

UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA
FACULTAD DE CIENCIAS Y FILOSOFÍA “ALBERTO CAZORLA TALLERÍ”



**EFFECTO DE MUTACIONES EN GENES DISTINTOS A *pncA* EN CEPAS DE
MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS RESISTENTES A PIRAZINAMIDA QUE
PRESENTAN ACTIVIDAD PARCIAL DE PIRAZINAMIDASA.**

**TRABAJO DE INVESTIGACIÓN PARA OPTAR EL GRADO DE BACHILLER
EN CIENCIAS CON MENCIÓN EN BIOLOGÍA**

AUTORES:

ROMINA AMBROSINI DEFENDI

EMILIO SOPPRANI MARTINEZ

ASESOR:

PATRICIA SHEEN CORTAVARRIA

Unidad de Bioinformática y Biología Molecular

LIMA, PERÚ

2021

ÍNDICE

RESUMEN.....	3
ABSTRACT	4
1. ESTADO DEL ARTE:.....	5
I. Mecanismos de Acción de Pirazinamida (PZA).....	5
I.A. Disrupción del potencial de membrana.....	5
I.B. Otros blancos moleculares específicos de PZA	7
II. Origen Multifactorial de la resistencia a PZA	8
II.A. Mutaciones en el gen <i>pncA</i>	8
II.B. Mutaciones en <i>panD</i> y <i>clpC1</i>	9
II.C. Mutaciones en <i>GpsI/ PNPasa</i>	12
II.D. Mutaciones en otros genes.....	14
III. Herramientas probables para el estudio de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	16
III.A. Generación de KOs e interferencia en <i>M. tuberculosis</i>	16
III.B. Expresión de Genes exógenos en <i>M. tuberculosis</i>	17
2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	18
3. ESTRATEGIAS DE ABORDAJE.....	20
BIBLIOGRAFÍA.....	21
ANEXOS.....	24

RESUMEN

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por una infección del bacilo *Mycobacterium tuberculosis*. Su tratamiento es complejo ya que existen muchas cepas que son resistentes a las drogas, tanto de primera como de segunda línea, que se utilizan normalmente para tratarlos. A los casos resistentes a rifampicina e isoniazida se les conoce como multi-drogo resistentes (MDR-TB) (1). En el estudio realizado por Sheen et al. se encontró que en Perú al menos 30% de los casos de MDR-TB también son resistentes a la pirazinamida (3).

La pirazinamida (PZA) es una prodroga que se utiliza como tratamiento de primera línea ante TB gracias a su capacidad de eliminar a los bacilos en fase latente. La PZA se activa intracelularmente, donde es convertida en ácido pirazinoico (POA) por la enzima pirazinamidasa (PZAasa). La resistencia a PZA puede ser causada por múltiples factores; siendo el principal factor asociado a la resistencia, la pérdida de actividad de PZAasa por mutaciones en el gen *pncA*. Quiliano et al. demostró que la estructura de la PZAasa y su actividad enzimática no están relacionadas a la resistencia a PZA (2). Sheen et al. demostró que las mutaciones en el gen *pncA* atribuyen sólo al 27.3% de la resistencia a PZA; ya que la cepa es resistente cuando la actividad de la PZAasa es nula; sin embargo, las mutaciones en *pncA* que causan pérdida parcial de actividad no son suficientes para explicar la resistencia ya que el nivel conservado de actividad de PZAasa permite la conversión de PZA a POA en dichas cepas (3).

En el presente estudio se evaluará la contribución de otros genes a la resistencia a PZA en cepas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv resistentes a PZA que presentan mutaciones en *pncA* pero que conservan actividad PZAasa.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, pirazinamidasas, resistencia, mutaciones, *pncA*

ABSTRACT

Tuberculosis is a disease caused by the infection of the bacillus *Mycobacterium tuberculosis*. Its treatment can be complex due to the existence of strains resistant to first- and second-line drugs such as rifampicin and isoniazid, which are known as multi-drug resistant strains (MDR-TB) (1). (2). Sheen et al. found that at least 30% of MDR-TB cases in Peru show pyrazinamide resistant strains (3).

Pyrazinamide (PZA) is a pro-drug used as a first-line treatment for TB by reason of its ability to eliminate latent-phase bacilli. PZA is activated intracellularly, where it is converted into pyrazinoic acid (POA) by the enzyme pyrazinamidase (PZAase). PZA resistance can be caused by many factors; being the loss of PZAase activity by mutations in the *pncA* gene the principal factor associated to resistance. Quiliano et al. demonstrated that PZAase structure and enzymatic activity are not related to PZA resistance (2). When PZAase activity is nonexistent, the strain is completely PZA resistant; however, partial loss of activity caused by *pncA* mutations failed to explain resistance by itself, since the conserved PZAase activity is enough to allow the conversion of PZA to POA in these strains (3).

The present report intends to evaluate the contribution of the genetic background to the resistance to PZA in strains of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv which are resistant to PZA and exhibit mutations in *pncA* but conserve PZAase activity.

Key words: *Mycobacterium tuberculosis*, pyrazinamidase, resistance, mutations, *pncA*

1. ESTADO DEL ARTE:

I. Mecanismos de Acción de Pirazinamida (PZA)

La pirazinamida (PZA) es una droga que tiene la capacidad de reducir el periodo de tratamiento de la Tuberculosis de 12 a 6 meses gracias a su alta efectividad contra bacterias en estado de latencia que las demás drogas no logran eliminar (4). Esto se debe a que tiene una alta actividad esterilizante en un medio ácido que se presenta típicamente durante la inflamación característica de la enfermedad (4).

