rv2059 Wt (H37Rv:Rv2059 Wt), Rv2059 Glu341Gly (H37Rv: Rv2059 Glu341Gly) y Rv2059 Val166Ile (H37Rv: Rv2059 Val166Ile) durante un período de 10 días. **B.** Curva estándar mMPOA versus Absorbancia a 450nm.

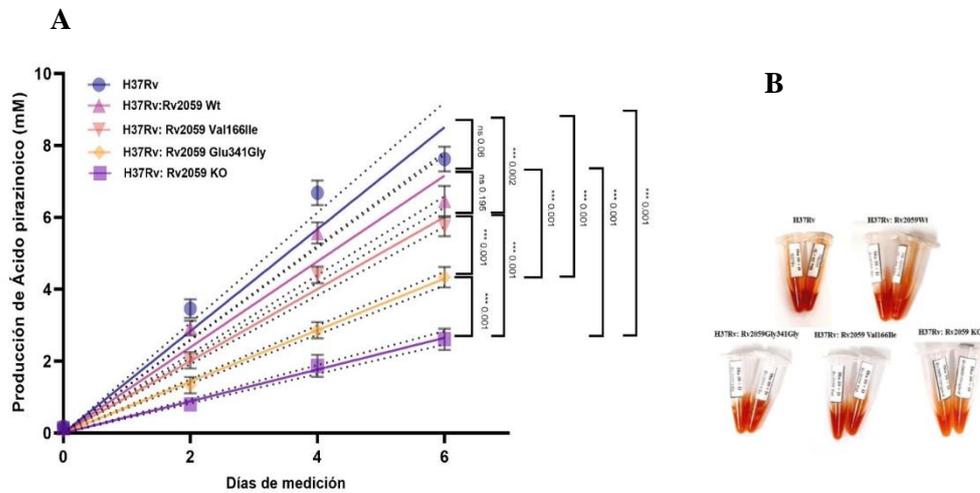


Figura 30. Eflujo de POA por la cepa H37Rv Rv2059 KO y sus variantes complementadas.

- A.** Se muestra la concentración de ácido pirazinoico producido por la cepa H37Rv Rv2059 KO y sus variantes complementadas con el plásmido integrativo Pmv306hsp: Rv2059 Wt (H37Rv:Rv2059 Wt), Rv2059 Glu341Gly (H37Rv: Rv2059 Glu341Gly) y Rv2059 Val166Ile (H37Rv: Rv2059 Val166Ile) durante los 6 días. **B.** Representación gráfica del Wayne cualitativo de las cepas evaluadas.

8.3.6 Evaluación la Sensibilidad a las Drogas por el ensayo de microplacas de tetrazolio

(TEMA)

Para evaluar la sensibilidad de las cepas generadas por ORBIT a la droga pirazinamida, utilizamos el método TEMA. Se muestra que la cepa H37Rv: Rv2059 KO presenta una CIM mayor al punto de corte ($\geq 50-100 \mu\text{g/ml}$), con una MIC de $200 \mu\text{g/ml}$. Esto significa que esta variante presenta resistencia a la droga PZA (Figura 310). Este resultado se respalda con la sensibilidad a la droga isoniacida (CIM $< 0.13 \mu\text{g/ml}$), con un punto de corte de $0.25-0.5 \mu\text{g/ml}$ y resistencia a POA como control positivo. Asimismo, H37Rv:Rv2059 Wt y las mutantes mostraron un comportamiento similar a la cepa de referencia H37Rv (sensibilidad para todas las drogas) (Figura 31). (72, 73, 74). Los resultados en las placas 96 pocillos se encuentran en el Anexo 08.

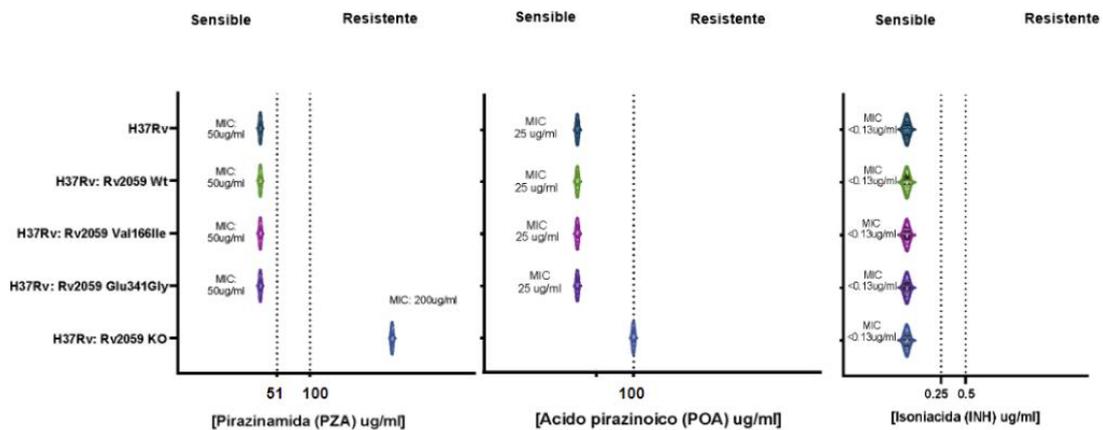


Figura 31. Evaluación de la sensibilidad antibiótica mediante TEMA.

Esquema cualitativo de dos opciones: sensible o resistente. Ambos campos están separados por el punto de corte o MIC de la droga (PZA, POA o INH) (líneas punteadas). Esto se muestra para cada una de las cepas H37Rv generadas en el experimento. Para la identificación de las cepas se conservó el mismo color y figura ovalada a lo largo del ensayo con las 3 drogas. Cabe mencionar que solo es una representación cualitativa simple donde el tamaño de la figura coloreada no tiene ningún valor cuantitativo.

IX. DISCUSIÓN

Este estudio se desarrolló en tres etapas. Primero, se analizó una base de datos del secuenciamiento de genomas de *Mycobacterium tuberculosis* para identificar mutaciones de interés en el gen Rv2059, encontrando Glu341Gly y Val166Ile. En la segunda etapa, basada en un ensayo de proteínas recombinantes, se estandarizó la expresión de la proteína recombinante Rv2059 Wt y las versiones mutantes Rv2059 Glu341Gly y Rv2059 Val166Ile, evaluando su capacidad para reactivar la metaloenzima PZAsa sin metales. Se verificó que estas metalochaperonas podían entregar metales a la metaloenzima; sin embargo, no se observó una diferencia significativa en el grado de reactivación entre las metalochaperonas mutantes.

Finalmente, se realizó un ensayo en el modelo de *M. tuberculosis*, eliminando el gen Rv2059 mediante la técnica ORBIT y complementándolo con un plásmido integrativo portando el gen Rv2059 Wt, Rv2059 Glu341Gly o Rv2059 Val166Ile de manera independiente. Las variantes resultantes de la cepa H37Rv se sometieron a mediciones de flujo de POA, observando que la cepa H37Rv sin el gen Rv2059 (H37Rv Rv2059 KO) presentaba un flujo de POA significativamente menor, correlacionándose con la resistencia a PZA en un ensayo de TEMA. La cepa con el gen Rv2059 Glu341Gly mostró un menor eflujo de POA en comparación con la cepa de referencia, mientras que la cepa con el gen Rv2059 Val166Ile mostró un eflujo similar al de la cepa de referencia. Sin embargo, las modificaciones en el gen no cambiaron la concentración mínima inhibitoria (MIC) de la cepa, obteniéndose valores iguales a los de la cepa control.

En una primera etapa, se analizó una base de datos con 3400 genomas secuenciados de aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis*. De las 21 mutaciones inicialmente identificadas, se excluyeron 6 por ser del tipo sinónimas. Posteriormente, se examinaron las 15 mutaciones restantes en la metalochaperona Rv2059 mediante dinámica molecular. Cada modelo de Rv2059 mutado se enfrentó a la proteína modelada PZAsa en un ensayo in silico. Para afinar la selección, se midió el delta de G, indicando la fuerza y afinidad de interacción (76).

Se eligió la mutación Glu341Gly debido a su impacto esperado en la interacción Rv2059-PZAsa. El cambio de glutamato (con carga negativa) a glicina (sin carga) en la posición 341 implica la pérdida de una carga negativa en la tríada de coordinación del Zn^{2+} . Esta modificación probablemente debilitaría la atracción electrostática entre el ion zinc y la metalochaperona Rv2059, disminuyendo su afinidad por el zinc. Este cambio podría interferir significativamente con la capacidad de la metalochaperona para entregar el zinc a la PZAsa, afectando su funcionalidad. Además, la carga neta de la tríada de coordinación es un factor importante en la estabilidad y la especificidad de la unión. Si se produce un cambio en la carga neta, podrían surgir alteraciones en la estructura tridimensional de la proteína, lo que también podría afectar su capacidad para coordinar el zinc de manera eficiente. La posición de la mutación, según nuestro modelo de dinámica molecular y la colaboración de nuestro grupo bioinformático, se ubicaba estratégicamente cerca del sitio de unión con la proteína PZAsa. Su frecuencia de aparición es baja (1/3400 muestras), lo que indicaría que este aminoácido tiene un papel importante dado que la investigación ha demostrado que las mutaciones en aminoácidos con un papel crucial en la función de las proteínas son inusuales debido a la

autopreservación del código genético que impide cambios perturbadores (76). Además, la selección natural favorece las sustituciones de aminoácidos que mantienen la conformación original de la proteína (77).

Adicionalmente, la posición de la mutación nos llevó a suponer un impacto potencial en la función proteica, lo que la convertía en una elección pertinente para investigar cómo las mutaciones podrían alterar la función de una metalochaperona en el mecanismo de activación del fármaco PZA. Al evaluar los resultados del doble delta G ($\Delta\Delta G$) generados por el programa FoldX, se observó que la proteína Rv2059 Glu341Gly mostraba una mayor afinidad por la enzima PZAsa ($\Delta\Delta G$: -1.19). La presencia de un doble delta G negativo en una dinámica molecular sugiere que, a pesar de la mutación y la esperada reducción de la carga neta, el proceso de unión entre la metalochaperona mutada y la proteína receptora es más favorable desde el punto de vista termodinámico (78). Esto podría ser el resultado de otros cambios en la estructura o interacciones intraproteicas que compensen la pérdida de la carga negativa. Es importante destacar que las dinámicas moleculares son simulaciones computacionales y, aunque pueden proporcionar información valiosa, también presentan limitaciones (78,79). Por consiguiente, decidimos basarnos en la predicción considerando el cambio de base, la posición, la función y la frecuencia de aparición de la mutación.

