



UNIVERSIDAD PERUANA  
CAYETANO HEREDIA  
Facultad de Ciencias y Filosofía

**Efecto de la metalochaperona ZnuA y el  $Zn^{+2}$  sobre la reactivación de la metaloenzima pirazinamidasa sin ion metálico (apo-enzima) de *Escherichia coli***

Tesis para optar el Título de Licenciado en Biología

Bachiller Anuntxi Monsalve Iguñiz

Asesora

Dra. Patricia Sheen Cortavarría, PhD.

Lima-Perú

2017

## Resumen

La pirazinamida (PZA) es una de las drogas más importantes para combatir la tuberculosis. La pirazinamidasa (PZAsa) es la enzima que convierte a la PZA a su forma activa. En ausencia de metales como  $Zn^{+2}$  la PZAsa pierde actividad. Debido a que en condiciones *in vivo* la concentración de  $Zn^{+2}$  libre es muy baja (en el orden de 20pM) es posible que la coordinación del ion este mediada por una metalochaperona de  $Zn^{+2}$ . Caracterizar la interacción entre la PZAsa y metalochaperona puede contribuir al entendimiento de la cinética de PZAsa y por lo tanto el rol en la resistencia a pirazinamida. En este estudio se caracterizó el efecto de la metalochaperona, ZnuA, sobre la PZAsa desprovista de metales (apo-PZAsa). Ambas proteínas fueron purificadas a partir de *E. coli* para realizar ensayos de reactivación *in vitro*. Los resultados mostraron que bajas concentraciones de  $Zn^{+2}$  (30uM) reactiva PZAsa al 100% mientras que concentraciones similares de ZnuA (40uM) reactiva PZAsa al 60%; sin embargo ZnuA no presenta sinergismo con  $Zn^{+2}$  para reactivar la PZAsa, lo cual nos indicaría que la reactivación observada en los ensayos de ZnuA se debe a iones en el medio mas no a una interacción entre las dos proteínas. En conclusión, la PZAsa no es activada *in vivo* con esta metalochaperona.

Palabras clave: Pirazinamida, pirazinamidasa, metalochaperonas, zinc, *E. coli*

## Abstract

Pyrazinamide (PZA) is one of the most important drugs used to treat tuberculosis. Pyrazinamidase (PZAse) is the enzyme that activates PZA. In the absence of metals like  $Zn^{+2}$  PZAse loses activity. Given that *in vivo* concentrations of free  $Zn^{+2}$  are low it is probable that PZAse requires a metallochaperon to coordinate the zinc cation. Characterizing the interaction between PZAse and the metallochaperon contributes to the understanding of the kinetic behavior of PZAse and therefore its role in pyrazinamide resistance. This study characterized the effect of the metallochaperone ZnuA, on metal depleted PZAse. Both proteins were purified from *E. coli* and used for reactivation assays *in vitro*. The results show that low concentrations of  $Zn^{+2}$  (30uM) reactivate PZAse 100% while similar concentrations of ZnuA (40uM) reactivate PZAse 60%; however ZnuA does not present synergism with  $Zn^{+2}$  to reactivate PZAse, which would indicate that the reactivation attributed to ZnuA is really caused by ions in the medium not an interaction between the proteins. In conclusion, PZAse is not activated *in vivo* with this metallochaperon.

Key Words: pyrazinamide, pyrazinamidase, metallochaperon, zinc, *E. coli*

## Índice

I. Introducción .....	1
II. Hipótesis y justificación .....	3
III. Objetivos .....	5
III.I. Objetivo general.....	5
III.II. Objetivos específicos .....	5
IV. Métodos.....	5
IV.I. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	5
IV.II. Quelación de pirazinamidasas .....	6
IV.III. Determinar la estabilidad de PZAsa y ZnuA .....	6
IV.IV. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con $Zn^{+2}$ .....	6
IV.V. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con ZnuA .....	7
IV.V. Ensayos de actividad: Determinar el efecto sinérgico de ZnuA y $Zn^{+2}$ .....	7
IV.VI. Análisis de resultados .....	8
V. Resultados .....	9
V.I. Expresión y purificación de proteínas recombinantes .....	9
V.II. Verificación de la quelación de pirazinamidasas .....	10
V.III. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con $Zn^{+2}$ .....	11
V.IV. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con ZnuA .....	14
V.V. Ensayos de actividad: Determinar el efecto sinérgico de ZnuA y $Zn^{+2}$ .....	17
VI. Discusión .....	20
VII. Conclusión .....	22
VIII. Referencias bibliográficas .....	23
IX. Anexos.....	28

## I. Introducción

La tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas con mayor prevalencia a nivel mundial y es la primera causa de muerte producida por un agente infeccioso. En el Perú se ha detectado una mortalidad de 4.9 por 100 000 habitantes en el 2016 y una prevalencia de 117 por 100 000 habitantes en el mismo año. (1) Esta enfermedad es causada por *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) una bacteria aeróbica que crece en forma de bacilos. Esta especie es un patógeno obligatorio porque es incapaz de replicarse en un medio inanimado. El hospedero más común es el humano, su secuencia genética muestra una baja variabilidad y mutaciones sinónimas lo que sugiere que ha evolucionado con esta especie.(2)

La pirazinamida (PZA) es una de las drogas más importantes para el tratamiento de TB, dado que al ser combinada con rifampicina o isoniacida, reduce el tiempo de tratamiento de 9 a 6 meses.(3) Esto se debe a que su actividad esterilizante afecta a las bacterias en estado latente, lo que evita que le paciente recaiga en la enfermedad. Durante la infección por MTB el ambiente se acidifica por la inflamación lo que permite que la PZA sea efectiva *in vivo*.(4)

El mecanismo de acción de la PZA es uno de los menos conocidos. Esta pro-droga es transformada a su forma activa, ácido pirazinoico (POA), por la enzima pirazinamidasa (PZAsa). En el modelo de acción propuesto (4–6), PZA ingresa a la célula por difusión pasiva y es hidrolizado por la PZAsa citoplasmática. POA sale de la célula por difusión pasiva o a través de bombas defectuosas. Solo en un ambiente ácido POA perderá su carga al ganar un protón, HPOA. Este ingresa nuevamente a la célula lo que aumenta la acidez interna del MTB. El aumento de protones en el citoplasma también altera el potencial de membrana afectando el transporte a través de la membrana, la síntesis de proteínas y ARN. El HPOA requiere un transporte activo para ser sacado de la célula, este gasto de energía podría explicar por qué PZA es efectiva en MTB latente.(5) Al mismo tiempo, POA puede actuar sobre una proteína ribosomal (RpsA); inhibiendo la trans-traducción y la degradación de péptidos o ARN mensajero erróneo.(7) La actividad de PZA puede ser afectada por varios factores: el pH del medio, la fase de crecimiento de MTB, mutaciones en RpsA o PZAsa. Por lo tanto caracterizar el

funcionamiento de la PZAsa es un paso importante para combatir la resistencia a PZA.(8)

La pirazinamidasasa (PZAsa) es una metaloenzima que hidroliza como sustrato natural a la nicotinamida, como parte del salvataje de NAD. La PZA tiene una estructura similar a la nicotinamida, por lo que es hidrolizada por la nicotinamidasasa/pirazinamidasasa. La PZAsa mantiene su actividad un rango de temperatura de 25°C a 70°C, siendo la temperatura óptima 40°C. Además presenta un pH óptimo de 7 y comienza a perder rápidamente funcionalidad en un medio con pH mayor a 8 o menor a 6. (9) El gen que produce la PZAsa, *pncA*, fue identificado en *Escherichia coli* (*E. coli*) con el objetivo de encontrar un homólogo en MTB. (10)

Estudios estructurales de PZAsa identificaron un sitio activo (Lys96, Asp8 y Cys138) diferente al sitio de unión a metal (His51, His71 y Asp49). En cada estudio la identidad del metal fue diferente. (9,11,12) La presencia de metal y su efecto en la actividad de PZAsa fue probado por Sheen *et al.*(13) Demostraron que al retirar los metales la PZAsa perdía actividad pero podía ser reactivada por  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$  y  $\text{Zn}^{+2}$ , pero no con  $\text{Fe}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$ ,  $\text{Cu}^{+2}$  ni  $\text{Mg}^{+2}$ . Por otro lado resultados de Zhang *et al.* (9) muestran la reactivación de PZAsa con  $\text{Fe}^{+2}$  y  $\text{Mn}^{+2}$ . Sin embargo, resultados realizados en PZAsa de *E. coli* muestran que es reactivada por  $\text{Zn}^{+2}$ ,  $\text{Co}^{+2}$ ,  $\text{Mg}^{+2}$ ,  $\text{Mn}^{+2}$ ,  $\text{Fe}^{+3}$  y  $\text{Cu}^{+2}$  (tesis en curso).

Utilizando fluorescencia de rayos X y ensayos de absorción atómica observaron que la PZAsa de MTB expresada en *E. coli* contenía  $\text{Zn}^{+2}$ . Las concentraciones de  $\text{Zn}^{+2}$  encontradas para reactivar la PZAsa *in vitro* fueron en el orden de 1mM (13,14). Debido a que en condiciones *in vivo* la concentración de  $\text{Zn}^{+2}$  disponible del orden de los 20pM (15) se propuso que la coordinación del ion este mediada por una metalochaperona de  $\text{Zn}^{+2}$ . (13,14) A pesar de que los sideróforos son fundamentales para la fisiología bacteriana al permitir captar el hierro del ambiente e introducirlo a la célula (16–18); lo más probable es que la PZAsa requiera una metalochaperona de Zinc.

Las metalochaperonas son proteínas que transportan iones específicos para entregarlos a metaloenzimas a través de una interacción específica proteína-proteína. Además, regulan la cantidad de iones libres en el citoplasma controlando que estén en las concentraciones necesarias. (19,20). Este estudio se enfoca en metalochaperonas de  $Zn^{+2}$ . En *E. coli* no se han encontrado metalochaperonas citoplasmáticas pero si periplasmáticas. (21)

La metalochaperona encontrada en *E. coli* que transporta  $Zn^{+2}$  del espacio periplasmático hacia el citoplasma es ZnuA. Esta forma parte de un complejo regulado por el gen *znuABC*, que expresa ZnuA, ZnuB y ZnuC. Este gen es regulado a través de la proteína Zur; que en respuesta a bajas concentraciones intracelulares de  $Zn^{+2}$  promueve la transcripción del gen *znuABC*. (22) El sistema ZnuABC tiene una alta afinidad al  $Zn^{+2}$ , lo que permite un control efectivo. ZnuA transporta en ion hasta ZnuB, una proteína transmembrana. ZnuC produce la energía necesaria para que ZnuB pueda transportar el ion al citoplasma, al hidrolizar ATP. (23) La estructura de ZnuA indica que el sitio de transporte de  $Zn^{+2}$  está coordinado por tres residuos de Histidina (His78, His161, His225) y un Glutamato (Glu77). (24) Se ha visto que ZnuA de *Escherichia coli* en conjunto con  $Zn^{+2}$  tienen un efecto sinérgico para reactivar la PZAsa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) (14). En MTB se ha identificado una posible metalochaperona, RV2059 que podría estar relacionada al funcionamiento de PZAsa de MTB. Esta proteína tiene una secuencia semejante en un 26% a la secuencia de ZnuA de *E. coli* ( Figura 15) (25). Además, se encuentran dentro de un clúster de genes que es regulado de la misma manera que el gen *znuABC* en *E. coli*. (26,27)

## II. Hipótesis y justificación

En estudios anteriores realizados por Huerta (14) se ha descrito el efecto de la metalochaperona ZnuA de *Escherichia coli* en la activación de la PZAsa de *Mycobacterium tuberculosis* (MTB). *In silico*, a partir de la estructura cristalina, se realizó un modelamiento de la interacción PZAsa-ZnuA. Lo que reveló que los sitios de unión a  $Zn^{+2}$  en ambas proteínas se encuentran a una distancia y orientación adecuada

para que se lleve a cabo una interacción. *In vitro*, en los estudios que se realizaron en condiciones de bajo efecto tampón se ha encontrado que ZnuA en altas concentraciones reactiva a la PZAsa. Este efecto ocurre de manera sinérgica con bajas concentraciones de ZnuA en presencia de  $Zn^{+2}$ . (14)

ZnuA es una proteína periplasmática mientras que PZAsa es citoplasmática, por lo que es posible que exista interacción aunque sea poco probable. Además, la proteína homólogo a ZnuA en MTB que aún no está caracterizada, la RV2059 puede funcionar de manera similar a la ZnuA en el citoplasma.