A pesar de ser una de las drogas más importantes en la terapia contra la tuberculosis, su mecanismo de acción no es comprendido del todo. Se sabe que la PZA es una pro-droga que ingresa a la célula mediante difusión pasiva donde se hidroliza a ácido pirazinoico (POA) gracias a la enzima nicotinamidasas/ pirazinamidasas (PZAasa) codificada por el gen *pncA*. El POA sale de la célula mediante bombas de eflujo y se protona en el medio extracelular con pH ácido de 5.5 aproximadamente. Luego de protonarse ingresa a la célula y se desprotona intracelularmente alterando la función celular normal mediante la acidificación del citoplasma y la inhibición del funcionamiento normal de enzimas vitales. Además, el POA causa letalidad a la bacteria mediante la alteración del potencial de la membrana, la inhibición de la producción de energía, la inhibición de la traducción, la inhibición de biosíntesis de CoA, y otros mecanismos que se discutirán con detalle más adelante (Anexo 1) (4,5).

I.A. Disrupción del potencial de membrana

Es importante que el potencial de membrana de *M. tuberculosis* se pueda mantener ya que es necesario para el transporte de nutrientes y otras moléculas hacia el interior de la

célula. Esto se debe a que los transportadores de estos nutrientes, por ejemplo metionina, serina y uracilo, requieren de una fuerza protón motriz para lograr ingresar a la célula y una deficiencia de nutrientes podría a su vez significar una tasa menor de síntesis de RNA y proteínas lo cual podría ser peligroso (6). Además, esta fuerza protón motriz es también necesaria para la síntesis de ATP mediante la ATPasa F_1F_0 en *M. tuberculosis*, por lo que una disrupción del potencial de membrana podría ser letal para el bacilo (7).

Un estudio realizado por Zhang et al. demostró que el POA en medio ácido reduce el potencial de membrana de *M. tuberculosis* y que este efecto se ve amplificado en los bacilos longevos en estado de latencia. En dicho estudio se analizó comparativamente el metabolismo de bacilos envejecidos latentes en fase estacionaria y bacilos jóvenes en fase de crecimiento. Se encontró que los bacilos envejecidos latentes presentaron una disminución tanto en el metabolismo como en los niveles de reserva energética. Ambas características aumentan la sensibilidad a POA en los bacilos envejecidos latentes debido a que la reducción del potencial de membrana tiene un efecto inhibitorio en la producción de ATP, la cual depende directamente de la gradiente transmembrana de protones y del potencial de membrana. En consecuencia, la inhibición de producción de ATP junto con los niveles reducidos de reserva energética provocan la muerte celular de los bacilos latentes (6). Asimismo, otro estudio realizado por Zhang et al. evaluó el efecto de la PZA en cultivos de bacilos de 4 días de antigüedad en fase de crecimiento log y en cultivos de bacilos de 3 meses de antigüedad en fase estacionaria. Para alcanzar el mismo número de células muertas fue necesaria una dosis de 62 $\mu\text{g/mL}$ de PZA en los cultivos de bacilos de 3 meses de antigüedad y una dosis de 250 $\mu\text{g/mL}$ de PZA en los cultivos de bacilos de 4 días de antigüedad, indicando que los bacilos con más antigüedad son más susceptibles a PZA (8).

Utilizando técnicas bioquímicas para medir los diferentes metabolitos involucrados en la producción de ATP en *M. tuberculosis*, Lu et al. demostraron que el POA, en diferentes concentraciones y a pH ácido, disminuye la cantidad de ATP intracelular y por consiguiente se confirma que la disrupción del potencial de membrana y reducción de las reservas de ATP podría ser uno de los mecanismos mediante los cuales opera la PZA (9).

I.B. Otros blancos moleculares específicos de PZA

I.B.1. Alteraciones en el sistema de rescate ribosomal por mutaciones en *rpsA*

El rescate ribosomal es el proceso mediante el cual se desestabiliza un complejo tmRNA-ribosoma que ha quedado atorado durante la traducción. Esta desestabilización se da por la unión de un tmRNA específico a la región C terminal de la proteína RpsA. La unión desestabiliza el complejo RNA-ribosoma y la traducción de este tmRNA genera un tag que marca a la proteína incompleta para su posterior degradación (10). Sin embargo, la evidencia con respecto al efecto de la PZA sobre el rescate de ribosomas en *M. tuberculosis* es inconclusa.

El proceso del rescate de los ribosomas es especialmente importante en bacterias que se encuentran en condiciones de estrés o latencia, ya que bajo estas condiciones se ralentiza el crecimiento bacteriano y hay una regulación negativa de la producción de RpsA (10–13). Se cree que en *M. tuberculosis* latente el POA se une a RpsA y evita el rescate de los ribosomas atorados. Al tener un metabolismo más lento y un número menor de ribosomas activos, esta unión podría interferir con la supervivencia del bacilo en su estado de latencia. En cepas Wild-Type de *M. tuberculosis* se ha observado que 50µg de POA son suficientes para inhibir por completo la unión de RpsA con el tmRNA in vitro; mientras que en cepas como la DHM444 que tienen un RpsA mutante ($\Delta A438$) esta unión tmRNA-

Ribosoma parece no estar afectada por la presencia de POA lo cual indicaría su resistencia (14).