La segunda mutación seleccionada, Val166Ile en la proteína Rv2059, se fundamenta en minimizar el impacto en su función. Este cambio específico de aminoácido se seleccionó debido a su conservación dentro de la misma familia, respaldada por su alta frecuencia en la base de datos (540/3400) y una afectación mínima en la estabilidad, como lo indica

el doble delta de G de la interacción con PZAsa ($\Delta\Delta G$: -0.007). La preferencia por aminoácidos similares se basa en la observación de que la frecuencia de sustituciones disminuye con diferencias fisicoquímicas crecientes. Este enfoque se alinea con lo comentado por Ramenskii (2000) (80), quien respalda la noción de que solo una pequeña fracción de las mutaciones produce cambios significativos en la conformación de las proteínas, y Pollock (2012) (81) agrega que las propensiones de los aminoácidos pueden cambiar con el tiempo, haciendo más aceptables a aminoácidos similares. Estos hallazgos sugieren que cambiar un aminoácido por otro de la misma familia y carga es menos probable que afecte la estructura y función de la proteína en comparación con mutaciones que involucran aminoácidos de familias diferentes.

Una vez seleccionadas ambas mutaciones, se procedió con el ensayo de proteínas recombinantes. La producción de la proteína recombinante Rv2059 soluble representó un desafío para nuestro grupo. En esta tesis, se reporta la estandarización de la expresión y refoldado de esta proteína insoluble bajo condiciones de IPTG 1 mM, 4 horas de inducción a una DO de 1.2, utilizando medio de cultivo TB, conocido por su riqueza en nutrientes y capacidad de amortiguación. La expresión de proteínas recombinantes a una densidad óptica (OD) tan alta es inusual, ya que generalmente se asocia con la fase logarítmica de crecimiento bacteriano, donde hay alta actividad metabólica y rápida división celular (82). Esta proteína recombinante podría ser tóxica para la célula huésped, debido a que las proteínas que se unen a metales forman complejos de alta afinidad con metales pesados y metaloides, lo que conduce a un mal plegamiento y agregación proteica (83).

Los resultados *in vitro* confirmaron que esta metalochaperona tiene la capacidad de reactivar a la enzima PZAsa-Apo (4). Se observó que el comportamiento de la reactivación tiene forma de campana (Figura 19), con un punto máximo de reactivación de la proteína PZAsa o producción de POA y luego reduce como si la proteína se saturara. De acuerdo con la bibliografía revisada a medida que aumenta la concentración del activador, la actividad enzimática también aumenta, pero solo hasta un punto máximo (84). Después de este punto, la enzima está completamente saturada con el activador, por lo que agregar más PZA no aumentará la actividad enzimática porque podría estar induciéndose cambios conformacionales en la enzima que la hacen menos eficiente (85).

Seleccionamos la concentración de 0.5 μM μM para las metalochaperonas porque mostró la mayor activación enzimática de la pirazinamidasasa quelada (Figura 20 A-B). Este punto de concentración óptima fue crucial ya que permitió demostrar el máximo potencial de reactivación de las metalochaperonas, es decir, su capacidad máxima para restaurar la actividad enzimática de la pirazinamidasasa bajo nuestras condiciones experimentales. Identificar y trabajar con la concentración que proporciona la mayor actividad enzimática optimizó los resultados experimentales, facilitando una comparación clara y significativa entre las metalochaperonas mutantes (Glu341Gly y Val166Ile) y la versión Wt (86) (87). Además, evitamos utilizar concentraciones menores que podrían no proporcionar suficiente activación de la enzima PZAsa, lo que podría introducir variabilidad y afectar la precisión del estudio.

Las metalochaperonas a una concentración de 0.5 μ M demostraron una reactivación de la enzima PZAsa-Apo mayor que la reportada previamente por Sheen et al. (66). Esto podría atribuirse a la cantidad limitada y pureza superior de la metalochaperona obtenida de GenScript, lo que fue una limitante para nosotros. Sin embargo, el porcentaje de reactivación por la metalochaperona Rv2059 inactivada por calor (Rv2059 Tx) y enzimáticamente (Rv2059 DE) es similar al de la actividad de la PZAsa-Apo sin adición de metalochaperonas. Esto confirma que las metalochaperonas están reactivando la enzima. Las mutantes Glu341Gly y Val166Ile muestran pequeñas diferencias en la producción de POA, que no son significativamente diferentes, aunque el doble delta de G indica una mayor afinidad de la mutante Glu341Gly. Sin embargo, la diferencia entre ellas parece no ser significativa.

Las condiciones a nivel *in vitro* tratan de imitar lo sucedido en el modelo de *M. tuberculosis*; no obstante, en la práctica existen retos como variaciones en la manipulación, los tipos de reactivos y las concentraciones, que pueden no ser medidas con exactitud cuando los equipos no tienen la calibración actualizada o debido a las propias limitaciones de las técnicas de medición. Este último punto constituye una limitante, dado que los ensayos de reactivación de la enzima PZAsa quelada se llevaron a cabo usando 3 μ M de PZAsa-Apo frente a un gradiente de concentración de proteína recombinante Rv2059, y todas ellas fueron medidas por un ensayo de Bradford. Sin embargo, este ensayo cuantitativo se basa en la variación de color o reacción colorimétrica, que depende de qué tan homogeneizada esté la muestra y si la proteína está 100% soluble, ya que el cambio de color es proporcional a la cantidad de proteína

que se une al tinte y reacciona con los grupos amino, basado en una reacción colorimétrica con el tinte Coomassie Azul Brillante G-250.

Con el reporte del ensayo in vitro y considerando las limitantes, se escaló la propuesta a un modelo de *M. tuberculosis* utilizando la técnica ORBIT para eliminar el gen Rv2059. Nuestro diseño del oligonucleótido guía afectó solo el 64.8% de la secuencia completa del gen Rv2059, ya que parte de la secuencia downstream correspondía al marco de lectura del gen Rv2060, una posible proteína de membrana integral conservada de 133 aminoácidos (NCBI: NP_216576.1). La proteína Rv2059 es una supuesta transportadora ABC de zinc, según el TBDB. A partir de esa edición, se restauró el gen Rv2059 mediante la integración del plásmido pMV306, que contenía la versión nativa del gen Rv2059 y las versiones mutantes Rv2059 Glu341Gly y Val166Ile. El crecimiento de las cepas mutantes fue similar al de la cepa Wt y no presentaron ninguna variación fenotípica, lo que confirma lo reportado previamente por Minnato (2019) (88).

Estas cepas se utilizaron para realizar dos evaluaciones. La primera se centró en la medición del eflujo de ácido pirazinoico (POA) en un cultivo líquido de las cepas mencionadas. Se recolectó el sobrenadante del cultivo cada dos días durante 10 días, incorporando la droga PZA al día cero. PZA es una prodroga que, en presencia de la enzima PZAsa en el citoplasma de *M. tuberculosis*, se convierte en POA y es expulsada al medio extracelular. Se midió cuantitativamente el POA producido utilizando la técnica de Wayne cuantitativa. Los resultados mostraron una diferencia notable en el eflujo de POA durante los primeros 6 días, reduciéndose al día 8 y 10 por saturación de POA en el medio. Por ello, se trabajó y discutió basándose en los primeros 6 días. Se

observó una reducción significativa del eflujo de POA en la cepa H37Rv KO ($p=0.001$) comparada con la cepa H37Rv, así como en la cepa H37Rv Glu341Gly y en menor medida en la mutante H37Rv Val166Ile. Esto sugiere que la ausencia de esta metalochaperona está involucrada en la entrega de metales a PZAsa, en el balance de metales intracelulares o afectando otros sistemas. La segunda hipótesis se plantea porque PZAsa es capaz de tomar iones del medio y se considera una enzima promiscua, activada por más de un metal, aunque el zinc es el metal con mayor afinidad (19).

La reducción del eflujo de POA por parte de la cepa mutante H37Rv Glu341Gly puede explicarse por la pérdida del grupo carboxilo del ácido glutámico, esencial para formar complejos estables con metales y para facilitar la unión y estabilidad de iones como el zinc. En contraste, la glicina, debido a su simplicidad estructural, carece de una capacidad de coordinación comparable, lo que resulta en una menor afinidad por los metales y afecta la función de la proteína PZAsa (89).

La segunda evaluación se centró en determinar la sensibilidad de las cepas de *M. tuberculosis* generadas mediante el sistema ORBIT hacia la pirazinamida (PZA) en un cultivo líquido (TEMA). Debido a que la actividad de la PZA se manifiesta en condiciones de pH ácido, los ensayos de susceptibilidad se realizaron a pH 6.2. Entre las cepas analizadas, únicamente H37Rv KO exhibió resistencia a la PZA (MIC=200 $\mu\text{g/ml}$), definida por un punto de corte de ≤ 50 $\mu\text{g/ml}$ a 100 $\mu\text{g/ml}$, según la referencia (72). Además, esta cepa mostró una reducción significativa del eflujo de POA durante los primeros 6 días de medición. Recordando que el eflujo de POA causa la letalidad de la micobacteria, se correlaciona con la resistencia a la PZA.

Utilizamos como control positivo el cultivo con POA, dado que este compuesto activo no requiere de la presencia de PZAsa para eliminar la micobacteria. La literatura previa trabajó con una concentración superior a 100 $\mu\text{g/ml}$ como punto de corte, por lo que nos ajustamos a este valor para clasificarlo como resistente leve (73). Nuestro control negativo consistió en el cultivo con isoniacida, cuyo punto de corte es muy bajo, de $\leq 0.25 \mu\text{g/ml}$ a $0.5 \mu\text{g/ml}$ (74). Las cepas con metalochaperonas mutantes no mostraron diferencias en sensibilidad a las drogas en comparación con la cepa Wt; incluso la mutante H37Rv Glu341Gly no mostró cambios en su susceptibilidad. Esto indica que las mutaciones en esta metalochaperona no afectan la susceptibilidad, y la reducción en el eflujo de POA para esta mutante podría ser compensada por otros sistemas de entrega de metales o la propia enzima PZAsa debido a su promiscuidad metálica.