Debido a que en el trabajo de Huerta (14) la PZAsa y la ZnuA pertenecen a organismos diferentes en este trabajo se propone realizar un ensayo similar verificando el efecto de la actividad de ZnuA sobre la PZAsa de *E. coli*, bajo la hipótesis de que la metalochaperona ZnuA facilita la captación de iones  $Zn^{+2}$  por pirazinamidasa sin ion metálico (apo-PZAsaR), recuperando su actividad.

Los ensayos realizados por Huerta(14) se realizaron en condiciones con bajo efecto tampón. Debido a diferentes condiciones experimentales para la reactivación de metaloenzimas pueden generar diferentes reacciones frente a un mismo estímulo, (28) se repitieron estas condiciones experimentales para tener resultados comparables. Sin embargo, estas condiciones son más susceptibles a variaciones en el pH por lo que también se evaluó un alto efecto tampón (50mM de Buffer Fosfato). (29) Esto nos dará indicios sobre la estabilidad de la PZAsa frente a diferentes cambios de pH.

Los estudios *in vitro* propuestos apoyarían la hipótesis de que PZAsa requiere una metalochaperona de  $Zn^{+2}$  para tener actividad. Mutaciones en la metalochaperona podrían generar cambios en la interacción entre PZAsa y la metalochaperona, que podrían impedir que PZAsa reciba el cofactor metálico que requiere para hidrolizar PZA. Por lo que es posible que mutaciones en la metalochaperona sean una fuente de resistencia, como lo son las mutaciones en la PZAsa.(30,31)



### **III. Objetivos**

#### III.I. Objetivo general

Determinar el efecto de la metalochaperona ZnuA y  $Zn^{+2}$  en la actividad de PZAsa desprovista de ion metálico.

#### III.II. Objetivos específicos

- Expresar y purificar ZnuA recombinante
- Expresar, purificar y quelar PZAsa recombinante
- Determinar la estabilidad de PZAsa y ZnuA frente a cambios de pH
- Establecer la concentración de mínima ZnuA y  $Zn^{+2}$  que reactiva la PZAsa sin ion metálico (apo-PZAsaR)
- Determinar el efecto sinérgico de ZnuA y  $Zn^{+2}$

### **IV. Métodos**

#### IV.I. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

El gen de ZnuA insertado en el plásmido pET26a fue transformado en células de *E. coli* BL21(DE3)pLys para ser expresado. La expresión fue inducida con 0.5uM Isopropil  $\beta$ -D-Tiogalactosido (IPTG) en un caldo de LB (Luria Bertania) y kanamicina (40ug/mL) en agitación por 4 horas a 37°C. Las células luego fueron centrifugadas a 4500 rpm a 4°C por 15. El precipitado fue resuspendido en binding buffer (Tampón fosfato 20mM, NaCl 0.5M, Imidazol 20mM, pH 7.4). Las células fueron lisadas mediante shock térmico y ultrasonido. Luego fueron centrifugadas a 13500rpm por 40min a 4°C. La fracción soluble fue recuperada. El gen pnca para la PZAsa inserto en un plásmido pET28b fue transformado en células *E. coli* LEMO21 (DE3) pLys y fue expresado de la misma manera. Como descrito por Sheen *et al.*(32) y Huerta(14).

Las proteínas recombinantes presentan una cola de histidina lo que permite que sean purificadas por una cromatografía de afinidad utilizando una columna His-Trap. La fracción soluble fue pasada por la columna y lavada usando buffer fosfato 20mM con concentraciones crecientes de imidazol 20mM, 40mM, 60mM, 100mM, 300mM y

500mM a pH7.4. Las alícuotas fueron analizadas por SDS-PAGE tanto para ZnuA como PZAsa. Además a las alícuotas de PZAsa se les realizó la prueba de Wayne (33). Las alícuotas que contienen la proteína fueron concentradas por ultrafiltración y lavadas con buffer 30mM Tris-HCl pH7 para ZnuA y 50mM buffer fosfato pH6.4 para PZAsa. La concentración final fue medida con el método de Bradford (34). Como descrito por Sheen *et al.*(32) y Huerta(14).

#### IV.II. Quelación de pirazinamidasa

Los iones de la PZAsa fueron removidos utilizando EDTA. La enzima se incubó toda la noche en buffer fosfato 0.1M pH 6.4 y EDTA 500mM pH8.0 a temperatura ambiente. El EDTA fue retirado por lavados con buffer fosfato 0.1M por ultrafiltración con membradas de celulosa con poros de 10kDa. A esta la llamaremos apo-PZAsaR. Además, se realizó un control remplazando el EDTA por agua ultra pura. A esta la llamaremos PZAsaR-Tx La concentración final se midió utilizando la prueba de Bradford (34) y se verificó la quelación utilizando la prueba de Wayne (33). El ensayo de Wayne mide de manera cualitativa a la producción del ácido pirazinoico al reaccionar con el fierro del sulfato de amonio ferroso. Como descrito por Sheen *et al.* (13) y Huerta(14).

#### IV.III. Determinar la estabilidad de PZAsa y ZnuA

Se realizaron ensayos de actividad en condiciones con alto efecto tampón (Buffer Fosfato pH 6.4 50mM) y bajo efecto tampón (Buffer fosfato pH6.4 1mM). Se tomaron concentraciones crecientes de  $Zn^{+2}$  ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ) con valores de 0.1uM hasta 2000uM de  $Zn^{+2}$  y concentraciones de 0.5uM hasta 200uM de ZnuA en ambas condiciones.

#### IV.IV Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con $Zn^{+2}$

Se realizó una curva de titulación de la actividad de 3uM de apo-PZAsaR para concentraciones crecientes de  $Zn^{+2}$  ( $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ). Se tomaron valores de 0.1uM hasta 2000uM de  $Zn^{+2}$ . El esquema de reacción se encuentra anexo (Tabla3). Se incubó la apo-PZAsaR con el ion por 30 min a 37°C. Luego se le agregó la PZA y se incubó por 3 min a 37°C. Finalmente se reveló la reacción con 10uL de sulfato de amonio ferroso y

se detuvo con 445uL de 0.2M Glicina-HCl pH3.4. Esta es la PZAsa reactivada. El control (PZAsaR-TX) fue sometido a las mismas condiciones sin ion. Los ensayos fueron centrifugados por 5min a 10000 rpm y leídos en el espectrofotómetro a 450nm. Este método cualitativo es una modificación del ensayo de Wayne (32).

IV.V. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con ZnuA

Se realizó una curva de titulación de la actividad de 3uM de apo-PZAsaR para concentraciones crecientes de ZnuA (Tabla 1). El esquema de reacción se encuentra anexo (Tabla4).

**Tabla 1. Concentraciones finales de ZnuA ensayadas (uM)**

3uM Apo- PZAsaR	ZnuA										
	0.5	1	2.5	5	7.5	10	20	40	80	100	200

IV.V. Ensayos de actividad: Determinar el efecto sinérgico de ZnuA y Zn<sup>+2</sup>

El mismo procedimiento fue utilizado para las concentraciones fijas de apo-PZAsaR+ZnuA tituladas con Zn<sup>+2</sup>. Se tomó 3uM de apo-PZAsaR con 5uM, 10uM, 20uM y 40uM de ZnuA, cada uno de estos puntos fue titulado con 0.5uM, 1uM, 5uM, 10uM y 20uM de Zn<sup>+2</sup> (Tabla 2, Tabla5). Se realizaron 3 repeticiones biológicas de todos los ensayos.

**Tabla 2. Concentraciones de ZnuA y Zn<sup>+2</sup> utilizadas para determinar sinergismo con 3uM apo-PZAsaR**

	ZnuA			
	5uM	10uM	20uM	40uM
<b>Zn</b>	1uM	1uM	1uM	1uM
	5uM	5uM	5uM	5uM
	10uM	10uM	10uM	10uM
	20uM	20uM	20uM	20uM

#### IV.VI. Análisis de resultados

El efecto de  $Zn^{+2}$  y ZnuA sobre la apo-PZAsaR fue cuantificado como la actividad enzimática y expresado como porcentaje de recuperación de actividad según descrito por Sheen *et al.* (13) y Huerta(14):

$$R\% = \frac{\text{Actividad PZAsa Reactivada} - (\text{Actividad apo} - \text{PZAsaR})}{(\text{Actividad PZAsaR} - Tx) - (\text{Actividad apo} - \text{PZAsaR})} * 100$$

El análisis estadístico se realizó con el programa STATA. El efecto del  $Zn^{+2}$  y ZnuA sobre la recuperación de la actividad se determinó utilizando un modelo de regresión lineal simple. El efecto de  $Zn^{+2}$  y ZnuA complementado con  $Zn^{+2}$  se comparó utilizando un modelo de regresión lineal múltiple. Se utilizaron las variables concentración de  $Zn^{+2}$ , presencia o ausencia de ZnuA y la variable de interacción (concentración de  $Zn^{+2}$  por presencia o ausencia de ZnuA).