Sin embargo, otros estudios postulan que no existe una interacción entre RpsA y POA y más bien ofrecen alternativas de explicación para los resultados que parecen indicar que sí existe esta interacción. Entre estos se encuentran: errores relacionados a la metodología, a la interpretación incorrecta de resultados, y al manejo de las pruebas que se realizaron (15).

Si bien los autores logran desmentir en cierta medida el mecanismo de acción de la PZA mediante su unión a RpsA, aún no se tiene una idea totalmente clara de todas las dianas moleculares y vías bioquímicas en las que la PZA podría tener efecto y si verdaderamente *rpsA* es una de ellas.

II. Origen Multifactorial de la resistencia a PZA

II.A. Mutaciones en el gen *pncA*

La PZAasa (nicotinamidasa) es una enzima que se expresa constitutivamente en *M.tuberculosis* y otros procariotes cuyo rol es convertir la nicotinamida en ácido nicotínico, el cual es necesario para la biosíntesis de nicotinamida (NAD) (16). Alrededor del 70-97% de las cepas resistentes a PZA contienen mutaciones en el gen *pncA*; de manera que la pérdida de actividad PZAasa es el principal mecanismo de resistencia a PZA. La variación del grado de resistencia a PZA se atribuye en un 27.3% a la función de la PZAasa (16,17).

La PZAasa es una metaloenzima que necesita a los iones metálicos Zn^{2+} , Co^{2+} y Mn^{2+} para su correcto funcionamiento, y puede ser inactivada cuando estos se agotan (18). El

centro catalítico contiene al sitio activo, entre los residuos D8, A134 y C138, y a un lugar de coordinación de metales entre los residuos D49, H51 y H71 (17,18).

Múltiples estudios demuestran que las mutaciones tanto en el sitio catalítico como en el sitio de unión de metales inhibe la actividad de la PZAasa. En el estudio realizado por Zimic et al. se encontró que la mayor proporción de mutaciones en *pncA*, tanto a nivel global como en el Perú, se encuentran en el loop entre las regiones $\beta 2$ y $\beta 3$ las cuales comprenden la región de coordinación de metales. Asimismo, también se encontró una alta tasa de mutaciones en el sitio activo, en las regiones $\beta 1-\alpha 1$ y $\beta 4-\alpha 3$, sugiriendo que existe un patrón conservado de mutaciones en *pncA* asociadas a resistencia debido a la presión de selección de PZA (17).

Existe evidencia que sugiere que la resistencia a PZA puede ser causada por la variación de concentración intracelular de PZAasa, causada por alteraciones en la región promotora que afectan la expresión de *pncA*. Existe una asociación entre la resistencia a PZA y un eflujo de POA elevado que previene su acumulación intracelular. La tasa de eflujo de POA podría ser un indicador con alta sensibilidad y especificidad de la resistencia a PZA en *M. tuberculosis* ya que la tasa de eflujo de POA depende de la actividad y la concentración intracelular de PZAasa (16).

II.B. Mutaciones en *panD* y *clpC1*

Se han reportado múltiples casos de cepas resistentes a PZA con mutaciones en el gen *panD*, el cual codifica para una proenzima que se convertirá en aspartato descarboxilasa y que es responsable de la formación de β -alanina a partir de L-aspartato en la ruta de biosíntesis del pantotenato, molécula esencial para la formación de la vitamina B5 y coenzima A (19,20). La enzima en su forma final es un tetrámero en donde el sitio activo se encuentra entre dos subunidades adyacentes (19,21).

El POA es capaz de unirse al sitio activo de la enzima PanD a manera de inhibidor competitivo, es decir, el POA interactúa con los mismos grupos que el aspartato y compete con este por el sitio activo. De esta forma, la PZA podría interferir con funciones metabólicas tales como la producción energética y el metabolismo de ácidos grasos (20–22). Además, se ha reportado que el tratamiento con PZA reduce los niveles intracelulares de pantotenato y coenzima A; y se ha demostrado que la suplementación con intermediarios de la vía biosintética de coenzima A antagoniza la acción de PZA (21,23).

Sin embargo, el sitio activo de *panD* es muy pequeño y no es accesible directamente, lo que sugiere que PanD debe sufrir un cambio conformacional para que se pueda unir el POA. En un experimento in vitro realizado por Sun et al. en el cual se aislaron péptidos del gen *panD*, tanto wild-type como con mutaciones puntuales; se midió la afinidad de unión de POA usando calorimetría de titulación isotérmica (ITC) y se determinó que un cambio de un único átomo en el anillo de pirazina (N1->C) fue capaz de anular la interacción entre POA y *panD*. La unión de POA a PanD, principalmente mediada por puentes de hidrógeno e interacciones electrostáticas, es lenta pero resistente una vez unida. Esta cinética de unión podría contribuir a explicar la mecánica de acción lenta pero altamente efectiva de la terapia con PZA (19).

A pesar de que se haya identificado a la ruta de biosíntesis de la coenzima A y a PanD como un blanco principal de PZA, se encontraron mutaciones “missense” en *clpC1* que sugieren que este gen podría causar resistencia indirectamente (24). ClpC1 es un hexámero con actividad ATPasa que reconoce proteínas mal dobladas y forma un complejo con ClpP1 para degradarlas (21,22,25).