Nuestros hallazgos demuestran que, aunque las mutaciones específicas en Rv2059 (Glu341Gly y Val166Ile) no alteran significativamente la capacidad de la metalochaperona para reactivar la metaloenzima PZAsa, la eliminación del gen Rv2059 aumenta notablemente la resistencia a la PZA y reduce el flujo de POA. Esto subraya la importancia crítica de la metalochaperona Rv2059 en la activación de la PZA y sugiere la presencia de mecanismos compensatorios en la bacteria que podrían mitigar los efectos de mutaciones puntuales en este gen. Estos resultados no solo amplían nuestra comprensión de los mecanismos moleculares subyacentes a la resistencia a los fármacos en la tuberculosis, sino que también abren caminos para futuras investigaciones

enfocadas en identificar y caracterizar otros factores involucrados en este fenómeno, lo que podría llevar al desarrollo de estrategias terapéuticas más efectivas.

X. LIMITACIONES

- Para la selección de mutantes se utilizó una base de datos de 3400 genomas secuenciados. Sin embargo, esta base de datos no presentaba información específica sobre la resistencia a la droga pirazinamida (PZA). El enfoque del presente estudio se centró en evaluar el efecto de las mutaciones en Rv2059 y su relación con la actividad de la enzima pirazinamidasa (PZAsa). Sin embargo, hubiera sido interesante y valioso conocer si esas mutaciones estuvieran presentes en una cepa resistente a PZA sin mutaciones en el gen *pncA*.
- No se logró obtener una proteína de alta pureza para los ensayos de proteínas recombinantes, lo que pudo haber afectado los resultados de los experimentos.
- No se pudo realizar un secuenciamiento completo del genoma para evaluar posibles alteraciones adicionales causadas por la integración del sistema ORBIT, lo cual será necesario abordar en futuras investigaciones y publicaciones.

XI. CONCLUSIÓN

- Se identificaron y seleccionaron dos mutaciones en el gen Rv2059: Glu341Gly y Val166Ile. Estas mutaciones fueron elegidas por su potencial para alterar la interacción entre la proteína Rv2059 y la enzima pirazinamidasa (PZAsa) de *M. tuberculosis*.
- Los ensayos con proteínas recombinantes confirmaron que la proteína Rv2059 nativa (wild type) podía reactivar la pirazinamidasa desprovista de metales (PZAsa-Apo). Sin embargo, las mutaciones Glu341Gly y Val166Ile en Rv2059 no mostraron diferencias significativas en la capacidad de reactivar la PZAsa en comparación con la proteína nativa.
- La eliminación del gen Rv2059 en *M. tuberculosis* resultó en resistencia a PZA y una reducción significativa en el eflujo de ácido pirazinoico (POA) en comparación con la cepa de referencia H37Rv ($p < 0.001$). Las mutaciones Glu341Gly y Val166Ile en Rv2059 modificaron el eflujo de POA ($p = 0.001$ y $p = 0.002$ respectivamente), pero no alteraron significativamente la concentración mínima inhibitoria (MIC) de PZA en comparación con la cepa de referencia H37Rv (MIC: 50 $\mu\text{g/ml}$).

XII. BIBLIOGRAFÍA

1. Delogu G, Sali M, Fadda G. The Biology of Mycobacterium Tuberculosis Infection. *Mediterr J Hematol Infect Dis*. 16 de noviembre de 2013;5 . Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3867229/>.
2. Saunders G, McFadden J. *Molecular Biology of Mycobacterium tuberculosis*. 2003; 2:97- 111
3. Steele M, Des Prez R. The role of pyrazinamide in *M. tuberculosis* chemotherapy. 1988. doi:10.1378/chest.94.4.845.
4. Sheen P, Monsalve A, Campos J, Huerta R, etl. Metallochaperones Are Needed for *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* Nicotinamidase-Pyrazinamidase. 2020. doi: 10.1128/JB.00331-19 29
5. *Mycobacterium Tuberculosis Protocols* - Google Libros. Disponible en: https://books.google.com.pe/books?id=uGLFmjprNzUC&printsec=frontcover&hl=es&source=gbs_ge_summary_r&cad=0#v=onepage&q&f=false
6. Organización Mundial de la Salud. *Global TB report 2020*. 2020.
7. Mitchison DA. The action of antituberculosis drugs in short-course chemotherapy. 1985. doi:10.1016/0041-3879(85)90040-6.
8. Hatfull GF, Jr WRJ. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. American Society for Microbiology Press; 2014. 1474 p.
10. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: a review. 2003.
11. Zimic M, Loli S, etl. A New Approach for Pyrazinamide Susceptibility Testing in *Mycobacterium tuberculosis*. 2012. DOI: 10.1089/mdr.2011.0207
12. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Fuentes P, Grandjean L, Zimic M, Loli

- S. *pncA* gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 2013. doi:10.1016/j.
13. Cheng SJ, Thibert L, Sanchez T, Heifets L, Zhang Y. *pncA* mutations as a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: spread of a monoresistant strain in Quebec, Canada. . 2000. doi:10.1128/aac.44.3.528-532.2000.
 14. Hirano K, Takahashi M, Kazumi Y, Fukasawa Y, Abe C. Mutation in *pncA* is a major mechanism of pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 1998. doi:10.1016/S0962-8479(98)80004-X.
 15. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim S-H. Crystal structure and mechanism of catalysis of pyrazinamide from *Pyrococcus horikoshii*. 2001. *Biochemistry* 40:14166– 14172.
 16. Fyfe PK, Rao VA, Zemla A, Cameron S, Hunter WN. Specificity and mechanism of *Acinetobacter baumannii* nicotinamidase: implications for activation of the front-line tuberculosis drug pyrazinamide. 2009. doi:10.1002/anie.
 17. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamide of *Mycobacterium tuberculosis*: insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PloS One*. 2011;6(1): e15785.
 18. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, Zhang Y, Zhang XE. Characterization of *Mycobacterium tuberculosis* nicotinamidase/pyrazinamidase. 2008 doi:10.1111/j.1742-4658.2007.06241. x.
 19. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, Sotelo J, Evangelista W, Fuentes P, Rueda D, Flores M, Olivera P, Solis J, Pesaresi A, Lamba

- D, Zimic M. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase. 2012. doi:10.4269/ajtmh.2012.10-0565.
20. Salinas K, Aguayo P, Risco J, etl. Metal-Ion Effects on the Polarization of Metal-Bound Water and Infrared Vibrational Modes of the Coordinated Metal Center of *Mycobacterium tuberculosis* Pyrazinamidase via Quantum Mechanical Calculations. 2014.doi: 10.1021/jp504096d
 21. Tamames, B.; Sousa, S. F.; Tamames, J.; Fernandes, P. A.; Ramos, M. Analysis of zinc-ligand bond lengths in metalloproteins: Trends and patterns Proteins: Struct., Funct., Bioinf. 2007, 69 (3) 466– 475
 22. Sols A, Marco R. Concentrations of metabolites and binding sites. Implications in metabolic regulation. 1970. doi:10.1016/B978-0-12-152802-7.50013-X.
 23. Wang D, Hurst TK, Thompson RB, Fierke CA. Genetically encoded ratiometric biosensors to measure intracellular exchangeable zinc in Escherichia coli. 2011. doi:10.1117/1.3613926.
 24. Ma Z, Jacobsen FE, Giedroc DP. Coordination chemistry of bacterial metal transport and sensing. 2009. DOI: 10.1021/cr900077w.
 25. Ammendola S, Pasquali P, Pistoia C, Petrucci P, Petrarca P, Rotilio G, Battistoni A.. Sistema de absorción de Zn²⁺ de alta afinidad ZnuABC es necesario para la homeostasis bacteriana del zinc en entornos intracelulares y contribuye a la virulencia de Salmonella enterica. 2007. doi: 10.1128 / IAI.00559-07.
 26. Chandra BR, Yogavel M, Sharma A. El análisis estructural de la proteína de unión a zinc periplásmica de la familia ABC proporciona nuevos conocimientos sobre el mecanismo de captación y liberación de ligandos.2007. doi: 10.1016 /

j.jmb.2007.01.041.

27. Maciag A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Provvedi R, Pasca MR, Smith I, Palù G, Riccardi G, Manganelli R. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. 2007. doi:10.1128/JB.01190-06.
28. Lee Y-H, Dorwart MR, Hazlett KRO, Deka RK, Norgard MV, Radolf JD, Hasemann CA. The crystal structure of Zn (II)-free *Treponema pallidum* TroA, a Periplasmic metal-binding protein, reveals a closed conformation. 2002. doi:10.1128/jb.184.8.2300-2304.2002.
29. Argentaro, A., Yang, J.-C., Chapman, L., Kowalczyk, M. S., Gibbons, R. J., Higgs, D. R., Neuhaus, D., & Rhodes, D. (2007). Structural consequences of disease-causing mutations in the ATRX-DNMT3-DNMT3L (ADD) domain of the chromatin-associated protein ATRX. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(29), 11939–11944. <https://doi.org/10.1073/pnas.0704057104>
30. Matsumoto, Y., & Jasanoff, A. (2014). Metalloprotein-based MRI probes. *FEBS Letters*, 587(8), 1021–1029. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2013.01.044>
31. Raynaud C, Lanéelle M-A, Senaratne RH, Draper P, Lanéelle G, Daffé M. Mechanisms of pyrazinamide resistance in mycobacteria: the importance of lack of uptake in addition to lack of pyrazinamidase activity. *Microbiology*. 1999;145(6):1359-67.
32. Miotto P, Cirillo DM, Migliori GB. Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: Molecular Mechanisms Challenging Fluoroquinolones and Pyrazinamide Effectiveness. *Chest*. 1 de Abril de 2015;147(4):1135-43.
33. Sun Z, Scorpio A, Zhang Y. The pncA gene from naturally pyrazinamide-resistant *Mycobacterium avium* encodes pyrazinamide and confers pyrazinamide susceptibility