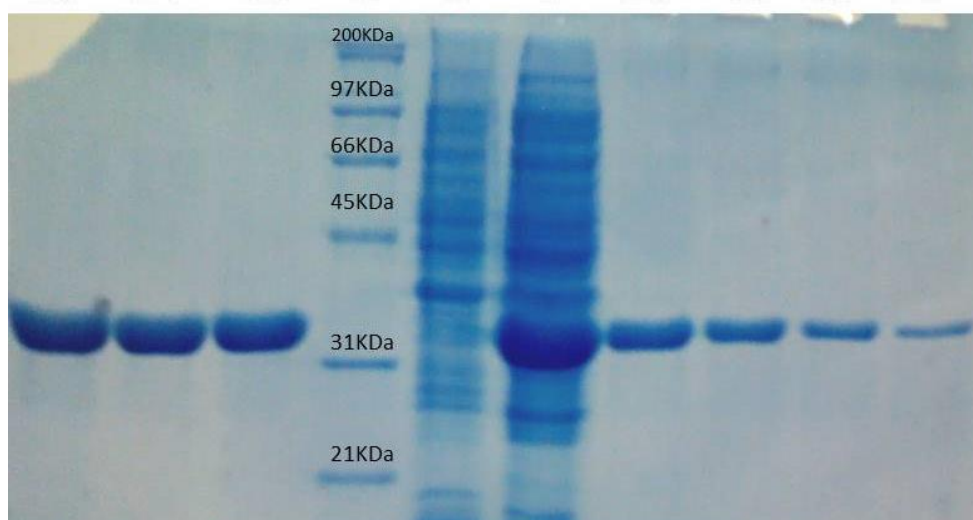
## V. Resultados

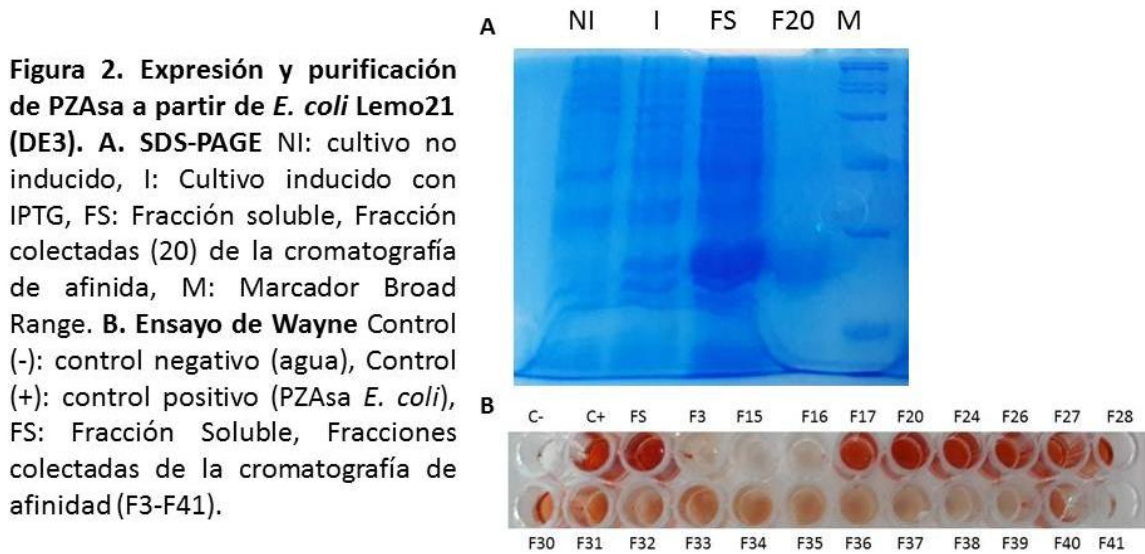
### V.I. Expresión y purificación de proteínas recombinantes

El procedimiento de expresión del gen *pncA* y el gen *znuA* se realizó de la misma manera. El gen *znuA* se transformó en *E. coli* BL21 (DE3) y se realizó la sobre-expresión de ZnuA. La expresión produjo la proteína recombinante ZnuA (35KDa) en estado soluble. Esta se purificó utilizando una columna de níquel y se verificó su pureza utilizando electroforesis SDS-PAGE (**Figura 1**). Luego de concentrar la muestra se obtuvo ZnuA en concentraciones de 500uM aproximadamente.

La expresión produjo la proteína recombinante PZAsa (21.7KDa) en estado soluble. La presencia de PZAsa en las fracciones recolectadas de la cromatografía de afinidad se verificó por el ensayo de Wayne y electroforesis SDS-PAGE (**Figura 2**). El color anaranjado indica la presencia de PZAsa activa (**Figura 2B**). Luego de concentrar la muestra se obtuvo PZAsa en concentraciones de 800uM aproximadamente.

**Figura 1. SDS-PAGE Expresión y purificación de ZnuA a partir de *E. coli* BL21 (DE3).** Fracciones colectadas (20-26) de la cromatografía de afinidad, M: Marcador BroadRange NI: cultivo no inducido, I: Cultivo inducido con IPTG





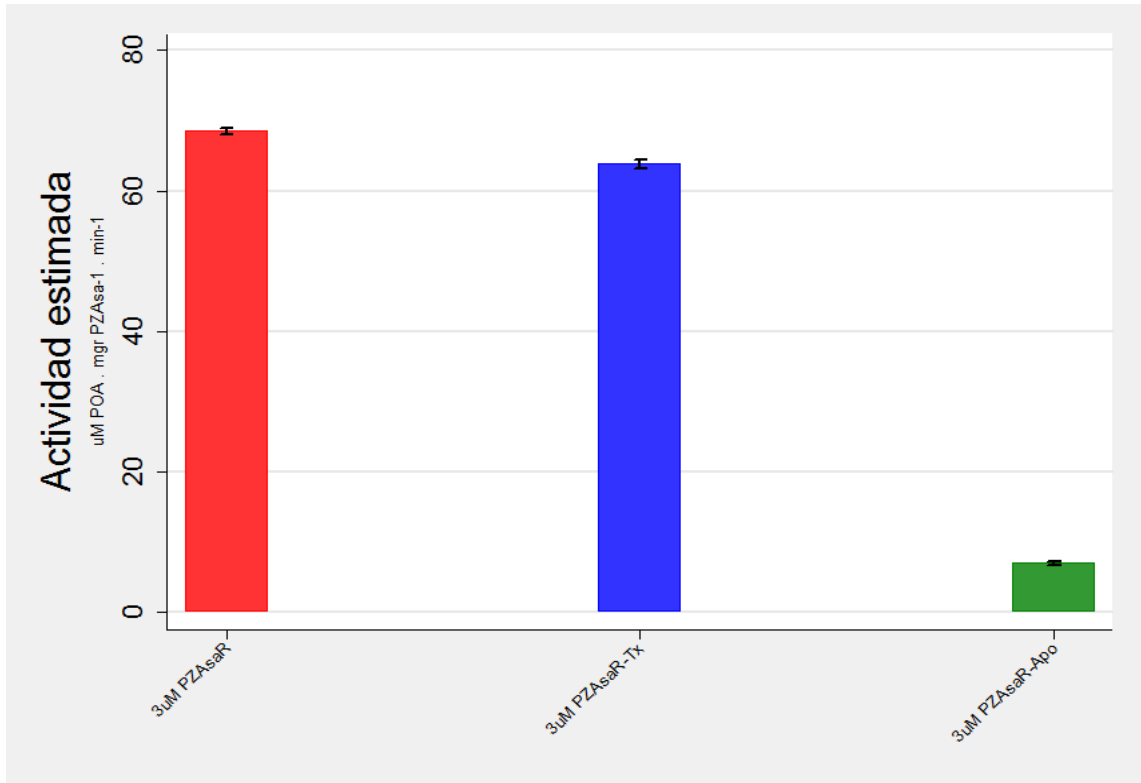
## V.II. Verificación de la quelación de pirazinamidas

La actividad de la PZAsaR y la PZAsaR-Tx, que no fueron sometidas al agente quelante, se puede apreciar a través de la coloración anaranjada en la **Figura 3**. Mientras que la falta de actividad de a apo-PZAsaR se evidencia por la ausencia de color. La actividad de la apo-PZAsaR ( $6.9 \mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) disminuyo en un 90% frente a la actividad de la PZAsaR ( $68.5 \mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ). La proteína control PZAsaR-TX ( $63.8 \mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) tiene una pequeña diferencia de 7% frente a la actividad de la PZAsaR (**Figura 4**).

**Figura 3. Verificación de la quelación cualitativa, Wayne. Color anaranjado indica actividad**



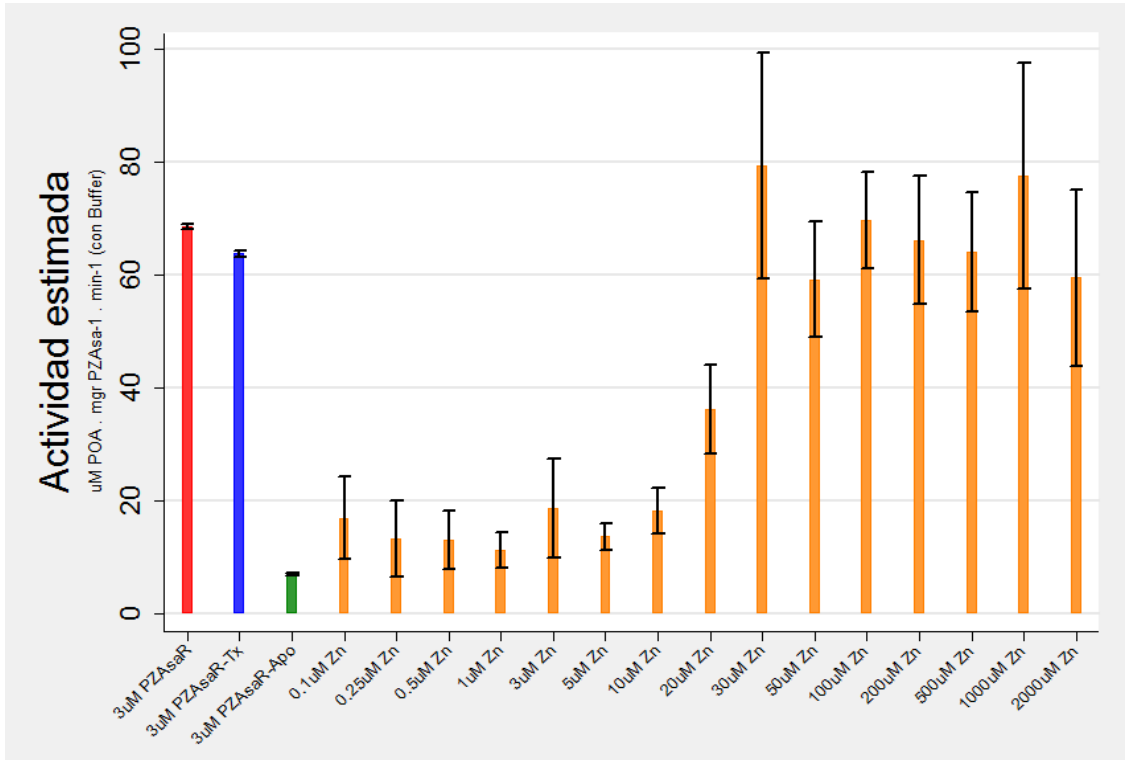
**Figura 4. Actividad estimada de la PZAsaR, PZAsaR-Tx y apo-PZAsaR.** Las barras son las medias y los bigotes representan el intervalo de confianza al 95%.



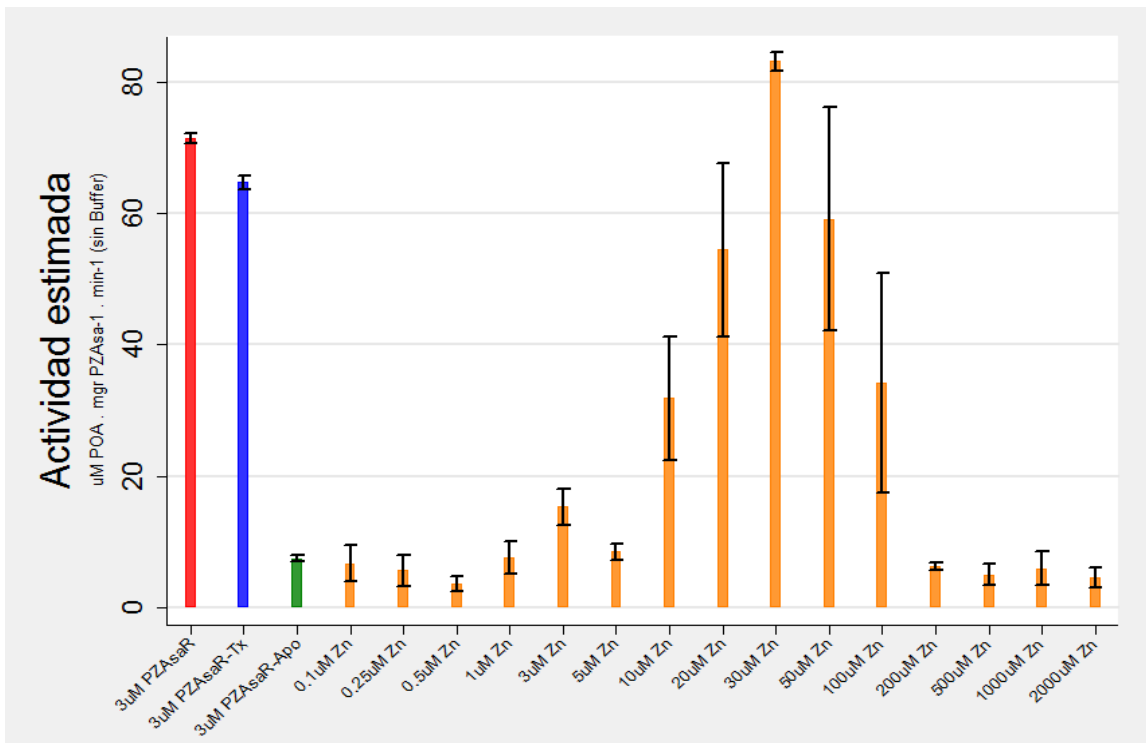
### V.III. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con $Zn^{+2}$