En un estudio realizado por Gopal et al. se observó que el efecto inhibitorio de POA sobre PanD es débil. En el mismo estudio se demostró que PanD contiene una cola C-terminal

que actúa como señal de degradación vía el complejo ClpC1-ClpP. Esto se determinó mediante la medición de la señal de fluorescencia liberada por la unión de la proteína PanD con constructos de la cola C-terminal de PanD con una proteína fluorescente reportera. Debido a que ClpC1 es parte del complejo proteasa caseinolítica ClpC1-ClpP encargado de la degradación de proteínas y que PanD es un sustrato de ClpC1, se postula que la unión de POA a PanD activa la degradación de PanD vía el complejo ClpC1-ClpP. Se demostró mediante western blot con anticuerpos anti-PanD y un ensayo de dispersión de luz dinámica que la unión de POA a PanD produce un cambio en la estructura cuaternaria y secundaria de PanD, de manera que la cola C-terminal es más accesible y estimula la degradación de PanD mediante el complejo ClpC1-ClpP (24).

En algunas cepas de aislados clínicos con alto nivel de resistencia a PZA se observan mutaciones en *panD*; en el experimento realizado por Gopal et al. se determinó mediante secuenciamiento de genoma completo que el 82% de las cepas aisladas resistentes a POA contenían mutaciones en *panD* (21,22,26). Las mutaciones asociadas a resistencia se ubican en clusters cerca al centro catalítico, donde interactúan con aminoácidos en los loops de las cadenas β y α que rodean el sitio activo, formando una especie de tapa flexible sobre este. De esta manera, la resistencia a POA tiene un costo sobre la actividad enzimática sin sacrificarla completamente, ya que mutaciones directamente en el sitio activo causarían una inhibición completa de la actividad catalítica, comprometiendo la viabilidad de la cepa (19,21). La resistencia brindada por las mutaciones es dependiente tanto de una menor afinidad del POA a PanD como de una disminución en el tiempo que permanecen unidos (19).

En el mismo estudio realizado por Gopal et al. se identificó que el 18% de las cepas resistentes presentaban mutaciones en *clpC1* (21). Las mutaciones en *clpC1* causan

resistencia indirectamente, ya que no es un blanco de POA pero está involucrado en el mecanismo de acción de inhibición de PanD. Tanto mutaciones cerca al sitio activo de PanD como en la cola C-terminal y mutaciones en *ClpC1* causarían resistencia ya que la PZA no sería capaz de inhibir la biosíntesis de coenzima A (20,21,24). También se han reportado cepas resistentes con mutaciones de cambios en un aminoácido (G99D) en *clpC1* que conservan *pncA*, *rpsA* y *panD* wild-type; sugiriendo que esta mutación está involucrada en la resistencia a PZA. Por otro lado, recientemente se ha identificado a ClpC1 como un blanco molecular de los antibióticos cíclicos ciclomarina A, ‘lassomycin’ y ‘ecumicin’, los cuales son efectivos contra *Mycobacterium* en fases proliferativas y no proliferativas. La resistencia a estos antibióticos se da por mutaciones en sitios cercanos a G99, y las cepas con dichas mutaciones presentaron resistencia parcial a PZA; lo que sugiere que G99 y los sitios adyacentes pueden estar involucrados en el mecanismo de acción de POA (22). Adicionalmente, se identificaron cepas resistentes con *panD* y *pncA* wild-type que contenían mutaciones “missense” con sustituciones de aminoácidos en el dominio N-terminal y el dominio D1 de la proteína ClpC1. Se postula que el dominio N-terminal es esencial para la unión con diferentes moléculas y la evidencia sugiere que mutaciones en *clpC1* podrían causar resistencia a PZA al prevenir la unión y degradación de ciertas proteínas (21,22,25). Se logró demostrar por Gopal et al. que tanto las mutaciones en *panD* y *clpC1* ocurren bajo presión de selección de POA in vivo. Sin embargo, las mutaciones en *clpC1* podrían tener un costo energético para el bacilo causando un crecimiento atenuado in-vivo (21).

II.C. Mutaciones en GpsI/ PNPasa

Recientemente se ha descubierto que mutaciones en el gen *Rv2783*, que codifica a la proteína bifuncional GpsI/PNPasa podrían conferir resistencia a PZA. La proteína

codificada por *Rv2783* cataliza reacciones de síntesis y degradación de RNA así como la elongación del DNA de cadena simple (27). Además, se cree que esta proteína también podría tener efectos sobre la síntesis y degradación de ppGpp (28).

El mecanismo de acción mediante el cual se cree que el POA afecta a esta proteína es por inhibición por competencia directa con los tmRNAs a los cuales se une; esta unión con el POA generaría cambios conformacionales que afectan su actividad enzimática (27,29).

Los roles de GpsI dentro de *M. tuberculosis* no son entendidos del todo, pero se especula que podría jugar un rol importante en la producción de RNAs reguladores que le permitirían a la bacteria sobrevivir en condiciones de estrés sin modificar su genoma (27). Se sabe que el degradosoma de las bacterias es muy importante cuando estas se encuentran en un estado de latencia ya que se han observado niveles elevados de otra RNAsa, la RNAsa E en *M. avium* por lo que no podría descartarse la posibilidad de que la inhibición de GpsI por sí sola, tenga un efecto letal en la célula (27,30).

Se tiene la idea general de que el POA necesita asociarse a GpsI para tener un efecto sobre esta; y que las mutaciones que afecten esta unión podría causar resistencia. Dado que el sitio exacto de unión a POA es aún desconocido, se cree que podrían existir muchas de estas mutaciones que causan resistencia y que aún no han sido descubiertas (27,29).