- to resistant *M. tuberculosis* complex organisms. *Microbiology*. 1997;143(10):3367-73.
34. Pires D, Valente E, Simões MF, Carmo N, Testa B, Constantino L, et al. Esters of Pyrazinoic Acid Are Active against Pyrazinamide-Resistant Strains of *Mycobacterium tuberculosis* and Other Naturally Resistant Mycobacteria In Vitro and Ex Vivo within Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015;59(12):7693-9.
 35. Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell* . 2005 ;16(1):396–404. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15525680/>
 36. Yuan S, Chan HCS, Hu Z. Using PyMOL as a platform for computational drug design. *Wiley Interdiscip Rev Comput Mol Sci* . 2017;7(2). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1002/wcms.1298>
 37. Ambrosetti F, Jandova Z, Bonvin AMJJ. Information-driven antibody–antigen modelling with HADDOCK. *Computer-Aided Antibody Design*. New York, NY: Springer US; 2023. p. 267–82.
 38. Wayne LG. 1974. Simple pyrazinamide and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis* 109:147–151
 39. Meinzen C, Proaño A, Gilman RH, Caviedes L, Coronel J, Zimic M, et al. A quantitative adaptation of the Wayne test for pyrazinamide resistance. *Tuberculosis (Edinb)* .2016;99:41–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27450003/>
 40. Murphy K, Nelson S, Nambi S, et al. ORBIT: a New Paradigm for Genetic Engineering of Mycobacterial Chromosomes. 2018
 41. Liu K, Lin G-H, Liu K, Liu Y-J, Tao X-Y, Gao B, et al. Multiplexed site-specific

- genome engineering in *Mycobacterium neoaurum* by Att/Int system. *Synth Syst Biotechnol.* 2022 ;7(3):1002–11. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.synbio.2022.05.006>.
42. Andreu N, Zelmer A, Fletcher T, Elkington PT, Ward TH, Ripoll J, et al. Optimisation of bioluminescent reporters for use with mycobacteria. *PLoS One.* 2010;5(5):e10777. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20520722/>
43. Gabrielson J, Kühn I, Colque-Navarro P, Hart M, Iversen A, McKenzie D, et al. Microplate-based microbial assay for risk assessment and (eco)toxic fingerprinting of chemicals. *Anal Chim Acta* . 2003;485(1):121–30. Disponible en: [http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670\(03\)00404-5](http://dx.doi.org/10.1016/s0003-2670(03)00404-5)
44. Caviedes L, Delgado J, Gilman RH. Tetrazolium microplate assay as a rapid and inexpensive colorimetric method for determination of antibiotic susceptibility of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Clin Microbiol* . 2002 ;40(5):1873–4. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/jcm.40.5.1873-1874.2002>
45. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, et al. The FoldX web server: an online force field. 2015. DOI: 10.1093/nar/gki387 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15980494/>
46. Webb B, Sali A. Protein structure modeling with MODELLER. 2005. DOI: 10.1007/978-1-4939-0366-5_1
47. Gydo C, Zundert V, Bonvin A. Modeling protein-protein complexes using the HADDOCK webserver "modeling protein complexes with HADDOCK". 2014. DOI: 10.1007/978-1-4939-0366-5_12
48. Yudith C. Estandarización de una técnica de complementación del gen *pncA* en *Mycobacterium tuberculosis pncA*-knockout: herramienta para el estudio de la relación

- entre mutaciones en pnca y parámetros fenotípicos. Repositorio UPCH. 2019
49. Palmer I, Paul T. Preparation and Extraction of Insoluble (Inclusion-Body) Proteins from *Escherichia coli*. *Curr Protoc Protein Sci*. 2004 November ; CHAPTER: Unit–6.3. doi:10.1002/0471140864.ps0603s38.
 50. Schrödinger, L., & DeLano, W. (2020). PyMOL.
 51. Anandakrishnan R, Aguilar B, Onufriev A. H++ 3.0: automating pK prediction and the preparation of biomolecular structures for atomistic molecular modeling and simulations. 2012. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394296/>
 52. Abraham J, Murtola T, Schulz R, et al. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. 2015. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2352711015000059>
 53. IQMOL <http://iqmol.org/>
 54. Frisch, M.J. et al. Gaussian 09, Revision A. http://www.gaussian.com/g_tech/g_ur/m_citation.htm (Gaussian, 2009)
 55. Hohenberg P, Kohn W. Inhomogeneous Electron Gas. *Phys Rev*. 1964;136(3B):B864–71. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1103/physrev.136.b864>
 56. Becke AD. Density-functional exchange-energy approximation with correct asymptotic behavior. *Phys Rev A Gen Phys*. 1988;38(6):3098–100. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1103/physreva.38.3098>
 57. Becke AD. Density-functional thermochemistry. IV. A new dynamical correlation functional and implications for exact-exchange mixing. *J Chem Phys*. 1996;104(3):1040–6. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.470829>
 58. Lee C, Yang W, Parr RG. Development of the Colle-Salvetti correlation-energy formula

- into a functional of the electron density. *Phys Rev B Condens Matter*. 1988;37(2):785–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1103/physrevb.37.785>
59. Dolg M, Wedig U, Stoll H, Preuss H. Energy-adjusted ab initio pseudopotentials for the first row transition elements. *J Chem Phys* . 1987;86(2):866–72. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.452288>
60. Hehre WJ, Stewart RF, Pople JA. Self-consistent molecular-orbital methods. I. use of Gaussian expansions of Slater-type atomic orbitals. *J Chem Phys*. 1969;51(6):2657–64. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.1672392>
61. Grimme S, Antony J, Ehrlich S, Krieg H. A consistent and accurate ab initio parametrization of density functional dispersion correction (DFT-D) for the 94 elements H-Pu. *J Chem Phys*. 2010;132(15):154104. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1063/1.3382344>
62. Kenneth M, Merz Jr. MCPB.py: A Python Based Metal Center Parameter Builder. *J. Chem. Inf. Model*. 2016, 56, 4, 599–604. <https://doi.org/10.1021/acs.jcim.5b00674>
63. Sousa S, Fernandes P, Ramos M. Parameters for Molecular Dynamics Simulations of Manganese-Containing Metalloproteins. *J. Chem. Theory Comput*. 2013, 9, 6, 2718–2732. <https://doi.org/10.1021/ct400055v>
64. Salinas-Salazar K, Aguayo P, Risco J, et al. Metal-ion effects on the polarization of metal-bound water and infrared vibrational modes of the coordinated metal center of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase via quantum mechanical calculations. 2014 Aug 28;118(34):10065-75. doi: 10.1021/jp504096d. Epub 2014 Aug 13.
65. Dominguez, R. Boelens, A.M.J.J. Bonvin, HADDOCK: a protein-protein docking approach based on biochemical or biophysical information, *J. Am. Chem. Soc.* 125

- (2003) 1731–1737
66. Sheen P, Monsalve A, Campos J, Huerta R, etl. Metallochaperones Are Needed for *Mycobacterium tuberculosis* and *Escherichia coli* Nicotinamidase-Pyrazinamidase. 2020. doi:10.1128/JB.00331-19
 67. Delgado J, Radusky L, Cianferoni D. FoldX 5.0: working with RNA, small molecules and a new graphical interface. *Bioinformatics*, Volume 35, Issue 20, 15 <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btz184>
 68. Andrej Sali . MODELLER A Program for Protein Structure Modeling Release 10.1, r12156
 69. Zimic M, Salgado M, Germán J. Low-cost 3D-printed inverted microscope to detect *Mycobacterium tuberculosis* in a MODS culture. 2021
 70. Murphy KC, Nelson SJ, Nambi S, Papavinasasundaram K, Baer CE, Sassetti CM. ORBIT: A new paradigm for genetic engineering of Mycobacterial chromosomes. *MBio* . 2018 ;9(6). Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1128/mbio.01467-18>
 71. Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, Ferrari E, Hoch JA. Cloning structural gene sacB, which codes for exoenzyme levansucrase of *Bacillus subtilis*: expression of the gene in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1983 ;153(3):1424–31. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6402497/>
 72. Werngren, J., Sturegård, E., Juréen, P., Ängeby, K., Hoffner, S., & Schön, T. (2012). Reevaluation of the critical concentration for drug susceptibility testing of *Mycobacterium tuberculosis* against Pyrazinamide using wild-type MIC distributions and pncA gene sequencing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56(3), 1253–1257. <https://doi.org/10.1128/aac.05894-11>

