



Universidad
Zaragoza

**Estudio de la actividad de bombas de eflujo
de *Mycobacterium tuberculosis* en un
modelo de *Escherichia coli***

Directores:

José Antonio Aínsa Claver

Liliana Isabel Dias Rodrigues

Pilar Sainz de la Maza Arnal

Máster en Biología Molecular y Celular

2013-2014

Índice

| | |
|---|-----------|
| Introducción | 1 |
| Historia de la tuberculosis | 1 |
| Transmisión, Tratamiento y Vacuna | 2 |
| <i>Mycobacterium tuberculosis</i> | 3 |
| Resistencias bacterianas a fármacos | 4 |
| Bombas de eflujo | 5 |
| Resistencia a fármacos y bombas de eflujo en <i>M. tuberculosis</i> | 7 |
| Objetivos y Justificación | 9 |
| Materiales y Métodos | 11 |
| Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento | 11 |
| Técnicas generales de ácidos nucleicos | 14 |
| Extracción de DNA en <i>E. coli</i> | 14 |
| Extracción de RNA en <i>E. coli</i> | 15 |
| Extracción de plásmidos (Mini-preparación) | 16 |
| PCR | 17 |
| Purificación de productos obtenidos tras la PCR | 18 |
| Generación y transformación de células <i>E. coli</i> competentes..... | 19 |
| Construcción del mutante <i>oxyR</i> por intercambio alélico en <i>E. coli</i> | 19 |
| Ensayos de susceptibilidad | 23 |
| Ensayos de cinética de eflujo en cepas de <i>E. coli</i> | 24 |
| Determinación de la expresión de los genes de las bombas de eflujo de <i>M. tuberculosis</i> en <i>E. coli</i> | 24 |
| Análisis proteico de las cepas de <i>E. coli</i> con bombas transportadoras micobacterianas..... | 28 |
| Resultados y Discusión | 31 |
| Estudio de las bombas de eflujo micobacterianas en un modelo de <i>E. coli</i> | 31 |
| Ensayos de susceptibilidad para las cepas de <i>E. coli</i> complementadas con bombas de eflujo de <i>M. tuberculosis</i> | 31 |
| Ensayos de cinética de eflujo | 37 |

| | |
|---|-----------|
| Ensayos de expresión génica..... | 38 |
| Generación y caracterización del mutante <i>oxyR</i> en <i>E. coli</i> | 40 |
| Ensayos de susceptibilidad a la INH | 44 |
| Ensayos de susceptibilidad tras la complementación con los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7 | 45 |
| Determinación de la expresión génica de las bombas Tap, P55 y MmpL7..... | 45 |
| Análisis del extracto proteico de membrana | 45 |
| Conclusiones y Perspectivas | 49 |
| Referencias Bibliográficas | 51 |

Abreviaturas

| | |
|---------------|---|
| ABC | ATP-binding cassette superfamily |
| Ap | Ampicilina |
| BCG | Bacilo de Calmette y Guérin |
| CCCP | Carbonil cianida m-clorofenilhidrazona |
| CIM | Concentración inhibitoria mínima |
| CPZ | Clorpromazina |
| DO | Densidad óptica |
| DTT | DL-Ditiotreitol |
| GapA | Deshidrogenasa gliceraldehído-3-fosfatasa |
| H | Hora |
| INH | Isoniazida |
| Km | Kanamicina |
| KO | Knock-out |
| LB | Luria-Bertani |
| MATE | Multidrug and toxic compound extrusion |
| MDR-TB | Multidrug resistant tuberculosis |
| MFS | Major facilitator superfamily |
| Min | Minuto |
| MmpL | Membrane protein large |
| PBS | Suero fisiológico |
| RIF | Rifampicina |
| RND | Nodulation-cell division superfamily |
| S | Segundo |
| SM | Estreptomina |
| SMR | Small multidrug resistance family |
| VP | Verapamil |
| WT | Wild-type |
| XDR-TB | Extensively drug resistant tuberculosis |