En un estudio realizado por He et al. se encontró la mutación A2104C en dos cepas de un panel de 56 cepas resistentes a PZA. Esta mutación está ubicada en una región KXXFXFXF que también existe en *rpsA* y que podría ser importante en la unión del POA. Los investigadores confirmaron mediante un ensayo con luciferasa, que las proteínas wild-type perdían su capacidad catalítica en presencia de POA mientras que la cepa mutante no, por lo que se cree que esta región KXXFXFXF podría ser de especial importancia para la unión de POA a GpsI (29).

Por otro lado, Njire et al. encontraron dos cepas sin mutaciones en *pncA* pero con la misma mutación G199A que no altera la actividad catalítica de la proteína GpsI aun en presencia de POA. Los autores sugieren que un residuo, el Asp67, que presentaba la alteración, sería crucial para la unión de POA a GpsI (27). Si bien aún no se conoce mucho sobre este mecanismo de acción, queda claro que podría tener un rol importante en la resistencia a PZA y que sería de interés estudiarlo a profundidad.

II.D. Mutaciones en otros genes

Como se ha visto, existe una gran variedad de genes que estarían asociados a la resistencia a PZA. Un estudio in silico realizado por Sheen et al. analizó la asociación estadística entre la resistencia a PZA, ciertos genes y mutaciones específicas con especial atención a aquellos a los que previamente se les ha asociado con la resistencia a PZA. En este estudio, se encontró que *pncA* es el gen con una mayor asociación a la resistencia a PZA, pero también que mutaciones presentes en genes como *rpsA*, *nrdR*, *fadF22*, *Rv1556* y *Rv3242c* fueron también asociados a la resistencia a PZA (26).

En algunas proteínas como la metalochaperonas *phoY1* y *CtpE*, se detectó una asociación estadística a la resistencia a PZA en cepas que también contenían mutaciones en *pncA*. Algunas de estas mutaciones en las metalochaperonas no han sido estudiadas, por lo que podrían elucidar algún otro mecanismo de acción asociado al funcionamiento de PZA (26).

Se encontró una gran diversidad de genes cuyas funciones incluyen la regulación del pH, metalochaperonas y genes relacionados a la evasión del sistema inmune humano que también estarían asociados a una resistencia a PZA. Entre estos se destacan: *Rv2505c*, *Rv2777c*, *Rv0735*, *Rv0787A*, *Rv0994*, *Rv1327c*, *Rv1742*, *Rv2317*, *Rv2557*, *Rv2857c*, *Rv3362c*, *Rv3393*, *Rv3410c*, *Rv3767c*, *Rv2646*, *Rv0668*, y *Rv0667* (26).

Como se ha mencionado en múltiples ocasiones, se cree que gran parte de la resistencia a PZA viene de mutaciones en el gen *pncA*, sin embargo existe evidencia que parece indicar que si bien la relación entre la estructura de la PZAsa y su función es muy clara, no hay una clara asociación entre la estructura de la PZAsa y la resistencia a PZA. Esto sugiere que la resistencia a PZA no proviene principalmente de mutaciones en *pncA* y que hay más factores involucrados (2). Cabe resaltar que en el estudio de Sheen et al. se encontró que en un grupo de aislados clínicos de *M. tuberculosis* con resistencia a PZA, mutaciones en el gen *pncA* parecen solo explicar el 27% de la variabilidad de esta, lo cual refuerza la idea de mecanismos adicionales por los cuales se da esta resistencia a PZA (3).

Uno de estos factores podría ser la tasa de eflujo de POA. *M. smegmatis*, que es naturalmente resistente a PZA, tiene una tasa de eflujo muy alta y se cree que ese es uno de los factores que explica su resistencia (6). Sin embargo, un estudio realizado por Zimic et al. encontró que las cepas de *M. tuberculosis* cuya tasa de eflujo de POA caía por debajo de un valor crítico presentaban resistencia a PZA y que esto explicaba aproximadamente el 61% de la resistencia a PZA observada independientemente de si tenían actividad PZAsa o no. Esto pareciera indicar que la acumulación de POA dentro de la célula podría no ser importante para su efecto, y que más bien una tasa baja de expulsión de POA reduciría la cantidad de POA que puede protonarse y re-ingresar a la célula para destruirla. Sin embargo, la discrepancia entre las tasas de eflujo entre *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* también comprobaría que existen otros mecanismos que finalmente contribuyen a conferir resistencia a PZA (31).

Por otro lado, existe evidencia que la PZA interactúa con FadD2. FadD2 es un mediador de la resistencia a PZA y la pérdida de su función confiere hipersusceptibilidad a la cepa.

Se sugiere que la vía de FadD2 contribuye a la baja eficacia de PZA a pH neutro. Una posible explicación de la resistencia mediada por FadD2 se debe a que ésta actúa directamente sobre POA y la modifica de manera que se inactiva su acción contra el bacilo (23). Otra posible explicación es que la actividad de FadD2 es necesaria para mantener niveles intracelulares de acyl-coA para procesos metabólicos posteriores y que un metabolismo de lípidos funcional es requisito para la persistencia durante el tratamiento con PZA. Esto es consistente con la evidencia de que la PZA reduce la síntesis de ácidos grasos en el bacilo (23). Esta información sugiere que un inhibidor de FadD2 podría aumentar la eficacia del tratamiento de PZA y potencialmente reducir su tiempo de uso.