La actividad estimada de apo-PZAsaR con  $Zn^{+2}$  se asemeja a la actividad de la PZAsaR con concentraciones de  $Zn^{+2}$  desde 30uM ( $83 \mu M POA \times mg PZAsa^{-1} \times min^{-1}$ ) hasta 2000uM ( $59.9 \mu M POA \times mg PZAsa^{-1} \times min^{-1}$ ) con alto efecto tampón (**Figura 5A**). La reactivación de apo-PZAsaR en condiciones con bajo efecto tampón se alcanzó con concentraciones alrededor de 20uM ( $36.2 \mu M POA \times mg PZAsa^{-1} \times min^{-1}$ ) de  $Zn^{+2}$ . Además a partir de 50uM ( $59.1 \mu M POA \times mg PZAsa^{-1} \times min^{-1}$ ) se encontró que disminuye la recuperación de la actividad es estas condiciones. (**Figura 5B**) El porcentaje de reactivación de la apo-PZAsaR muestra una tendencia positiva al aumentar la cantidad de  $Zn^{+2}$ , en condiciones de alto tampón fosfato ( $P < 0.05$  utilizando una regresión lineal). Sin embargo, en condiciones de bajo tampón se muestra una tendencia negativa al aumentar la concentración de  $Zn^{+2}$  ( $P < 0.05$  utilizando una regresión lineal). (**Figura 6**)

**Figura 5. Actividad promedio de apo-PZAsaR con Zn<sup>+2</sup>.** Las barras representan las medias y los bigotes representan el intervalo de confianza al 95%. **A.** Alta concentración de tampón fosfato

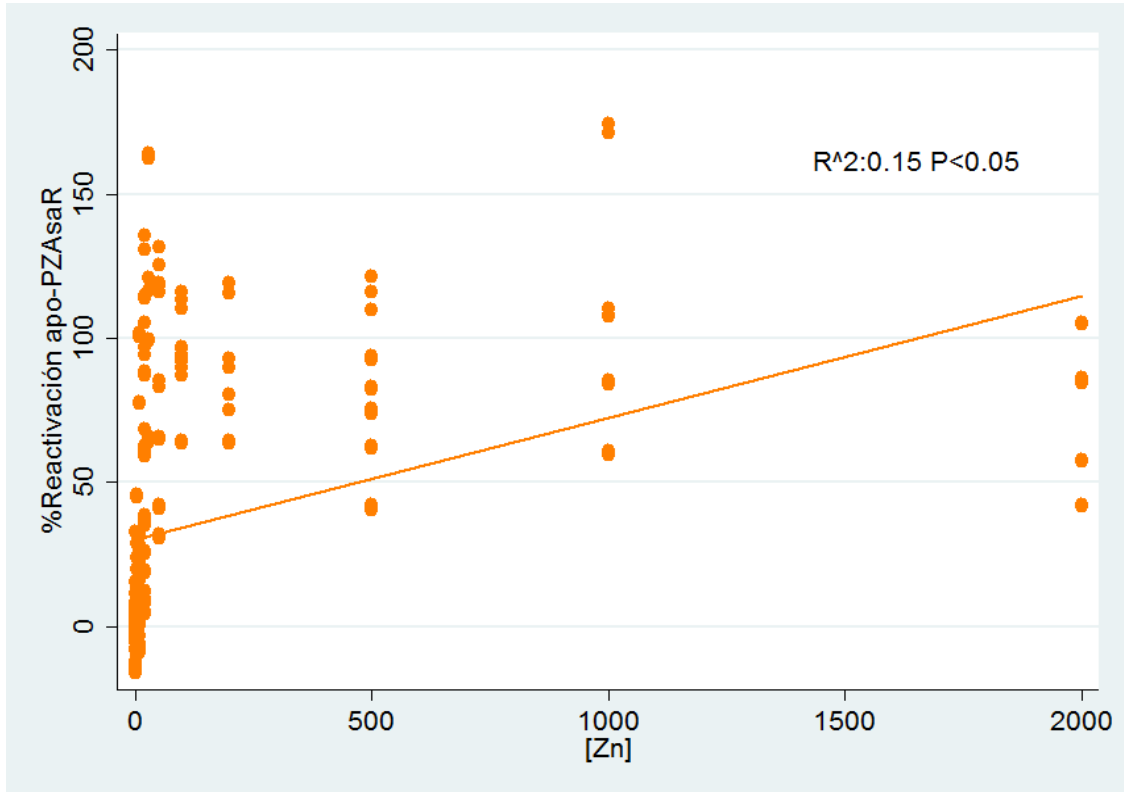


**B.** Baja concentración de tampón fosfato

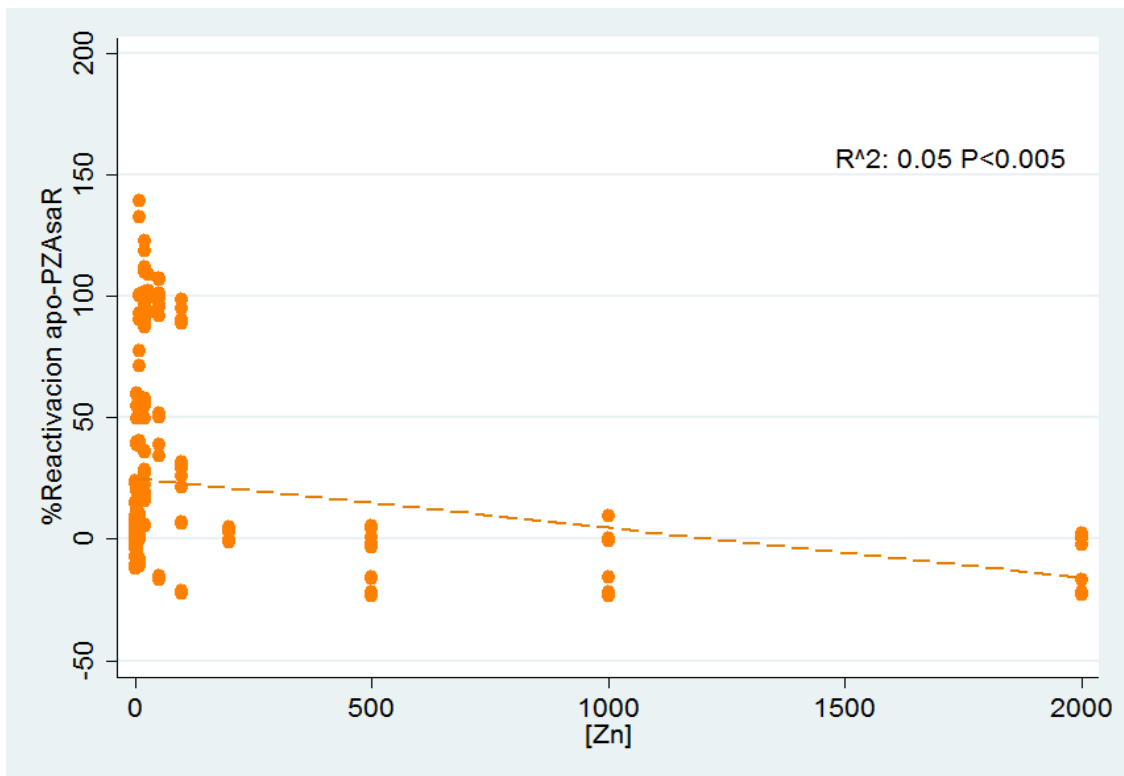




**Figura 6. Efecto positivo del  $Zn^{+2}$  sobre la reactivación de apo-PZAsaR.** Significancia estadística según análisis de regresión lineal ( $P < 0.05$ ). **A.** Alta concentración de tampón fosfato



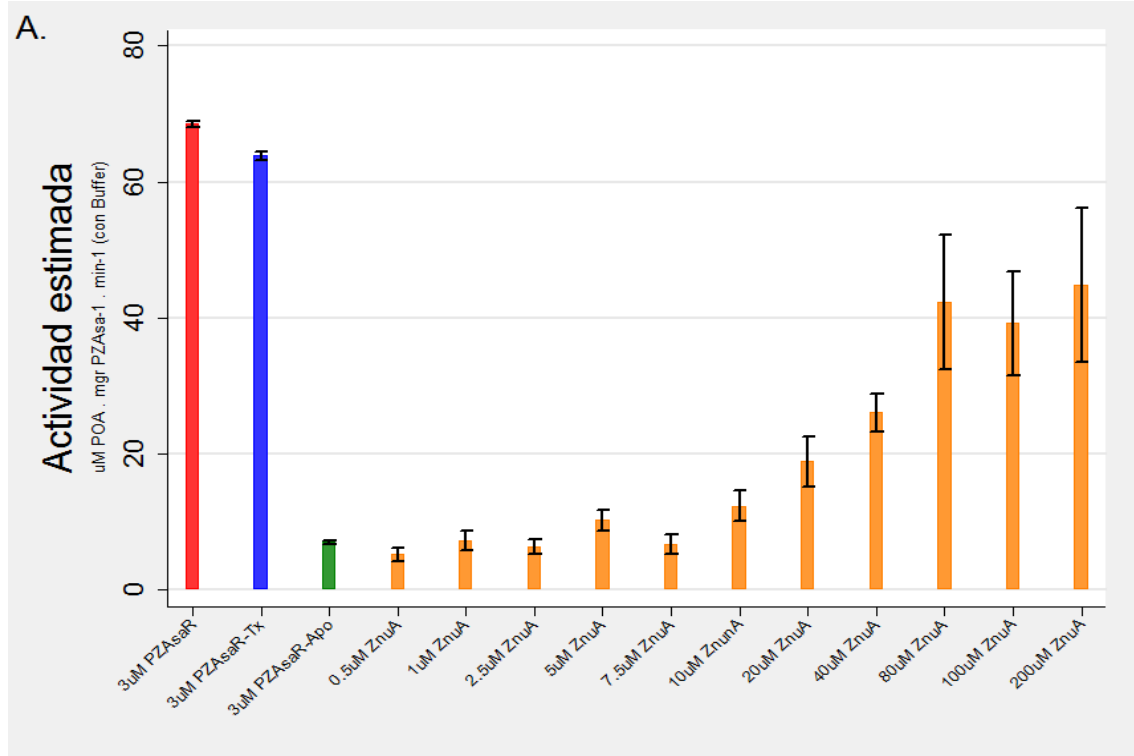
**B.** Baja concentración de tampón fosfato.