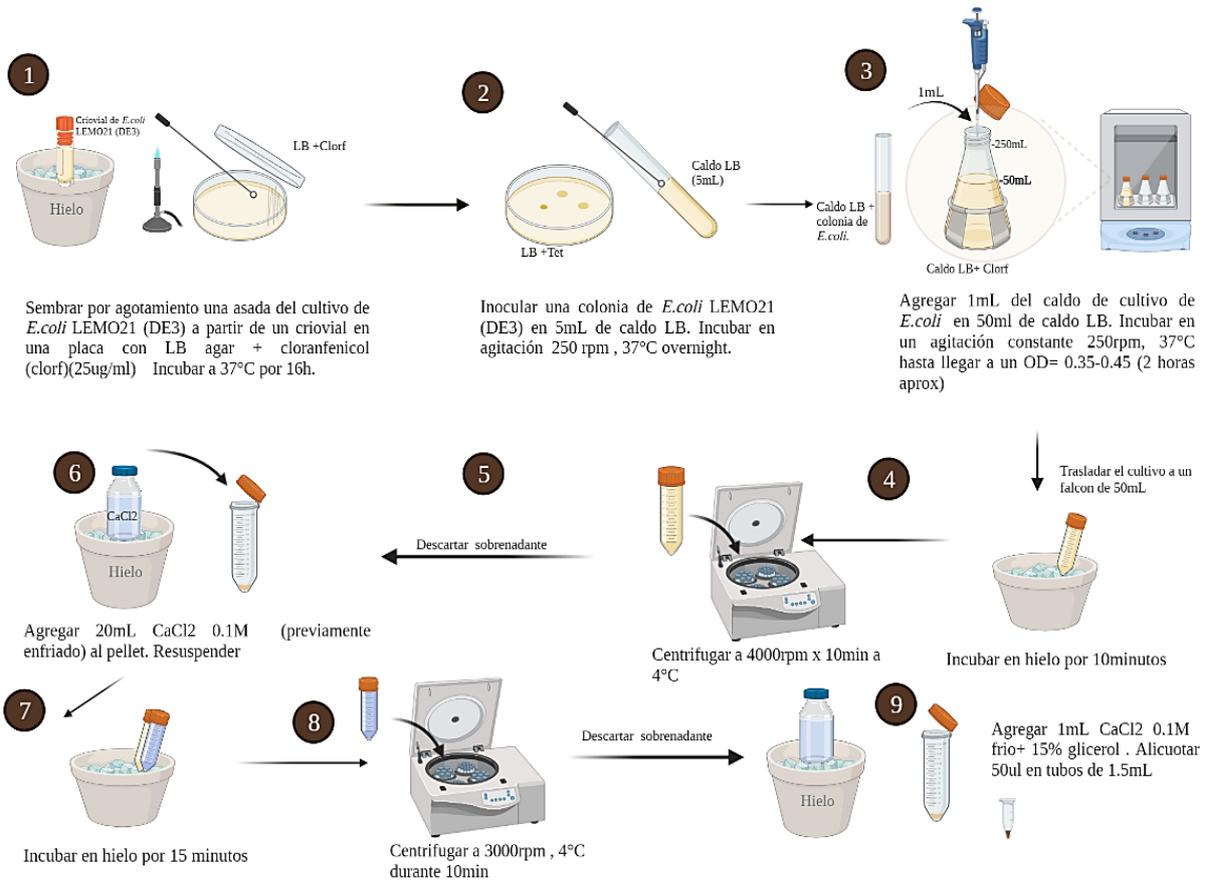
73. Morlock, G. P., Crawford, J. T., Butler, W. R., Brim, S. E., Sikes, D., Mazurek, G. H., Woodley, C. L., & Cooksey, R. C. (2000). Phenotypic characterization of *pncA* mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 44(9), 2291–2295. <https://doi.org/10.1128/aac.44.9.2291-2295.2000>
74. Getahun, M., Blumberg, H. M., Ameni, G., Beyene, D., & Kempker, R. R. (2022). Minimum inhibitory concentrations of rifampin and isoniazid among multidrug and isoniazid resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Ethiopia. *PloS One*, 17(9), e0274426. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0274426>
75. Katoh K, Rozewicki J, Yamada KD. MAFFT online service: multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization. *Brief Bioinform* . 2019;20(4):1160–6. Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28968734/>
76. Chan K-F, Koukouravas S, Yeo JY, Koh DW-S, Gan SK-E. Probability of change in life: Amino acid changes in single nucleotide substitutions. *Biosystems* [Internet]. 2020;193–194(104135):104135. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biosystems.2020.104135>
77. Epstein CJ. Non-randomness of amino-acid changes in the evolution of homologous proteins. *Nature*. 1967;215(5099):355–9. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1038/215355a0>
78. Dunham AS, Beltrao P. Exploring amino acid functions in a deep mutational landscape. *Mol Syst Biol*. 2021;17. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.15252/msb.2021103052>.
79. Schymkowitz J, Borg J, Stricher F, Nys R, Rousseau F, Serrano L. The FoldX web

- server: an online force field. *Nucleic Acids Res.* 2005 ;33(Web Server): W382–8.
Disponibile en: <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gki387>
80. Ramenskii VE, Vlasov P, Siuniaev SR, Tumanian VG. How do point amino acid substitutions affect the protein structure? *Biofizika.* 2000;
Disponibile en:
<https://www.semanticscholar.org/paper/2455ae8e4a15339f6f84d76a96949ec34240c901>
81. Pollock DD, Thiltgen G, Goldstein RA. Amino acid coevolution induces an evolutionary Stokes shift. *Proc Natl Acad Sci U S A .* 2012;109(21). Disponibile en:
<http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1120084109>
82. Stargardt P, Feuchtenhofer L, Cserjan-Puschmann M, Striedner G, Mairhofer J. Bacteriophage inspired growth-decoupled recombinant protein production in *Escherichia coli*. *ACS Synth Biol .* 2020;9(6):1336–48. Disponibile en:
<http://dx.doi.org/10.1021/acssynbio.0c00028>
83. Sharma SK, Goloubinoff P, Christen P. Non-native proteins as newly-identified targets of heavy metals and metalloids. In: *Cellular Effects of Heavy Metals*. Dordrecht: Springer Netherlands; 2011. p. 263–74
84. Riley RS, Rafter GW. Further studies on the activation of microsomal (Na⁺ + K⁺-ATPase by a leukocytic product. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology.* 1975;410(2):382–8. Disponibile en: [http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744\(75\)90240-5](http://dx.doi.org/10.1016/0005-2744(75)90240-5)
85. Kholodenko BN, Brown GC. Paradoxical control properties of enzymes within pathways: can activation cause an enzyme to have increased control? *Biochem J .* 1996;314(3):753–60. Disponibile en: <http://dx.doi.org/10.1042/bj3140753>

86. Wang, F., Liu, Y., Du, C., & Gao, R. (2022). Current strategies for real-time enzyme activation. *Biomolecules*, 12(5), 599. <https://doi.org/10.3390/biom12050599>
87. Russell, K. (2024). The optimal temperature range for enzyme activity. *Temperatures.com*. <https://temperatures.com/science-environment/the-optimal-temperature-range-for-enzyme-activity/>
88. Minato Y, Gohl DM, Thiede JM, Chacón JM, Harcombe WR, Maruyama F, et al. Genomewide assessment of *Mycobacterium tuberculosis* conditionally essential metabolic pathways. *mSystems*. 2019 ;4(4). Disponible en: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31239393/>
87. Rubino JT, Franz KJ. Coordination chemistry of copper proteins: How nature handles toxic cargo for essential function. *J Inorg Biochem*. 2012;107(1):129–43. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2011.11.024>

ANEXOS

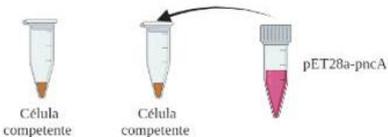
ANEXO 01. GENERACIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES *E. COLI* LEMO21 (DE3) MEDIANTE UN PROCESO QUIMICO CON CaCl_2 . (El mismo fundamento se usó para la cepa *E. coli* BL21 (DE3) *pLyss* . Imagen generada en la plataforma Biorender



ANEXO 02. PROCESO DE TRANSFORMACIÓN BACTERIANA POR CHOQUE TÉRMICO DE LA CEPA *E. coli* BL21 (DE3) CON EL PLÁSMIDO pET28a –*pncA*. Lo mismo se aplicó para la cepa *E. coli* BL21 (DE3) pLyss con el plásmido pET24a : Rv2059 Wt/Glu341Gly/Val166Ile

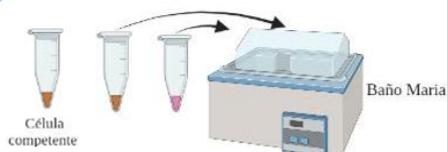
1 Atemperar en hielo durante 10min dos tubos de células competentes *E.coli* LEMO21 (DE3) (50ul)

2 Agregar 1-2ul del plásmido pET28a-*pncA* (50-100ng) a un tubo de célula competente y mantener el otro como control del proceso. (Dar toques para homogenizar)



3 Dejar en hielo durante 30min

4 Colocar en baño maria a 42°C por 45 seg.



5 Colocar inmediatamente en hielo por 2 minutos



6 Agregar 1mL de caldo de cultivo LB a cada uno de los dos tubos. Forrarlos con parafilm.

7 Colocar los tubos en un recipiente de vidrio vacío y dejar en agitación a 225rpm, 37°C, durante 1 h.

8 Sembrar 50ul de ambos tubos en placas con agar LB con kanamicina (40ug/ml) y cloranfenicol (25ug/ml). Incubar a 37°C por 24h.



9 Verificar la ausencia de colonias en el tubo que no tubo plásmido

10 Guardar la placa a -4 °C hasta su uso.

ANEXO 03. PURIFICACIÓN POR COLUMNA DE GRAVEDAD DE LA PROTEÍNA RECOMBINANTE PZAsa

1 Resuspender el pellet con 20mL de Buffer unión (20mM Buffer Fosfato ph 7.4, 500mM de NaCl y 20mM de Imidazol)

2 Sonicar la muestra con un programa de 1 minuto (1 segundo ON/ 1 segundo OFF) con intervalos de 5 minutos en hielo . Repetir 3 veces



3 Centrifugar la muestra a 12 500 rpm a 4°C durante 20 minutos. Separar el sobrenadante y tomar una alícuota de 1mL (**Fracción soluble**)

4 Abrir el puerto superior y agregar 15mL de etanol (20%) a la columna. Abri el puerto inferior y dejar que eluya a un recipiente de descarte. (Repetir)



5 Agregar 15mL de Agua MilliQ. Dejar transcurrir todo el volumen. Repetir

6 Agregar 1ml de resina de níquel a la columna, previamente descongelada y homogenizada por inversión en su recipiente.



7 Añadir 15mL de agua MQ en la columna. Dejar que transcurra hasta el nivel de la resina.

8 Agregar 10ml NaOH (1%) en la columna (dejar que caiga hasta la cuarta parte de la columna). Cerrar el puerto superior e inferior y homogenizar la columna por inversión durante 1min.

9 Agregar 15ml de Buffer calibración (Imidazol 20mM, buffer fosfato 20mM y NaCl 0.5M a pH 7.4), dejar que caiga hasta el nivel de la resina. Repetir



10 Agregar 15ml de la **fracción soluble**, cerrar el puerto superior e inferior y homogenizar por inversión la columna durante 2 minutos. Abrir el puerto inferior y dejar pasa la muestra (30min).