La evidencia tanto in silico como in vivo nos indica que el mecanismo de acción de la PZA parece no depender solamente de uno o dos factores, sino que más bien puede ser un sistema complejo de interacciones entre diferentes genes y proteínas que en conjunto causan resistencia.

III. Herramientas probables para el estudio de *Mycobacterium tuberculosis*

El estudio de la expresión genética puede ser realizado mediante varios métodos, a continuación describiremos algunos de estos.

III.A. Generación de KOs e interferencia en *M. tuberculosis*

III.A.1. Inserción de un cassette de Higromicina

Para generar una cepa de *M. tuberculosis* sin expresión de *pncA* Boshoff et al. construyeron una cepa mutante *pncA*-KO al introducir un cassette de Higromicina dentro del gen *pncA* mediante un vector suicida. Al cultivar a la cepa transformada en un medio

con higromicina se obtuvieron colonias altamente resistentes a PZA sin expresión de la proteína PncA y sin actividad PZAasa, confirmando un KO de *pncA* efectivo (11).

III.A.2. CRISPRi en *M. tuberculosis*

El CRISPR de interferencia o CRISPRi es una alternativa fácilmente manipulable para el silenciamiento de genes de manera específica. El sistema basado en la proteína Cas-9 de *Streptococcus pyogenes* (dCas9_{Spy}) es el más utilizado para el KO de genes en *E.coli* y *B. subtilis* y el que está mejor caracterizado. Sin embargo, la aplicación de este sistema en *Mycobacterium* es limitada ya que los resultados de KO son pobres en eficiencia y presentan proteotoxicidad. En el trabajo de Rock et al. se realizó un cribado de proteínas ortólogas a Cas9 eficaces en mycobacteria y se encontró que la proteína Cas9 de *Streptococcus thermophilus* (dCas9_{StH1}) fue la que logró un KO de genes específicos con alta robustez, presentando así un sistema de CRISPRi optimizado para ser utilizado en *Mycobacterium* (32).

III.B. Expresión de Genes exógenos en *M. tuberculosis*

III.B.1. Vectores extracromosomales

La transformación de *M. tuberculosis* para el estudio de genes específicos es problemática debido a que su pared celular es muy diferente a la de las bacterias para las que normalmente se desarrollan protocolos de manipulación biomolecular. Sin embargo, hace unos años se han podido identificar plásmidos extracromosomales de *M. tuberculosis* y se ha descrito la electroporación como la mejor técnica para transformar mycobacteria (12).

Justamente, Cauna describe la estandarización de un protocolo para complementar cepas de *M. tuberculosis pncA*-KO con un gen *pncA* utilizando un plásmido pNIT. En este caso

se utilizó el plásmido pNIT para evaluar mutaciones puntuales en el gen *pncA* al introducirlo en cepas wild-type con el gen *pncA* KO. Sin embargo, el nivel de expresión del gen *pncA* en estas cepas transformadas fue hasta 9 veces el nivel basal (33). Esto puede deberse a que usualmente para este tipo de vectores se tiene más de una copia por célula, lo cual aumenta la expresión de los genes de interés (34). Esto debe tomarse en cuenta si se decide elegir esta herramienta de estudio de genes en *M. tuberculosis*.

III.B.2 Vectores integrativos

Por otro lado, existen vectores como el mycobacteriofago L5 que poseen la capacidad de integrarse al genoma de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis*. Este vector es bastante grande, y se le ha comparado al Fago lambda que se usa tradicionalmente para otras bacterias por su fácil manipulación. Adicionalmente, su gran tamaño podría ser una herramienta eficiente para estudiar operones o genes grandes de una forma útil (13).

Al acoplar esta técnica con otras desarrolladas para la manipulación de genes en mycobacteria, como lo son la mutagénesis dirigida y sistemas de recombinación homóloga, podemos obtener una herramienta confiable para el estudio de genes en *M. tuberculosis*.

Justamente, en el trabajo aún no publicado de Ortiz se estandarizó una técnica que utiliza vectores integrativos para el estudio de genes en *M. tuberculosis* y que podría ser replicado para el estudio de otros genes (35).

2. PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La tuberculosis es un problema de salud pública global que en el 2019 enfermó a un aproximado de 10 millones de personas, con una incidencia de entre 5 y 500 casos nuevos o de recaída por cada 100 000 personas al año. El problema de la TB es agravado por la

alta prevalencia de cepas multi-drogo resistentes, que representan aproximadamente al 3.3% en los nuevos casos de infección y al 17.7% en los casos de recaída y dificultan la aplicación de un tratamiento efectivo (36).

Sin tratamiento, la tasa de mortalidad de TB es muy alta, aproximadamente 70% de los pacientes positivos a TB que no reciben tratamiento mueren dentro de un periodo de 10 años (36). El tratamiento actual es un régimen de 6 meses de una combinación de isoniazida, rifampicina, etambutol y pirazinamida (PZA). La PZA se usa en todas las combinaciones de drogas empleadas para el tratamiento contra TB debido a que es la única droga antituberculosa efectiva para eliminar a los bacilos en fase latente (4,33,36).

A pesar de que el 75% de los casos de resistencia a PZA están atribuidos a mutaciones en el gen *pncA* que ocasionan un funcionamiento deficiente de la PZAasa; la PZA es una droga promiscua que tiene numerosos blancos moleculares, los cuales aún no se conocen en su totalidad (5,33). Además, la identificación de mecanismos de resistencia a PZA a partir de aislados clínicos se dificulta por el background genético diverso de las cepas (22,37). De esta manera, determinar el mecanismo de acción de la PZA resultaría altamente informativo para desarrollar nuevas estrategias quimioterapéuticas que permitan obtener regímenes de terapia más cortos y mejores resultados para el tratamiento de tuberculosis multi-drogo resistente (TB-MDR), así como una droga de reemplazo a la PZA.