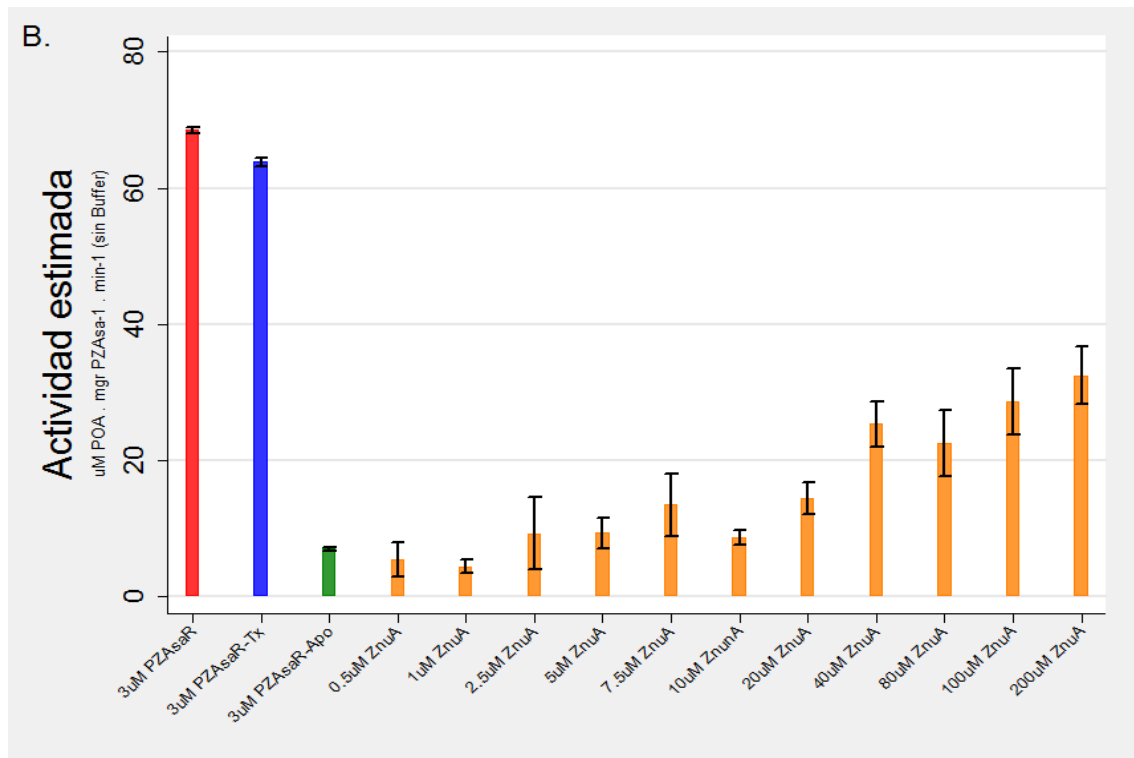
#### V.IV. Ensayos de actividad: Titulación de la apo-PZAsaR con ZnuA

La reactivación de la apo-PZAsaR utilizando la ZnuA llega hasta en 65% ( $44.7\mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) de la actividad de PZAsaR con concentraciones hasta de 200uM de ZnuA, en condiciones de alto tampón fosfato. La actividad pirazinamidasasa se recupera con 40uM, 80uM, 100uM y 200uM de ZnuA, con actividades de 26.1, 42.2, 39.1 y 44.7  $\mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ , respectivamente. Mientras que con concentraciones menores a 10uM de ZnuA no se reactiva la apo-PZAsaR. **(Figura 7A)** En baja concentración de tampón fosfato, se observa actividad a partir 40uM ( $25.3\mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ) de ZnuA hasta un máximo en 200uM de ZnuA ( $32.4 \mu\text{M POA} \times \text{mg PZAsa}^{-1} \times \text{min}^{-1}$ ). **(Figura 7B)** La reactivación en ambas condiciones presenta una tendencia positiva determinada al utilizar una regresión lineal ( $P < 0.05$  para cada uno de los coeficientes) **(Figura 8)**.

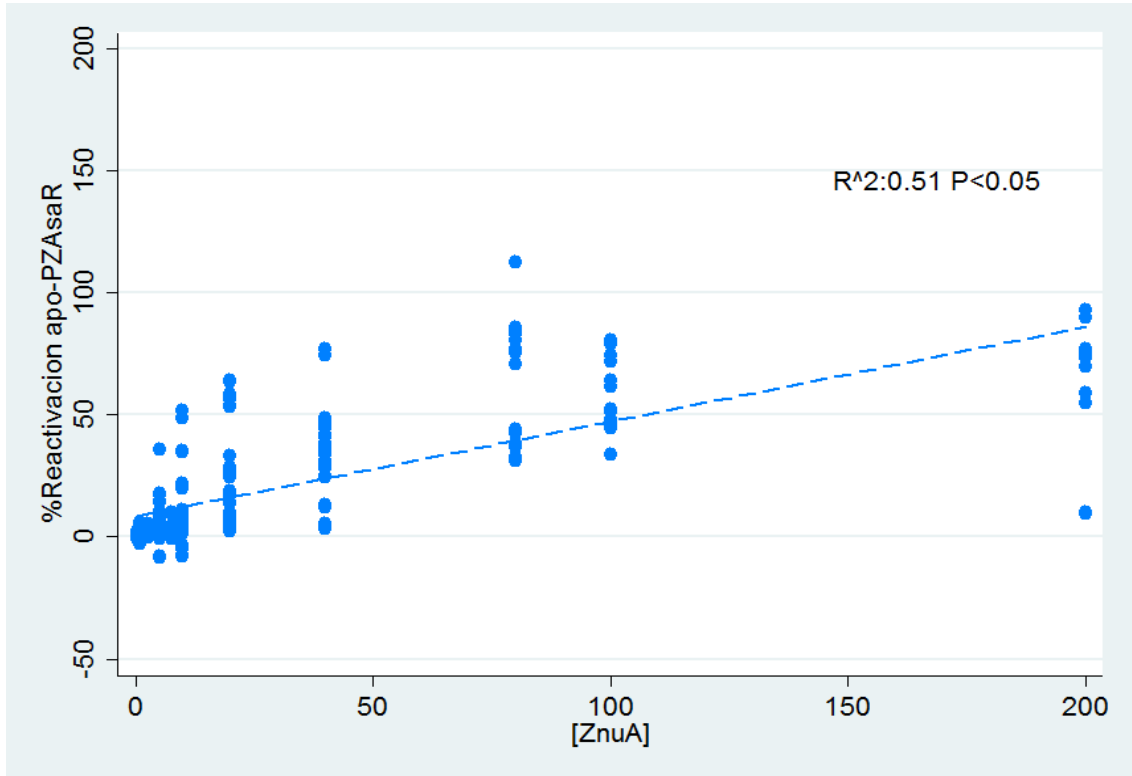
**Figura 7. Actividad promedio de apo-PZAsaR con ZnuA.** Las barras representan las medias y los bigotes representan el intervalo de confianza al 95%. **A.** Alta concentración de tampón fosfato.



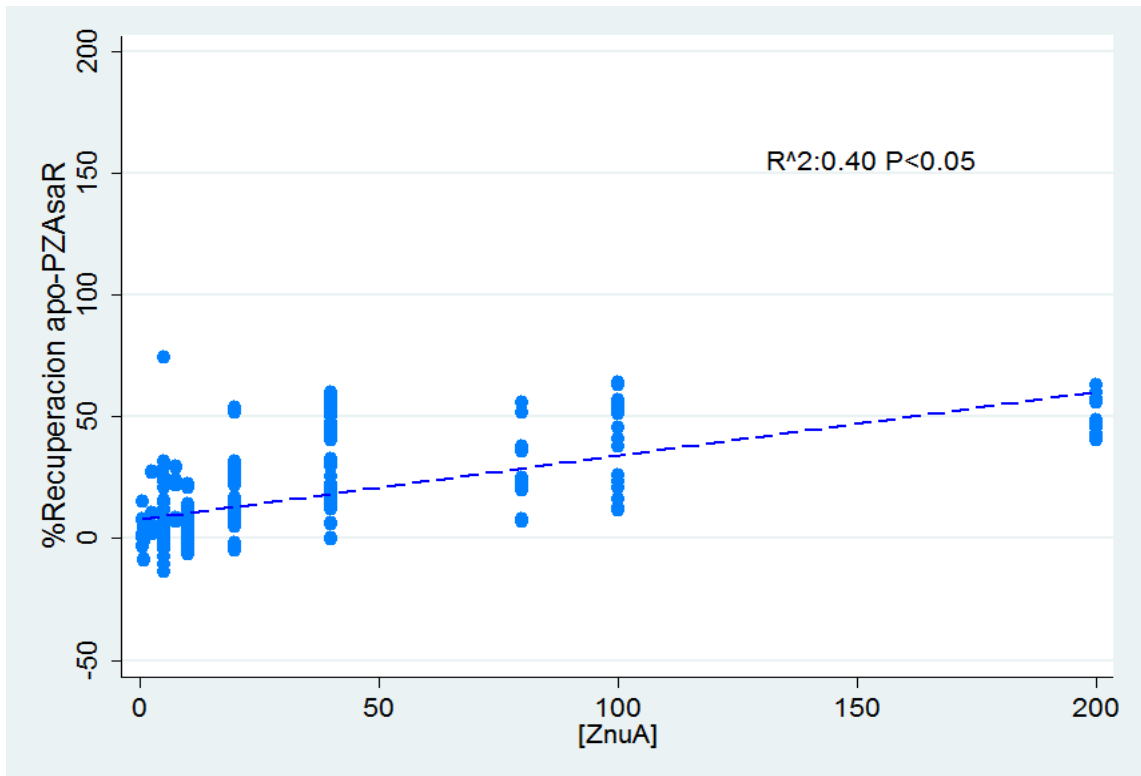
**B.** Baja concentración de tampón fosfato



**Figura 8. Efecto positivo del ZnuA sobre la reactivación de apo-PZAsaR. Significancia estadística según análisis de regresión lineal ( $P < 0.05$ ). A. Alta concentración de tampón fosfato.**