11 Agregar 15mL **Buffer Washing** (Imidazol 40mM+2% de glicerol). Repetir

12 Añadir 15mL **Buffer de Elución** (Imidazol 60mM) y recolectar todo el eluido en tubos de 1.5mL (**Fracción purificada**)

13 Agregar 15mL de agua MQ en la columna. Dejar que eluya.

14 Agregar 15mL de etanol al 20% en la columna hasta que caiga a la mitad de la columna. Guarda a -20°C.

ANEXO 04: PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DE ADN DE MYCOBACTERIUM MÉTODO DE DIGESTIÓN CON PROTEINASA K

- Obtener una asada de cultivo y diluirlo en 500 μ l de buffer TE.
- Calentarla a 80°C por 20 min.
- Agregar 50 μ l de lisozima (10mg/ml), vortexear e incubar toda la noche a 37°C.
- Agregar 75 μ l de 10% SDS y 20 μ l de proteinasa K (20mg/ml), vortexear e incubar a 65°C al menos por 3 horas, homogenizar mediante vortez cada 20 min.
- Agregar 100 μ l de 5M NaCl.
- Agregar 100 μ l de CTAB/NaCl calentada previamente a 65°C, vortexear e incubar a 65°C por 10 min.
- Agregar 750 μ l de fenol-cloroformo-alcohol isoamyl (25:24:1), vortexear y centrifugar 5min a 10,000rpm.

	o 500ul	1ml.5ml
Fenol	250	50(750)
Cloroformo	240	48(720)
Alcohol isoamyl	10	2(30)

- Obtener el sobrenadante y traspasarlo a otro tubo.
- Agregar 750 μ l de cloroformo-alcohol isoamyl (24:1), vortexear y centrifugar 5min a 10,000rpm.
- Obtener el sobrenadante y traspasarlo a otro tubo.
- Agregar 1ml de alcohol absoluto frio y congelar a -70°C por 15 min.
- Centrifugar 8min a 10,000rpm.

- Descartar la parte líquida y secar el pellet.
- Agregar 1ml de alcohol 70% frio y centrifugar 3min a 10,000rpm.
- Descartar la parte líquida y secar el pellet.
- Diluir el ADN en 100 μ l de TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA).
- OPCIONAL: Incubar a 55°C por 15min.

Soluciones

- **6X buffer de muestra**

0.25% Azul de bromofenol 30% glicerol

Agua destilada/MQ estéril

TE (10mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8)

Tomar μ ml de 1M de Tris-HCl pH 8 y μ ml de 0.5M EDTA pH 8 y ajustar el volumen a 10ml.

1X TAE buffer de electroforesis, (40mM Acetato de Tris, 2mM EDTA, ~pH 8.5)

TAE

242g de Tris base

57.1ml ácido acético glacial 100ml 0.5M EDTA (pH 8.0)

Tomar 20 ml de 50X TAE y ajustar el volumen a 1 litro de 1X TAE.

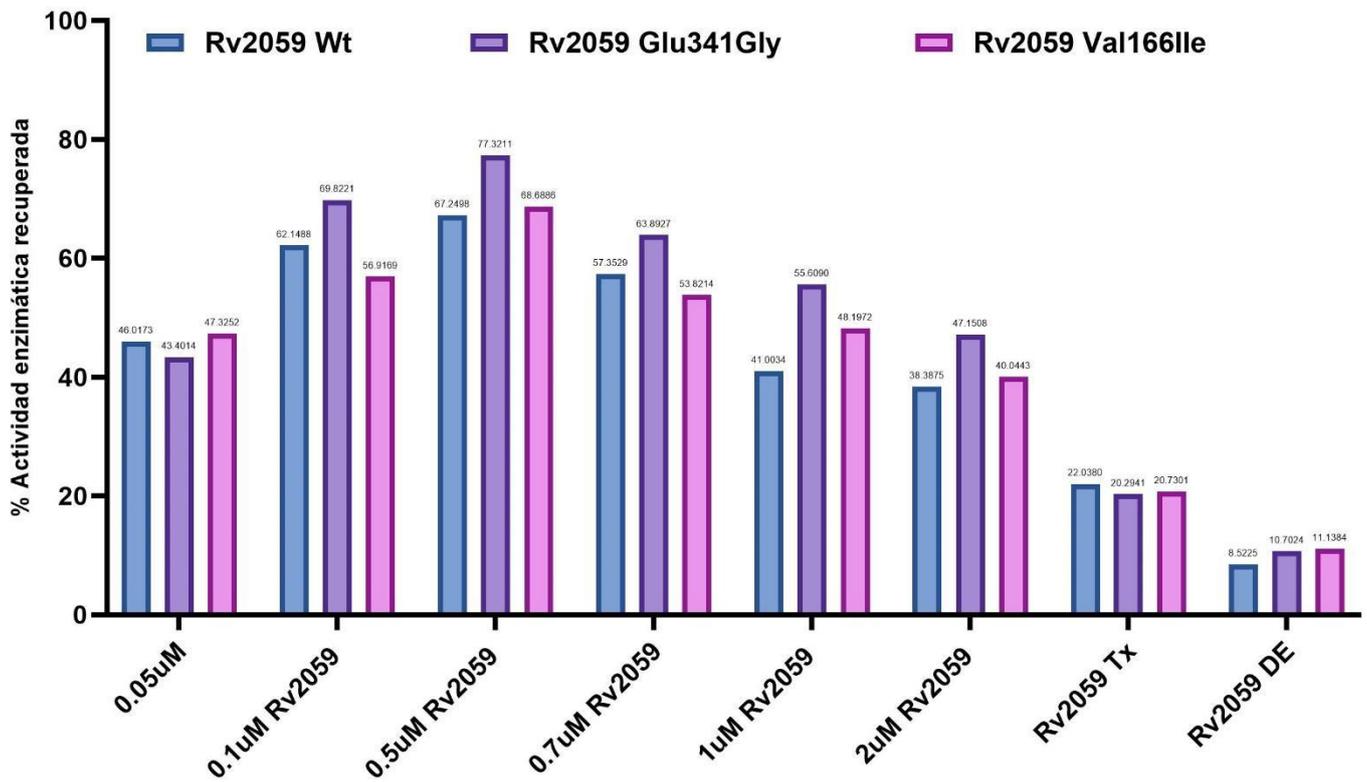
CTAB/NaCl

CTAB = cetiltrimetilamonio o N-cetyl-N,N,N,-trimethylammoniumbromide NaCl 4.1 g

CTAB 10.0 g

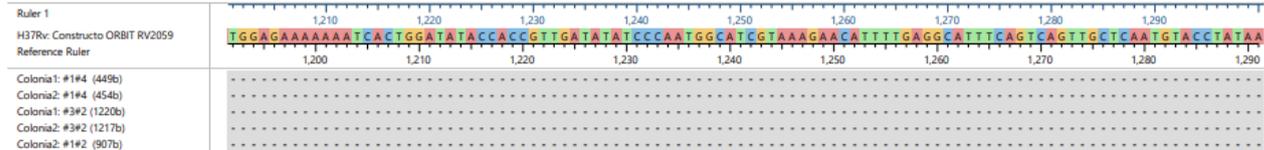
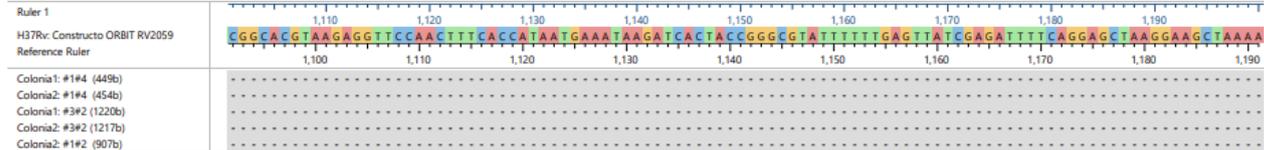
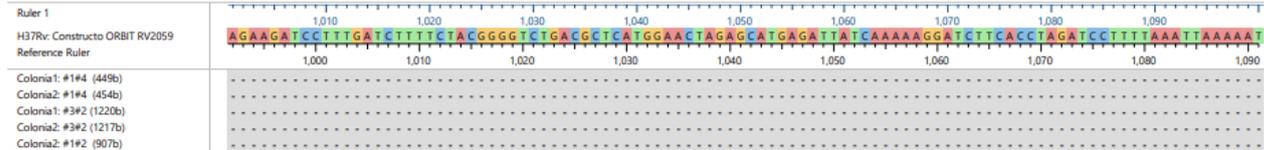
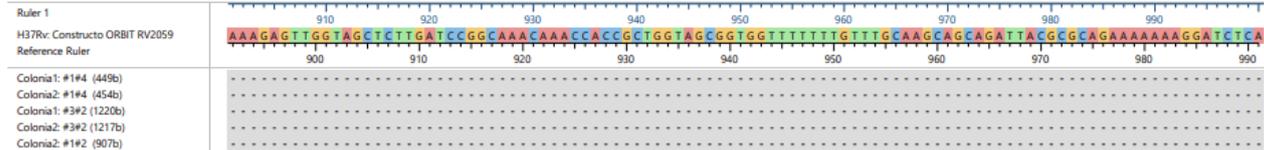
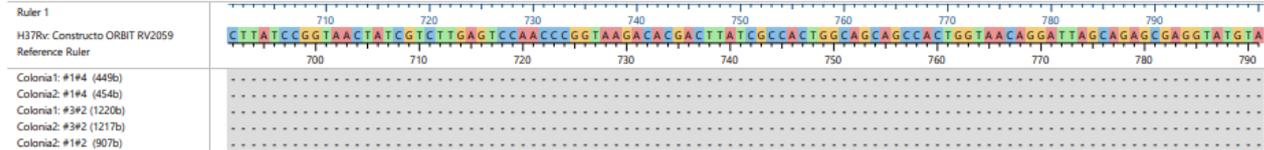
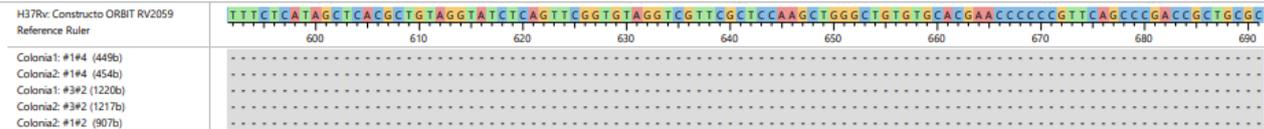
Disolver en 100 ml de agua destilada, el cual ha sido calentada a 65°C. Vortexear hasta que el contenido se vuelva blanco. Incubar 10 minutos a 65°C.