Existen pocos estudios sobre las interacciones entre diferentes genes y factores bacterianos sobre la resistencia a distintos antibióticos en TB-MDR; se postula que las interacciones genéticas epistáticas juegan un rol importante en la resistencia a PZA (37). La presencia de cepas resistentes que presentan mutaciones en el gen *pncA* pero conservan la actividad pirazinamidasa de manera parcial sugiere que existen otros

mecanismos por los cuales estas cepas adquieren la resistencia a PZA (16,26,31,33). En el presente trabajo se busca evaluar el efecto del background genético sobre la resistencia a PZA en aislados clínicos de *Mycobacterium tuberculosis* que conservan su actividad PZAsa pero presentan resistencia a PZA.

3. ESTRATEGIAS DE ABORDAJE

Se ha encontrado que diversos aislados clínicos de *M. tuberculosis* tienen mutaciones en *pncA* que no anulan su actividad PZAsa; y que aun así son resistentes a PZA. Esto sugiere que la resistencia a PZA en estas cepas podría estar relacionada a mutaciones en otros genes (background genético). Nosotros planteamos reemplazar el gen *pncA* con mutaciones, como F94L y K48T, con diferentes niveles de actividad de PZAsa en aislados clínicos por *pncA* wild-type. El MIC a PZA será medido antes y después del reemplazo del gen *pncA*. De esta forma, evaluaremos la contribución del background genético sobre la resistencia a PZA.

Utilizando las técnicas descritas por Boshoff et al. podremos knockear el gen *pncA* mutante de estas cepas. El propósito de este knockeo es el de ‘apagar’ el gen *pncA* mutante para posteriormente reemplazarlo con un *pncA* con actividad wild-type. En paralelo, se va a preparar un vector integrativo que contenga este gen *pncA* wild-type, siguiendo el protocolo estandarizado por Ortiz. Utilizando Higromicina, se seleccionarán las cepas cuya actividad PZAsa ha sido apagada y se transformarán con el plásmido preparado mediante un proceso de electroporación (35). Tras la transformación, se someterá a las cepas a un ensayo de Wayne, que verificará la actividad PZAsa cualitativamente y finalmente, se determinará el MIC tanto de las cepas transformadas como de sus

contrapartes sin transformar para evaluar su resistencia a PZA y así evaluar el efecto del background genético sobre esta.

Postulamos que al reemplazar el *pncA* mutante en los aislados clínicos por uno wild-type, la cepa se mantendrá resistente a PZA con cambios mínimos en el MIC (1 o 2 diluciones). Esto evidenciaría la contribución de otros genes en la resistencia a PZA en aquellas cepas que mantienen actividad PZAsa. Nuevos estudios serán necesarios para identificar a estos genes y demostrar la relación directa con la resistencia a PZA.

BIBLIOGRAFÍA

1. Rueda D, Bernard C, Gandy L, Capton E, Boudjelloul R, Brossier F, et al. Estimation of Pyrazinamidase Activity Using a Cell - free In vitro Synthesis of PncA and its Association with Pyrazinamide Susceptibility in Mycobacterium tuberculosis. 2018;16-25.
2. Quiliano M, Gutierrez AH, Gilman RH, López C, Evangelista W, Sotelo J, et al. Structure-Activity relationship in mutated pyrazinamidases from Mycobacterium tuberculosis. Bioinformation. 2011;6(9):335-9.
3. 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.
4. Zhang Y, Shi W, Zhang W, Mitchison D. Mechanisms of Pyrazinamide Action and Resistance. Mol Genet Mycobact. 2015;2(4):479-91.
5. Lamont EA, Dillon NA, Baughn AD. The Bewildering Antitubercular Action of Pyrazinamide. Microbiol Mol Biol Rev. 2020;84(2):1-15.
6. 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.
7. Kaim G, Dimroth P. ATP synthesis by the F1F₀ ATP synthase of Escherichia coli is obligatorily dependent on the electric potential. FEBS Lett. 1998;
8. Zhang Y, Mitchison D. The curious characteristics of pyrazinamide: A review. International Journal of Tuberculosis and Lung Disease. 2003.
9. Lu P, Haagsma AC, Pham H, Maaskant JJ, Mol S, Lill H, et al. Pyrazinoic acid decreases the proton motive force, respiratory ATP synthesis activity, and cellular ATP levels. Antimicrob Agents Chemother. 2011;55(11):5354-7.