**B. Baja concentración de tampón fosfato**

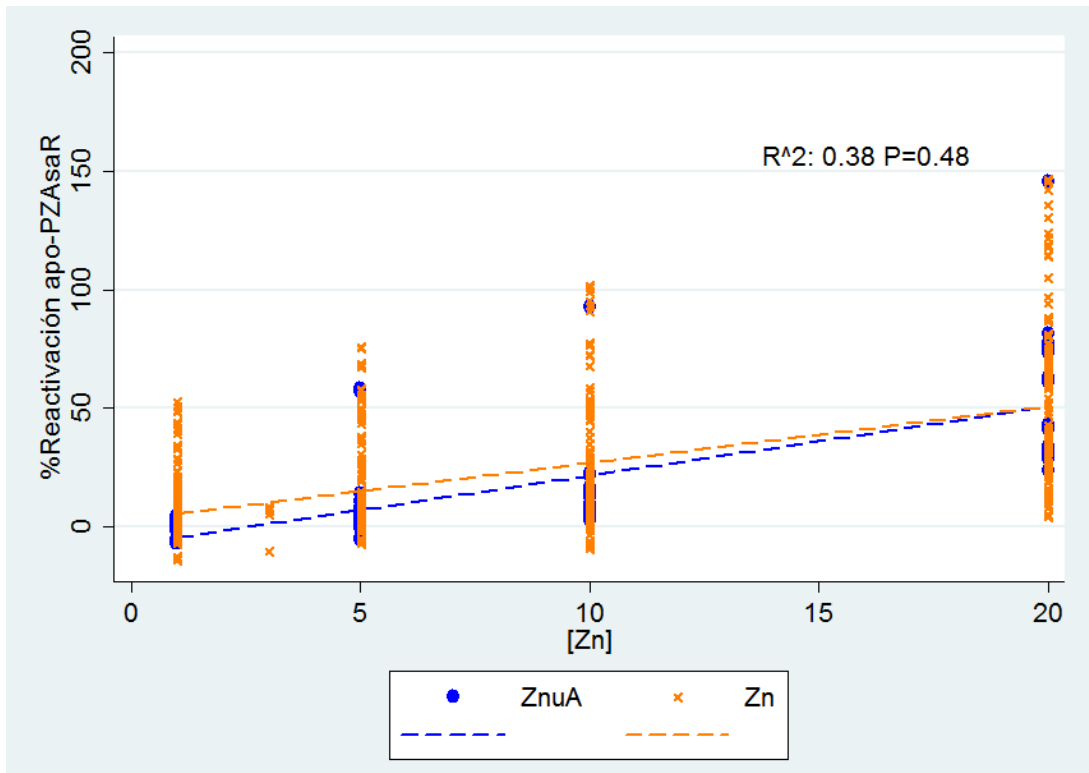


#### V.V. Ensayos de actividad: Determinar el efecto sinérgico de ZnuA y Zn<sup>+2</sup>

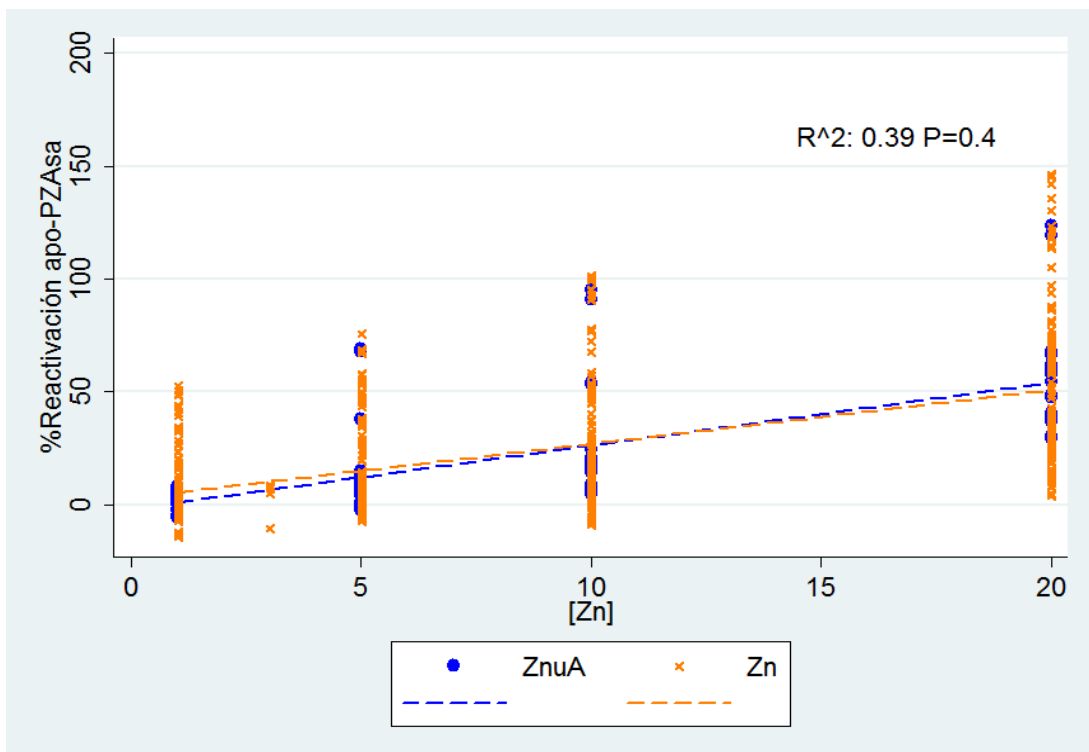
Los resultados anteriores muestran que el Zn<sup>+2</sup> y la ZnuA pueden reactivar la PZAsa individualmente. A pesar de que no se requieren concentraciones elevadas de cada uno, se decidió comprobar el efecto de ZnuA utilizando concentraciones menores (5uM hasta 40uM) de ZnuA suplementada con Zn<sup>+2</sup> para acercarse a las condiciones *in vivo* en las que ZnuA podría seguir captando Zn<sup>+2</sup> del medio para entregar a la apo-PZAsaR. La actividad de apo-PZAsaR (6.9 μM POA x mg PZAsa<sup>-1</sup> x min<sup>-1</sup>) no aumento con ninguna de las concentraciones de ZnuA (5uM, 10uM, 20uM y 40uM) suplementado con 1, 5 y 10 uM de Zn<sup>+2</sup> el porcentaje de reactivación no difiere significativamente (P>0.05, usando un modelo de regresión lineal múltiple) entre ZnuA suplementado con Zn<sup>+2</sup> y Zn<sup>+2</sup> solo. (**Figura 9-12**)

Al emplear el modelo de regresión, para cada condición de ZnuA, que determino que el único coeficiente significativo (P<0.05) es la concentración de Zn<sup>+2</sup>. Los coeficientes de la variable que determina la presencia o ausencia de ZnuA y la variable de interacción (concentración de Zn<sup>+2</sup> por presencia o ausencia de ZnuA) no son significativos (P> 0.05). Estos resultados muestran que el porcentaje de reactivación no se amplifica al suplementar ZnuA con Zn<sup>+2</sup> a comparación del uso de Zn<sup>+2</sup> al aumentar la concentración de Zn<sup>+2</sup>.

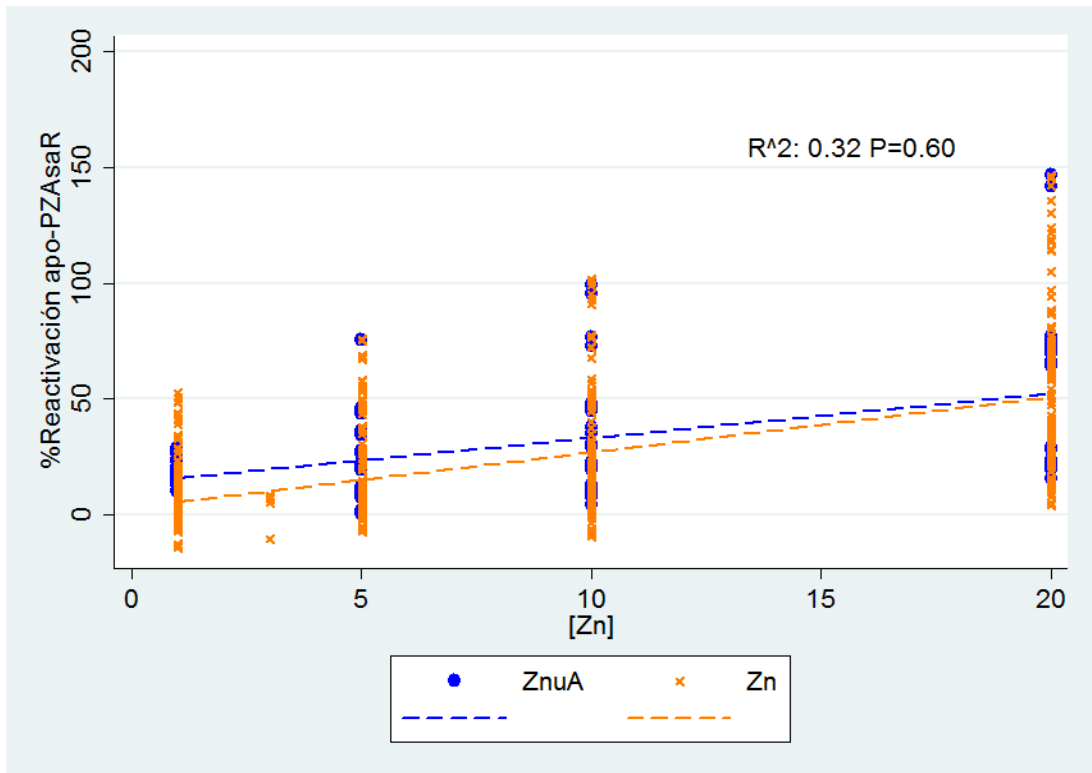
**Figura 9. Efecto de 5uM ZnuA+Zn<sup>+2</sup> sobre la reactivación de apo-PZAsaR.** Significancia estadística según análisis de regresión lineal múltiple (P>0.05).



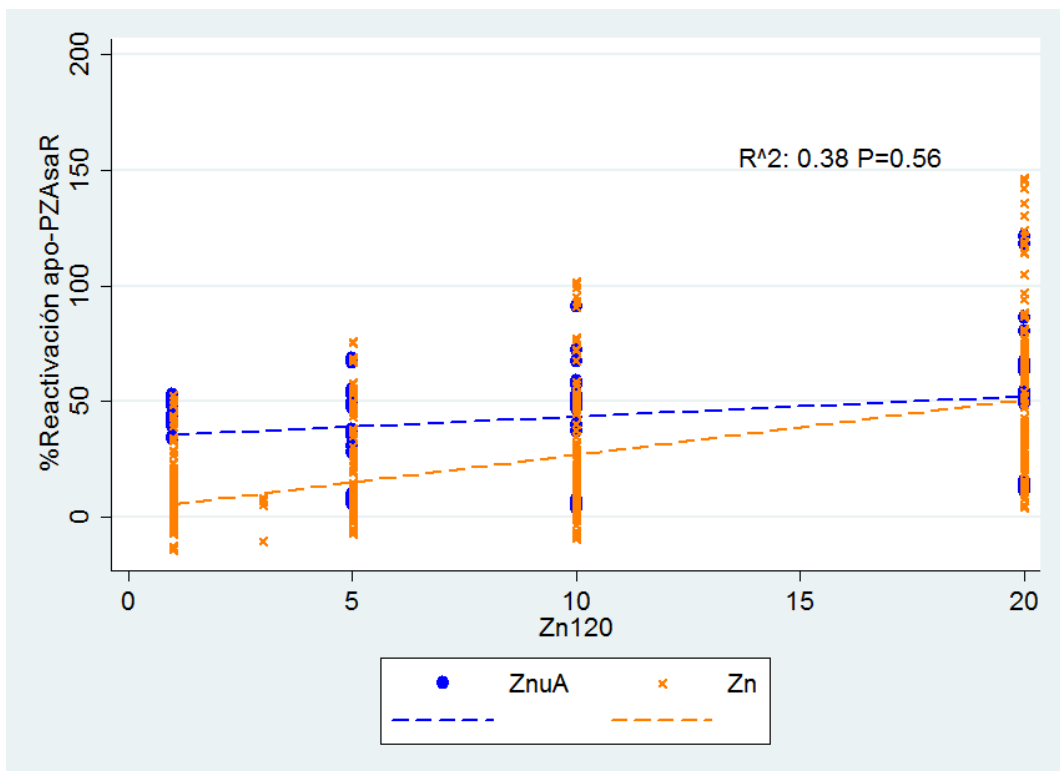
**Figura 10. Efecto de 10uM ZnuA+Zn<sup>+2</sup> sobre la reactivación de apo-PZAsaR.** Significancia estadística según análisis de regresión lineal múltiple (P>0.05).



**Figura 11. Efecto de 20uM ZnuA+Zn<sup>+2</sup> sobre la reactivación de apo-PZAsaR.**  
Significancia estadística según análisis de regresión lineal múltiple (P>0.05).



**Figura 12. Efecto de 40uM ZnuA+Zn<sup>+2</sup> sobre la reactivación de apo-PZAsaR.**  
Significancia estadística según análisis de regresión lineal múltiple (P>0.05).



## VI. Discusión

La expresión y purificación de ZnuA y PZAsa produjo proteínas solubles y funcionales, utilizando el sistema de expresión BL21 y LEMO21 que han sido previamente reportados que garantizan funcionalidad (35). Las proteínas se encuentran puras para realizar los ensayos (**Figura 1**) similar a otros estudios (14).