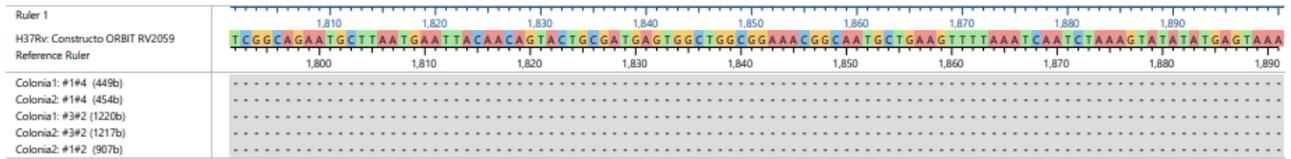
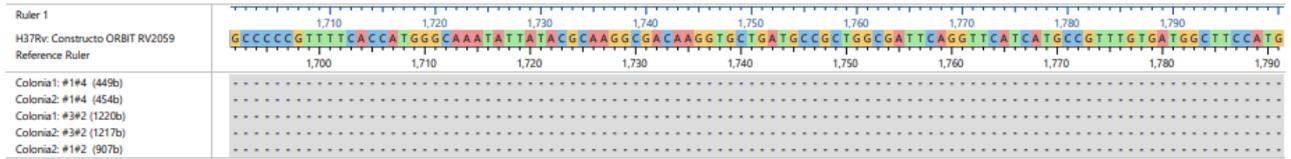
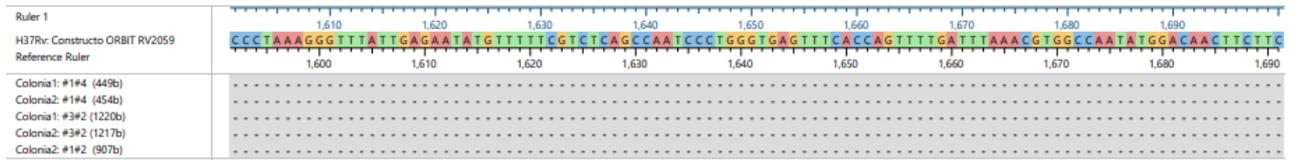
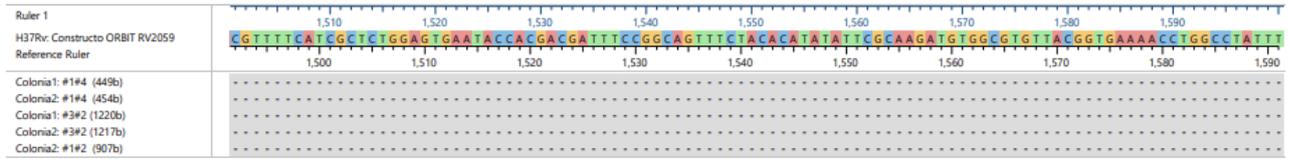
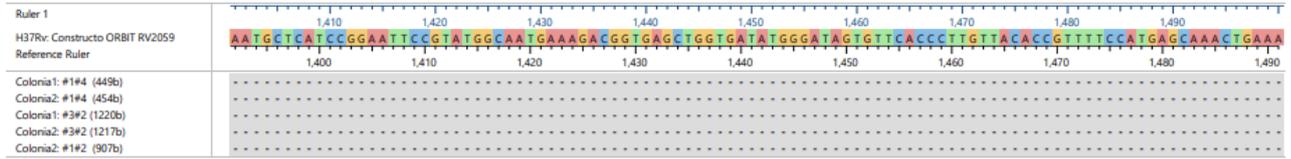
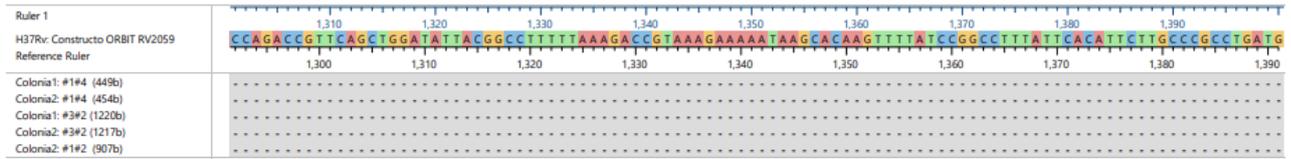
ANEXO 05. PORCENTAJE DE RECUPERACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA DE PZASA RECOMBINANTE EXPUESTA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE LA METALOCAPERONA RECOMBINANTE RV2059 Wt/GLU341GLY/VAL166ILE

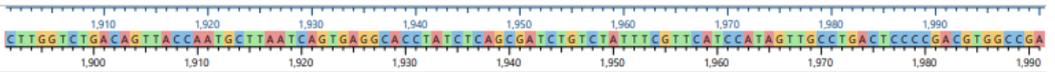
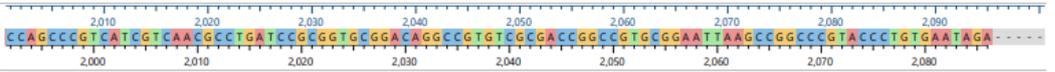
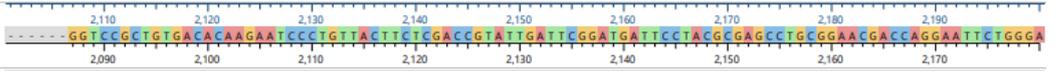
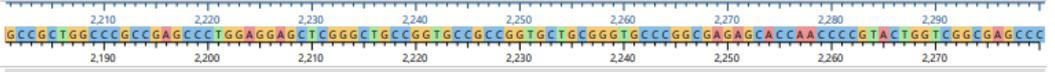
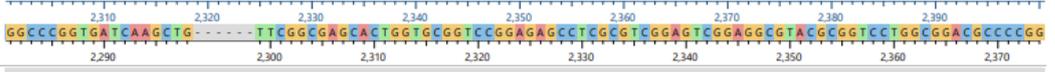
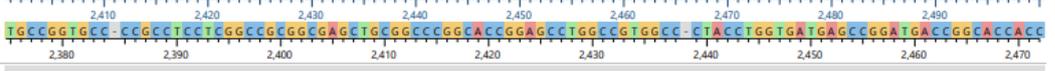


ANEXO 06. ALINEAMIENTO DE H37RV CONSTRUCTO ORBIT RV2059 CON LOS RESULTADOS DE SECUENCIAMIENTO DE LAS CEPAS NOQUEADAS PARA EL GEN RV2059 USANDO 3 PARES DE PRIMERS.

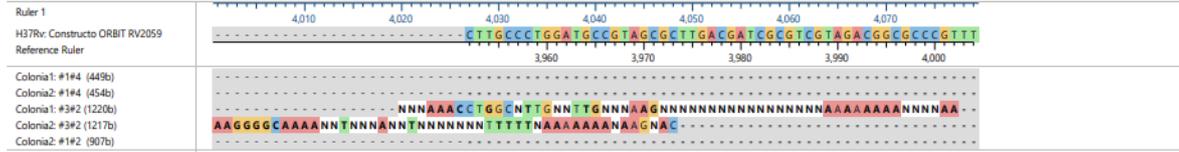
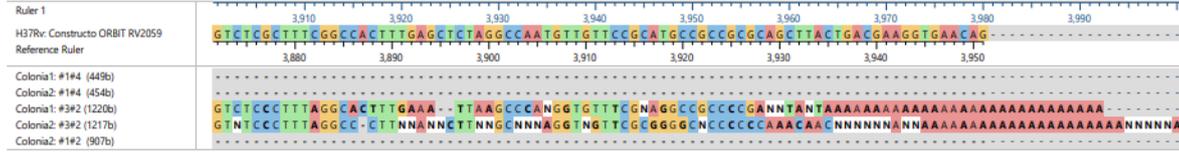
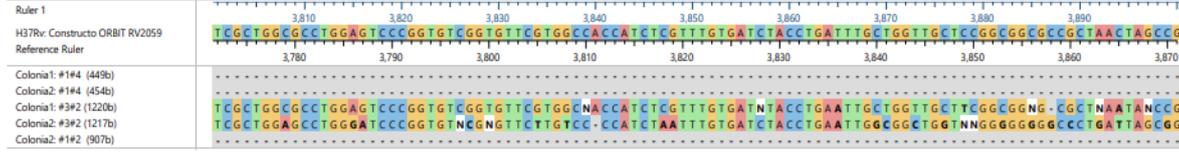
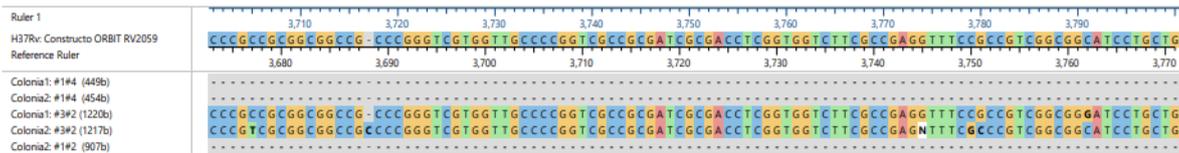
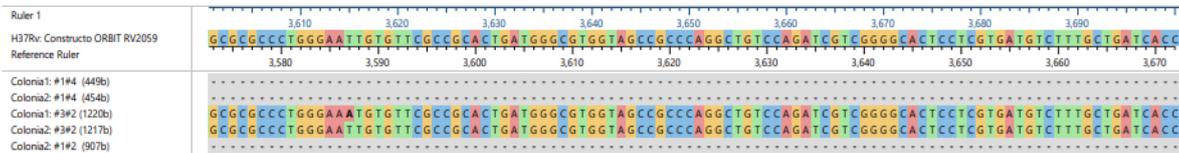
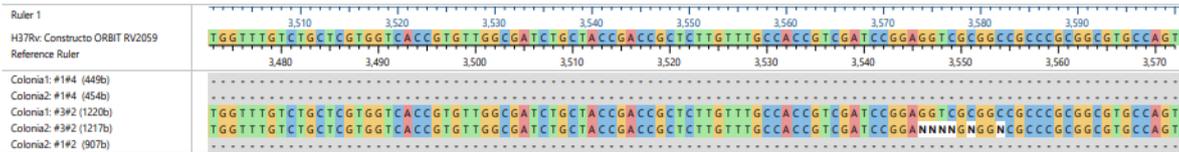
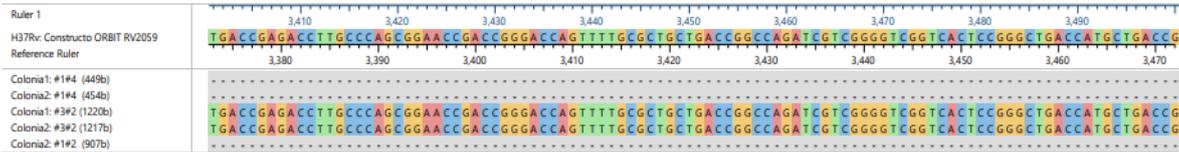
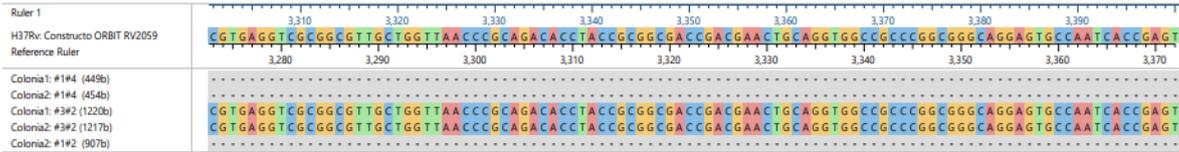
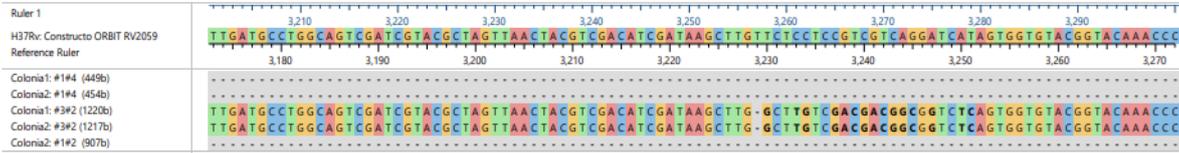