10. Keiler KC. Biology of trans-translation. *Annual Review of Microbiology*. 2008.
11. Boshoff HIM, Mizrahi V. Expression of *Mycobacterium smegmatis* pyrazinamidase in *mycobacterium tuberculosis* confers hypersensitivity to pyrazinamide and related amides. *J Bacteriol*. 2000;182(19):5479-85.
12. Bachrach G, Colston MJ, Bercovier H, Bar-Nir D, Anderson C, Papavinasasundaram KG. New single-copy mycobacterial plasmid, pMF1, from *Mycobacterium fortuitum* which is compatible with the pAL5000 replicon. *Microbiology*. 2000;
13. Mong Hong Lee, Pascopella L, Jacobs WR, Hatfull GF. Site-specific integration of mycobacteriophage L5: Integration-proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacille Calmette-Guerin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;
14. Shi W, Zhang X, Jiang X, Yuan H, Lee JS, Barry CE, et al. Pyrazinamide Inhibits Trans-Translation in *Mycobacterium tuberculosis*. *Science*. septiembre de 2011;333(6049):1630-2.
15. Dillon NA, Peterson ND, Feaga HA, Keiler KC, Baughn AD. Anti-tubercular Activity of Pyrazinamide is Independent of trans-Translation and RpsA. *Sci Rep*. 2017;7(1):1-8.
16. Sheen P, Lozano K, Gilman RH, Valencia HJ, Loli S, Fuentes P, et al. pncA gene expression and prediction factors on pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis* Q2. Disponible en: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tube.2013.03.005>
17. Zimic M, Sheen P, Quiliano M, Gutierrez A, Gilman RH. Peruvian and globally reported amino acid substitutions on the *Mycobacterium tuberculosis* pyrazinamidase suggest a conserved pattern of mutations associated to pyrazinamide resistance. *Infect Genet Evol*. 2010;10(2):346-9.
18. 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.
19. Sun Q, Li X, Perez LM, Shi W, Zhang Y, Sacchettini JC. The molecular basis of pyrazinamide activity on *Mycobacterium tuberculosis* PanD. *Nat Commun*. 2020;11(1):1-7.
20. Zhang S, Chen J, Shi W, Liu W, Zhang W, Zhang Y. Mutations in panD encoding aspartate decarboxylase are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect*. 2013;2(May).
21. Gopal P, Tasneen R, Yee M, Lanoix JP, Sarathy J, Rasic G, et al. In Vivo-Selected Pyrazinoic Acid-Resistant *Mycobacterium tuberculosis* Strains Harbor Missense Mutations in the Aspartate Decarboxylase PanD and the Unfoldase ClpC1. *ACS Infect Dis*. 2017;3(7):492-501.

22. Zhang S, Chen J, Shi W, Cui P, Zhang J, Cho S, et al. Mutation in *clpC1* encoding an ATP-dependent ATPase involved in protein degradation is associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Emerg Microbes Infect.* 2017;6(2):e8-2.
23. Rosen BC, Dillon NA, Peterson ND, Minato Y, Baughn AD. Long-Chain Fatty Acyl Coenzyme A Ligase *FadD2* Mediates Intrinsic Pyrazinamide Resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. 2017;61(2):1-13.
24. Gopal P, Sarathy JP, Yee M, Rangunathan P, Shin J, Bhushan S, et al. Pyrazinamide triggers degradation of its target aspartate decarboxylase. *Nat Commun.* 2020;11(1):1-10.
25. Yee M, Gopal P, Dick T. Missense mutations in the unfoldase *ClpC1* of the caseinolytic protease complex are associated with pyrazinamide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(2):1-6.
26. Sheen P, Requena D, Gushiken E, Gilman RH, Antiparra R, Lucero B, et al. A multiple genome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* reveals specific novel genes and mutations associated with pyrazinamide resistance. *BMC Genomics.* 2017;18(1):1-11.
27. Njire M, Wang N, Wang B, Tan Y, Cai X, Liu Y, et al. Pyrazinoic acid inhibits a bifunctional enzyme in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2017;61(7):1-15.
28. Jones GH, Bibb MJ. Guanosine pentaphosphate synthetase from *Streptomyces antibioticus* is also a polynucleotide phosphorylase. *J Bacteriol.* 1996;
29. He L, Cui P, Shi W, Li Q, Zhang W, Li M, et al. Pyrazinoic acid inhibits the bifunctional enzyme (Rv2783) in *mycobacterium tuberculosis* by competing with tmRNA. *Pathogens.* 2019;8(4):10-5.
30. Archuleta RJ, Hoppes PY, Primm TP. *Mycobacterium avium* enters a state of metabolic dormancy in response to starvation. *Tuberculosis.* 2005;
31. Zimic M, Fuentes P, Gilman RH, Gutiérrez AH, Kirwan D, Sheen P. Pyrazinoic Acid Efflux Rate in *Mycobacterium Tuberculosis* is a better proxy of Pyrazinamide Resistance. *Tuberc Edinb.* 2012;92(1):84-91.
32. Rock JM, Hopkins FF, Chavez A, Diallo M, Chase MR, Gerrick ER, et al. Programmable transcriptional repression in mycobacteria using an orthogonal CRISPR interference platform. *Nat Microbiol.* 2017;2(February):1-9.
33. Cauna Orocollo Y. 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 [PhD Thesis]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2019.
34. Goude R, Roberts DM, Parish T. Electroporation of mycobacteria. *Methods Mol Biol.* 2015;

35. Ochoa Ortiz A. Expresión de pirazinamidasa mutantes mediante plásmidos integrativos y la relación con la susceptibilidad a pirazinamida en Mycobacterium [PhD Thesis]. Universidad Peruana Cayetano Heredia; 2020.
36. World Health Organization. Global Tuberculosis Report [Internet]. Blood. World Health Organization; 2020 p. 1-232. Report No.: September. Disponible en: http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/index.html
37. Fenner L, Egger M, Bodmer T, Altpeter E, Zwahlen M, Jatun K, et al. Effect of mutation and genetic background on drug resistance in Mycobacterium tuberculosis. Antimicrob Agents Chemother. 2012;56(6):3047-53.

ANEXOS

ANEXO 1: Modelo de acción de la PZA (1).