Las condiciones de alto y bajo efecto tampón influyen la recuperación de la actividad de la PZAsa con altas concentraciones de  $Zn^{+2}$  (**Figura 6**). El tampón fosfato contribuye una alta fuerza iónica a comparación de otros buffers (36) por lo que bajas concentraciones de tampón pueden regular el pH adecuadamente aun al agregar bajas concentraciones de  $Zn^{+2}$ . Además, utilizar altas concentraciones de tampón fosfato podría causar que precipiten iones polivalentes. (36) Sin embargo, no se observó precipitación en ninguna de las condiciones del tampón. Las condiciones de alto efecto tampón mantienen el pH en el rango adecuado para el funcionamiento de la PZAsa (13,32) aún al agregar concentraciones elevadas de  $Zn^{+2}$ . El Zinc es capaz de generar hidroxilos así aumentando el pH del medio. (37) Al encontrarse en condiciones con bajo efecto tampón, las variaciones en el pH afectan tanto la actividad como la estabilidad de la enzima. (38) Estas variaciones es dan solo con altas concentraciones de zinc, para concentraciones menores a 50uM la tendencia se mantiene en ambas condiciones (**Figura 5**).

La PZAsa de *E. coli* es capaz de recuperar actividad en presencia de  $Zn^{+2}$  *in vitro* con concentraciones de 30uM (**Figura 5A**) a diferencia de la PZAsa de MTB que recupera actividad con 1.5mM de  $Zn^{+2}$  (13). Es posible que diferencias estructurales entre la PZAsa de MTB y *E. coli* ocasionen la discrepancia, a pesar de que estas proteínas sean homologas (**Figura 13**).

Los resultados muestran que ZnuA en concentraciones mayores a 40uM y en ausencia de iones  $Zn^{+2}$  es capaz de reactivar la PZAsa de *E. coli*, sin diferenciar entre alto o bajo efecto tampón. Lo que nos indica que es una proteína estable. Sin embargo, la reactivación de la apo-PZAsa de *E. coli* utilizando la ZnuA no llega al 100% con concentraciones hasta de 200uM ZnuA (**Figura 8**). Mientras que concentraciones



equivalentes de  $Zn^{+2}$  (30uM) muestran una recuperación completa de la actividad (**Figura 5A**). Por otro lado, la reactivación completa de la apo-PZAsa de MTB se da con concentraciones de 100uM de ZnuA (14). Esta diferencia sugiere que la ZnuA de *E. coli* no interactúa *in vivo* con la PZAsa del mismo organismo a pesar de la afinidad que puede tener con la PZAsa de MTB u otro organismo(14).

La estequiometría de  $Zn^{+2}$ : ZnuA ha sido reportada como 2:1, o 1:1 entre las moléculas (14,24,39). Lo que indica que cada molécula de ZnuA es capaz de coordinar hasta dos moléculas de  $Zn^{+2}$ . ZnuA tiene dos sitios de unión a  $Zn^{+2}$  al primer tiene una afinidad elevada ( $K_d < 20nM$ ) al  $Zn^{+2}$  (39). Durante el proceso de purificación y concentración de ZnuA se realizan una serie de lavados en medios libres de  $Zn^{+2}$ , durante estos lavados se equilibra el  $Zn^{+2}$  en el medio. Por lo que al final de los lavados ZnuA tiene una relación 1:1 con  $Zn^{+2}$  (14). Al realizar el ensayo, en ausencia de  $Zn^{+2}$  libre, se vuelen a equilibrar las concentraciones de  $Zn^{+2}$  en el medio, por lo que algunas moléculas de ZnuA espontáneamente perdería una molécula de  $Zn^{+2}$  (40). Esta molécula de  $Zn^{+2}$  libre puede reactivar la apo-PZAsaR o volver a interactuar con ZnuA (41). Esto explica porque no hay una reactivación completa de apo-PZAsaR con ninguna de las concentraciones ensayadas.

Con el fin de comprobar si existe sinergismo entre ZnuA y  $Zn^{+2}$  para reactivar la apo-PZAsaR se agregó concentraciones crecientes de  $Zn^{+2}$  a la reacción de ZnuA con apo-PZAsaR (**Tabla 2**). Debido a que ambas proteínas son estables frente a cambios de pH con bajas concentraciones de  $Zn^{+2}$ , solo se evaluó la condición con alto efecto tampón. Se encontró que el porcentaje de reactivación no difiere entre ZnuA suplementado con  $Zn^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  solo (**Figura 9-12**). Al agregar  $Zn^{+2}$  se equilibra las concentraciones de  $Zn^{+2}$  libre; entonces no se liberan espontáneamente iones coordinados con ZnuA. En el caso que hubiera interacción entre ZnuA y PZAsa esperaríamos un efecto aditivo entre la actividad causada la agregar  $Zn^{+2}$  y ZnuA individualmente o bien un sinergismo entre ambos, como se encontró en MTB (14). Sin embargo al comparar  $Zn^{+2}$  solo con ZnuA y  $Zn^{+2}$  estos ensayos no muestran sinergismo entre  $Zn^{+2}$  y ZnuA para la reactivación de la apo-PZAsa de *E. coli* (**Figura 9-12**), mas bien no hay diferencia. Esto indica que la ZnuA no interactúa con la PZAsa.

Las concentraciones de  $Zn^{+2}$  libre *in vivo* se encuentran en el rango de 20pM, sin embargo las concentraciones celulares coordinadas de Zinc se encuentran alrededor de 200uM (15,41). La PZAsa de *E. coli* es más eficiente que su homóloga en MTB (13,14) por lo que es posible que PZAsa en *E. coli* no requiera una metalochaperona, sino un sistema eficiente de importación de  $Zn^{+2}$ . Es posible también que otras chaperonas que no coordinen Zn estén involucradas en un plegamiento localizado, es decir que el plegamiento de PZAsa se de en lugares específicos con una mayor concentración de zinc.(28) Las chaperonas GroEL, Trig y Dnak se encuentran sobre expresadas en condiciones *in vivo* de 250uM de Zinc. (42) Los resultados obtenidos concuerdan con que ZnuA es una proteína periplasmática por lo que es poco probable que esta proteínas se encuentre con la PZAsa *in vivo* en *E. coli* a pesar de los resultados que indican que una proteína similar a ZnuA puede ser la metalochaperona para PZAsa en MTB (14) en *E. coli* ZnuA no cumple este rol. En *E. coli* no se han encontrado metalochaperonas de  $Zn^{+2}$  citoplasmáticas (43) sin embargo en *Acinetobacter baumannii* se ha encontrado la metalochaperona, ZigA en el citoplasma. (44) Este organismo también contiene PZAsa endógeno que tiene una homología de 37% con la PZAsa de MTB (12) y podría servir de modelo para comprobar la necesidad de una metalochaperona para la reactivación de PZAsa.

## VII. Conclusión

Se obtuvieron dos proteínas PZAsa y ZnuA, solubles, puras y funcionales que fueron utilizadas para los ensayos de reactivación. La condición de alto efecto tampón otorga mayor estabilidad a la PZAsa por lo que nos permite sacar las siguientes conclusiones. La reactivación completa de apo-PZAsaR de *E. coli* se obtuvo con 30uM de  $Zn^{+2}$ . Mientras que al utilizar ZnuA hasta 200uM se recuperó el 60% de la actividad de apo-PZAsaR. Al enfrentar apo-PZAsaR, ZnuA y  $Zn^{+2}$  no se encontró interacción entre PZAsa y ZnuA, por lo que no sería posible un sinergismo entre  $Zn^{+2}$  y ZnuA para la reactivación de la apo-PZAsaR de *E. coli*. Lo que se explica por qué ZnuA es una proteína periplasmática por lo que no interactúa *in vivo* con la PZAsa citoplasmática de *E. coli*.

## VIII. Referencias bibliográficas

1. WHO. Global Tuberculosis Report 2017. 2017. 1-262 p.
2. Pfyffer GE. Mycobacterium: General Characteristics, Laboratory Detection, and Staining Procedures. In: Manual of Clinical Microbiology, 11th Edition. American Society of Microbiology; 2015. p. 536–69.
3. Steele M, Des Prez R. The Role of Pyrazinamide in Tuberculosis Chemotherapy. *Chest J.* 1988;94(4):845–50.
4. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. *Microbiol Spectr.* 2013;2(4):1–12.
5. Zhang Y, Wade MM, Scorpio A, Zhang H, Sun Z. Mode of action of pyrazinamide: Disruption of Mycobacterium tuberculosis membrane transport and energetics by pyrazinoic acid. *J Antimicrob Chemother.* 2003;52(5):790–5.
6. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2003;7(1):6–21.
7. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide inhibits trans-translation in Mycobacterium tuberculosis. *Science.* 2011 Sep;333(6049):1630–2.
8. Zhang Y, Permar S, Sun Z. Conditions that may affect the results of susceptibility testing of Mycobacterium tuberculosis to pyrazinamide. *J Med Microbiol.* 2002;51(1):42–9.
9. Zhang H, Deng JY, Bi LJ, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, et al. Characterization of Mycobacterium tuberculosis nicotinamidase/ pyrazinamidase. *FEBS J.* 2008;275(4):753–62.
10. Frothingham R, Meeker-O’Connell W a, Talbot E, George JW, Kreuzer KN. Identification, cloning and expression of the Escherichia coli pyrazinamidase and

- nicotinamidase gene, pnc A. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(6):1426–31.
11. Du X, Wang W, Kim R, Yakota H, Nguyen H, Kim SH. Crystal structure and mechanism of catalysis of a pyrazinamidase from *Pyrococcus horikoshii*. *Biochemistry.* 2001;40(47):14166–72.
  12. Petrella S, Gelus-Ziental N, Maudry A, Laurans C, Boudjelloul R, Sougakoff W. Crystal structure of the pyrazinamidase of mycobacterium tuberculosis: Insights into natural and acquired resistance to pyrazinamide. *PLoS One.* 2011;6(1).
  13. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, Christiansen G, Moreno-Román P, Gutiérrez AH, et al. Role of metal ions on the activity of *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase. *Am J Trop Med Hyg.* 2012;87(1):153–61.
  14. Huerta R. Efecto de la metalochaperona ZnuA de *Escherichia Coli* en la activación de la metaloenzima pirazinamidasa de *Mycobacterium Tuberculosis*. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2016.
  15. Wang D, Hurst TK, Thompson RB, Fierke CA. Genetically encoded ratiometric biosensors to measure intracellular exchangeable zinc in *Escherichia coli*. *J Biomed Opt.* 2011;16(8):87011.
  16. Juárez-Hernández R, Zhu H, Miller M. Siderophore-Mediated Iron Acquisition: Target for the Development of Selective Antibiotic Towards *Mycobacterium tuberculosis*. In: Byers BR, editor. *Iron Acquisition by the Genus Mycobacterium*. Heidelberg: Springer Science & Business Media; 2013. p. 65–88. (SpringerBriefs in Molecular Science).
  17. Voss JJ De, Rutter K, Schroeder BG, Iii CEB, Voss JJDE. Iron Acquisition and Metabolism by *Mycobacteria* MINIREVIEW Iron Acquisition and Metabolism by *Mycobacteria*. *Society.* 1999;181(15):4443–51.
  18. Quadri LEN. Iron Uptake in *Mycobacteria*. In: Daffé M, Reyrat J-M, editors. *The Mycobacterial Cell Envelope*. Washington DC: American Society of Microbiology;

2008. p. 167–83.