<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Colonia1: #1#4 (449b)</p> <p>Colonia2: #1#4 (454b)</p> <p>Colonia1: #3#2 (1220b)</p> <p>Colonia2: #3#2 (1217b)</p> <p>Colonia2: #1#2 (907b)</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Colonia1: #1#4 (449b)</p> <p>Colonia2: #1#4 (454b)</p> <p>Colonia1: #3#2 (1220b)</p> <p>Colonia2: #3#2 (1217b)</p> <p>Colonia2: #1#2 (907b)</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Colonia1: #1#4 (449b)</p> <p>Colonia2: #1#4 (454b)</p> <p>Colonia1: #3#2 (1220b)</p> <p>Colonia2: #3#2 (1217b)</p> <p>Colonia2: #1#2 (907b)</p>	

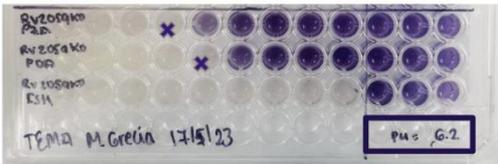
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	
<p>Ruler 1</p> <p>H37Rv: Constructo ORBIT RV2059</p> <p>Reference Ruler</p>	



Identity	0	1,050	1,060	1,070	1,080	1,090	1,100	1,110	1,120	1,130	1,140	1,150
1. Rv2059 NCBI (Mycobacterium tubercul... Frame 3	<p> CAGACACCTACCGCGGCGACCGAACGACTGCAGGTGGCCGGCGGGCAGGAGTGCCAAATCACCAGTTGACCGGAGACCTTGCCACCGGAACCGACCGGGACCAAGTTTTC Gln Thr Pro Thr Ala Ala Thr Asp Glu Leu Gln Val Ala Ala Arg Arg Ala Gly Val Pro Ile Thr Glu Leu Thr Glu Thr Leu Pro Ser Gly Thr Asp Arg Asp Gln Phe C </p>											
2. Rv2059 Wt Frame 3	<p> CAGACACCTACCGCGGCGACCGAACGACTGCAGGTGGCCGGCGGGCAGGAGTGCCAAATCACCAGTTGACCGGAGACCTTGCCACCGGAACCGACCGGGACCAAGTTTTC Gln Thr Pro Thr Ala Ala Thr Asp Glu Leu Gln Val Ala Ala Arg Arg Ala Gly Val Pro Ile Thr Glu Leu Thr Glu Thr Leu Pro Ser Gly Thr Asp Arg Asp Gln Phe C </p>											
3. Rv2059 Glu341Gly Frame 3	<p> CAGACACCTACCGCGGCGACCGAACGACTGCAGGTGGCCGGCGGGCAGGAGTGCCAAATCACCAGTTGACCGGAGACCTTGCCACCGGAACCGACCGGGACCAAGTTTTC Gln Thr Pro Thr Ala Ala Thr Asp Glu Leu Gln Val Ala Ala Arg Arg Ala Gly Val Pro Ile Thr Glu Leu Thr Glu Thr Leu Pro Ser Gly Thr Asp Arg Asp Gln Phe C </p>											
4. Rv2059 Val166Ile Frame 3	<p> CAGACACCTACCGCGGCGACCGAACGACTGCAGGTGGCCGGCGGGCAGGAGTGCCAAATCACCAGTTGACCGGAGACCTTGCCACCGGAACCGACCGGGACCAAGTTTTC Gln Thr Pro Thr Ala Ala Thr Asp Glu Leu Gln Val Ala Ala Arg Arg Ala Gly Val Pro Ile Thr Glu Leu Thr Glu Thr Leu Pro Ser Gly Thr Asp Arg Asp Gln Phe C </p>											
Identity	1,580	1,590	1,600	1,610	1,620	1,630	1,640	1,650	1,660	1,670	1,680	
1. Rv2059 NCBI (Mycobacterium tubercul... Frame 3	<p> ATTTCCTGGTTGCTCCGGCGGCGCCGCTAACTAGCCGGTCTCGCTTTCGGCCACTTGA sp Leu Leu Val Ala Pro Ala Ala Pro Leu Thr Ser Arg Ser Arg Phe Arg Pro Leu </p>											
2. Rv2059 Wt Frame 3	<p> ATTTCCTGGTTGCTCCGGCGGCGCCGCTAACTAGCCGGTCTCGCTTTCGGCCACTTGA sp Leu Leu Val Ala Pro Ala Ala Pro Leu Thr Ser Arg Ser Arg Phe Arg Pro Leu * Glu Ser Leu Thr Ser Arg Ser Arg Phe Arg Pro Leu * Glu Phe Asp Ile Lys </p>											
3. Rv2059 Glu341Gly Frame 3	<p> ATTTCCTGGTTGCTCCGGCGGCGCCGCTAACTAGCCGGTCTCGCTTTCGGCCACTTGA sp Leu Leu Val Ala Pro Ala Ala Pro Leu Thr Ser Arg Ser Arg Phe Arg Pro Leu * Asp Thr Asp Ser Leu Arg Ser Val Val Arg Leu Arg Ala Val Ser Ala His </p>											
4. Rv2059 Val166Ile Frame 3	<p> ATTTCCTGGTTGCTCCGGCGGCGCCGCTAACTAGCCGGTCTCGCTTTCGGCCACTTGA e Arg Tyr Gln Ala Tyr Arg Cys Arg Arg Ser * Leu Ala Tyr Asp Arg - Leu Arg Arg Arg Arg * Leu Ala Gly Leu Ala Phe Gly His Phe Glu Asn Ser Ile Ser </p>											

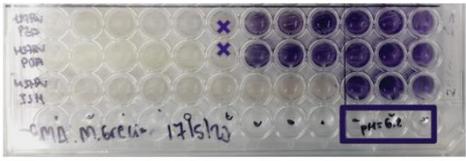
ANEXO 08. EVALUACIÓN DE LA SENSIBILIDAD A LAS DROGAS POR EL MÉTODO DE PROPORCIONES (TEMA)

H37Rv Rv2059KO



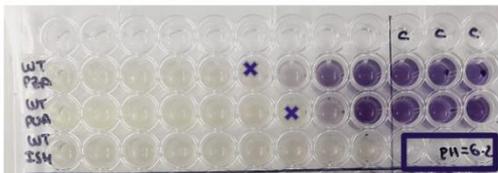
MIC
 PZA: 200 (R)
 POA: 100 (R)
 ISH: <0.132 (S)

H37Rv Wt



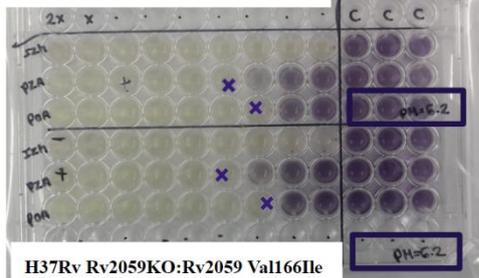
MIC
 PZA: 50 (S)
 POA: 50 (S)
 ISH: <0.132 (S)

H37Rv Rv2059KO: Rv2059Wt



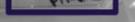
MIC
 PZA: 50(S)
 POA: 25 (S)
 ISH: <0.132 (S)

H37Rv Rv2059KO:Rv2059Glu341Gly



MIC
 PZA: 50 (S)
 POA: 25 (S)
 ISH: <0.132 (S)

H37Rv Rv2059KO:Rv2059 Val166Ile



*Sensible (S)
 *Resistente (R)