19. O'Halloran T V., Culotta VC. Metallochaperones, an intracellular shuttle service for metal ions. *J Biol Chem.* 2000;275(33):25057–60.
20. Rosenzweig AC. Minireview Metallochaperones: Bind and Deliverers copper to the Menkes and Wilson disease ATPases. *Chem Biol.* 2002;9(2):673–7.
21. Allen Easton J, Thompson P, Crowder MW. Time-dependent translational response of *E. coli* to excess Zn(II). *J Biomol Tech.* 2006;17(5):303–7.
22. Patzer SI, Hantke K. The Zinc-responsive Regulator Zur and Its Control of the *znu* Gene Cluster Encoding the ZnuABC Zinc Uptake System in *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* 2000;275(32):24321–32.
23. Chandra BR, Yogavel M, Sharma A. Structural Analysis of ABC-family Periplasmic Zinc Binding Protein Provides New Insights Into Mechanism of Ligand Uptake and Release. *J Mol Biol.* 2007;367(4):970–82.
24. Li H, Jogl G. Crystal Structure of the Zinc-binding Transport Protein ZnuA from *Escherichia coli* Reveals an Unexpected Variation in Metal Coordination. *J Mol Biol.* 2007;368(5):1358–66.
25. Lucarelli D, Russo S, Garman E, Milano A, Meyer-Klaucke W, Pohl E. Crystal structure and function of the zinc uptake regulator FurB from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Biol Chem.* 2007;282(13):9914–22.
26. Riccardi G, Milano A, Pasca MR, Nies DH. Genomic analysis of zinc homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Microbiol Lett.* 2008;287(1):1–7.
27. Maciąg A, Dainese E, Rodriguez GM, Milano A, Proveddi R, Pasca MR, et al. Global analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) regulon. *J Bacteriol.* 2007;189(3):730–40.
28. Valdez CE, Smith QA, Nechay MR, Alexandrova AN. Mysteries of metals in metalloenzymes. *Acc Chem Res.* 2014;47(10):3110–7.

29. Bisswanger H. Enzyme assays. *Perspect Sci*. 2014;1:41–55.
30. Singh P, Mishra AK, Malonia SK, Chauhan DS, Sharma VD, Venkatesan K, et al. The paradox of pyrazinamide: an update on the molecular mechanisms of pyrazinamide resistance in *Mycobacteria*. *J Commun Dis*. 2006 Mar;38(3):288–98.
31. Yüksel P, Tansel Ö. Characterization of *pncA* mutations of pyrazinamide-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Turkey. *New Microbiol*. 2009;32(2):153–8.
32. Sheen P, Ferrer P, Gilman RH, López-Llano J, Fuentes P, Valencia E, et al. Effect of pyrazinamidase activity on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis*. 2009;89(2):109–13.
33. Wayne L. Simple pyrazinamidase and urease tests for routine identification of mycobacteria. *Am Rev Respir Dis*. 1974;109(1):147–51.
34. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976;72(1–2):248–54.
35. Rosano GL, Ceccarelli EA. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: Advances and challenges. *Front Microbiol*. 2014;5(APR):1–17.
36. Good NE, Izawa S. Photosynthesis and Nitrogen Fixation. *Methods Enzymol*. 1972;24:53–68.
37. Degen A, Kosec M. Effect of pH and impurities on the surface charge of zinc oxide in aqueous solution. *J Eur Ceram Soc*. 2000;20(6):667–73.
38. Talley K, Alexov E. On the pH-optimum of activity and stability of proteins. *Proteins*. 2010;78(12):2699–706.
39. Yatsunyk L a, Easton JA, Kim LR, Sugarbaker S a, Bennett B, Breece RM, et al. Structure and metal binding properties of ZnuA, a periplasmic zinc transporter from *Escherichia coli*. *J Biol Inorg Chem*. 2008;13(2):271–88.

40. IRVING H, WILLIAMS RJP. Order of Stability of Metal Complexes. *Nature*. 1948;162(4123):746–7.
41. Outten CE. Femtomolar Sensitivity of Metalloregulatory Proteins Controlling Zinc Homeostasis. *Science* (80- ). 2001;292(5526):2488–92.
42. Sigdel TK, Cilliers R, Gursahaney PR, Thompson P, Easton JA, Crowder MW. Probing the adaptive response of *Escherichia coli* to extracellular Zn(II). *BioMetals*. 2006 Oct;19(5):461–71.
43. Sigdel TK, Cilliers R, Gursahaney PR, Thompson P, Easton JA, Crowder MW. Probing the adaptive response of *Escherichia coli* to extracellular Zn(II). *BioMetals*. 2006;19(5):461–71.
44. Capdevila DA, Edmonds, Katherine A. Giedroc DP. Metallochaperones and metalloregulation in bacteria. *Essays Biochem*. 2017;61(2):177–200.

## IX. Anexos

**Tabla 3. Esquema de titulación de la apo-PZAsa con Zn<sup>+2</sup>**

	[] inicial	[] final	Blanco	Nativa	Control	Quelada																
						0	0.25	0.5	1	1.5	2	3	5	10	20	30	50	75	100	200	500	
PZAsaR	764uM	3uM	0.4	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PZAsaR-Tx	158.8uM	3uM	-	-	1.8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apo-PZAsaR	198.9uM	3uM	-	-	-	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6	1.6
Buffer Fosfato pH6.4	1M	50mM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Zn <sup>+2</sup>	100uM	0.25uM	-	-	-	-	0.25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	0.5uM	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	1uM	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	1.5uM	-	-	-	-	-	-	-	1.5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	2uM	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	3uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	100uM	5uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000uM	10uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	-
	1000uM	20uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-
	10000uM	30uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.3	-	-	-	-	-	-
	10000uM	50uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-	-	-	-
	10000uM	75uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.75	-	-	-	-
	10000uM	100uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-
	10000uM	200uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2	-
	10000uM	500uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	5
Agua Ultra Pura			99.6	83.1	81.7	82	81.8	81.5	81	80.4	81	79	77	81	80	81.7	81.5	81.25	81	80	77	77
PZA	121mM	20mM	-	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5



**Tabla 4. Esquema de titulación de la apo-PZAsa con ZnuA**

	[] inicial	[] final	Blanco	Nativa	Control	Quelada												
						0	0.5	1	2.5	5	7.5	10	20	40	80	100	200	
PZAsaR	896uM	3uM	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
PZAsaR-Tx	155uM	3uM	-	-	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Apo-PZAsaR	288.8uM	3uM	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
Buffer Fosfato pH 6.4	1M	50mM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
ZnuA	70.967uM	0.5uM	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	70.967uM	1uM	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
	709.67uM	2.5uM	-	-	-	-	-	-	0.2	-	-	-	-	-	-	-	-	
	709.67uM	5uM	-	-	-	-	-	-	-	0.4	-	-	-	-	-	-	-	
	709.67uM	7.5uM	-	-	-	-	-	-	-	-	0.6	-	-	-	-	-	-	
	709.67uM	10uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	
	709.67uM	20uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	
	709.67uM	40uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.5	-	-	-	
	709.67uM	80uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8.7	-	-	
	709.67uM	100uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	17.5	-	
	709.67uM	200uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	35	
Agua Ultra Pura	-	-	99.7	83.2	81.6	82.5	82.1	81.6	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	82.5	65
PZA	121mM	20mM	-	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5

**Tabla 5. Esquema de titulación de la apo-PZAsa con ZnuA y Zn<sup>+2</sup>**

	[] inicial	[] final	Blanco	Nativo	Control	Quelada	Quelada							
							ZnuA_5	ZnuA_10	ZnuA_20	ZnuA_40	ZnuA_0			
							Zn_0				Zn_1	Zn_5	Zn_10	Zn_20
PZAsaR	896uM	3uM	0.3	0.3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PZAsaR-Tx	155uM	3uM	-	-	1.9	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apo-PZAsaR	288.8uM	3uM	-	-	-	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Zn <sup>+2</sup>	100uM	1uM	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	-
	1000uM	5uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0.5	-	-
	1000uM	10uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
	1000uM	20uM	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2
ZnuA	709.67uM	5uM	-	-	-	-	0.45	-	-	-	-	-	-	-
	709.67uM	10uM	-	-	-	-	-	0.9	-	-	-	-	-	-
	709.67uM	20uM	-	-	-	-	-	-	1.8	-	-	-	-	-
	709.67uM	40uM	-	-	-	-	-	-	-	3.6	-	-	-	-
Buffer Fosfato pH6.4	1M	50mM	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Agua Ultra Pura	-	-	94.7	78.2	76.6	77.5	77.05	76.6	75.7	73.9	76.5	77	76.5	75.5
PZA	121mM	20mM	-	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5

	Quelada															
	ZnuA_5				ZnuA_10				ZnuA_20				ZnuA_40			
	Zn_1	Zn_5	Zn_10	Zn_20	Zn_1	Zn_5	Zn_10	Zn_20	Zn_1	Zn_5	Zn_10	Zn_20	Zn_1	Zn_5	Zn_10	Zn_20
PZAsaR	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
PZAsaR-Tx	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Apo-PZAsaR	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
Zn <sup>+2</sup>	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-
	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-	-	0.5	-	-
	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-	-	-	1	-
	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2	-	-	-	2
ZnuA	0.45	0.45	0.45	0.45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	0.9	0.9	0.9	0.9	-	-	-	-	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	1.8	1.8	1.8	1.8	-	-	-	-
	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3.6	3.6	3.6	3.6
Buffer Fosfato pH6.4	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
Agua Ultra Pura	76.05	76.55	76.45	75.05	75.6	76.1	75.6	74.6	74.7	75.2	74.7	73.7	72.9	73.4	72.9	71.9
PZA	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5	16.5

Figura 13. Comparación de las secuencias de la pirazinamidasasa de *E. coli* (Query) y *Mycobacterium tuberculosis* (Subject)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
47.0 bits(110)	6e-12	Compositional matrix adjust.	32/92(35%)	49/92(53%)	21/92(22%)
Query 4	RALLLVDLQNDFCAGGALAVPEGDSTVDVANRLIDWCQSRGEA--VIASQDWH--PANHG				59
	RAL++VD+QNDFC GG+LAV G + +A + D+ + V+A++D+H P +H				
Sbjct 2	RALIIVDVQNDFC EGGSLAVTGGAA---LARAISDYLAEEAADYHHVAVTKDFHIDPGDHF				58
Query 60	SFASQHGVEPYTPGQLDGLPQTFWPDHCVQNS		91		
	S G Y+ + WP HCV +				
Sbjct 59	S-----GTPDYS-----SSWPPHCVSGT		76		

Figura 14. Comparación de las secuencias de la ZnuA de *E. coli* (Query) y RV2059 de *Mycobacterium tuberculosis* (Subject)

Score	Expect	Method	Identities	Positives	Gaps
42.4 bits(98)	9e-09	Compositional matrix adjust.	38/147(26%)	62/147(42%)	24/147(16%)
Query 36	GFIASAIADG-VTETEVLDPDGASEHDYSLRPSDVKRLQADLVVWVGPEMEAFMQKPVS				94
	G +A A+ G V +L A H Y P+D + +A+LV++ G + ++ + ++				
Sbjct 112	GSVARAVTGGHVPVKSILTGAHADPHSYQASPADAAAIVDAELVIYNGGGYDPWVDQVLA				171
Query 95	KLPGAKQVTIAQLEDVKPLLMKSIHGDDDDHDAEKSDDEDHHHGDFNMHLWLSPEIARAT				154
	PG + V D LL GDDD N H++ P +A+A				
Sbjct 172	GHPGVQAV-----DAYSLLGAV--GDDAP-----NEHVIFYDPNVAKAV				208
Query 155	AVAIHGKLVELMPQSRAKLDANLKDFE		181		
	A I +L +L P + AN +F				
Sbjct 209	AATIADRLADLPSNSGNYRANAAEFS		235		