Introducción

Historia de la tuberculosis

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa causada por micobacterias, fundamentalmente por *Mycobacterium tuberculosis*. En función del órgano afectado, proporciona una gran variedad de cuadros clínicos, por lo que actualmente sigue siendo la segunda causa de mortalidad a nivel mundial después del SIDA (WHO, 2013). Es considerada una de las primeras enfermedades humanas de las que se tiene constancia y a lo largo de la historia, ha recibido multitud de nombres: mal del rey, peste blanca o tisis, entre otros.

Es admitido el hecho de que el organismo que produce la tuberculosis, evolucionó a partir de otros microorganismos más primitivos dentro del propio género *Mycobacterium*. A partir de las micobacterias ancestrales fueron derivando las especies actuales, algunas patógenos de humanos (*M. tuberculosis*) y otras patógenos de animales (*M. bovis*, *M. caprae*, etc).

En 1882, Robert Koch consiguió aislar el bacilo tuberculoso y demostrar su patogenicidad mediante coloración de derivados de anilina, haciéndolo saber finalmente en la *Sociedad de Fisiología de Berlín*.

En 1921, Albert Calmette y Camille Guérin fueron los artífices de la primera vacuna contra la tuberculosis mediante el uso de BCG, una variante atenuada de *M. bovis*.

En 1944, gracias a los esfuerzos por encontrar un fármaco eficaz contra *M. tuberculosis*, se descubrió la estreptomina (SM). A partir de este momento, surgieron nuevos medicamentos antituberculosos: ácido para-amino salicílico (1949), isoniazida (INH, 1952), pirazinamida (1954), etambutol (1962) y rifampicina (1963). Todos estos hallazgos transformaron la tuberculosis en una enfermedad curable, sin embargo, la idea de la que esta enfermedad se encontraba controlada se esfumó con la irrupción de la epidemia del SIDA así como con la aparición de casos de tuberculosis multirresistentes.

Transmisión, Tratamiento y Vacuna

La Organización Mundial de la Salud (OMS) estima que alrededor de dos mil millones de personas se encuentran infectadas por tuberculosis, con ocho millones de nuevos casos y dos millones de muertes cada año. Por ello, la OMS declaró en 1993 una situación de emergencia global frente a la tuberculosis y los Objetivos del Milenio se han planteado como objetivo para reducir la incidencia y la mortalidad producidas por la tuberculosis (*WHO, 2013*).

La infección se trasmite por vía aérea mediante la inhalación de bacilos tuberculosos. Se estima que, aproximadamente, un tercio de la población está infectado de forma latente por tuberculosis, esto quiere decir, que está infectado por el bacilo, pero sin embargo, no está enfermo y por lo cual es incapaz de transmitir la infección. No obstante, estas personas poseen un mayor riesgo de enfermar por tuberculosis, probabilidad que se ve incrementada si se tiene un sistema inmunitario dañado, como ocurre en casos de infección por el VIH, desnutrición o diabetes.

La tuberculosis es una enfermedad curable, donde la forma activa es sensible a los siguientes antibióticos divididos en dos clases: fármacos de primera línea (*isoniazida, pirazinamida, etambutol, rifampicina y estreptomycin*) y fármacos de segunda línea (*etionamida, cicloserina, ácido p-amino salicílico, kanamicina, capreomicina, amikacina, fluoroquinolonas y linezolid*). Los primeros son los de mayor actividad bactericida mientras que los segundos son bacteriostáticos, poseen más contraindicaciones y se utilizan en caso de resistencia a los fármacos de primera línea.

El tratamiento contra la tuberculosis requiere de un largo periodo en el cual son administrados numerosos fármacos. Se inicia con la toma durante dos meses de rifampicina, isoniazida, pirazinamida y etambutol o estreptomycin, seguidos de cuatro meses con rifampicina e isoniazida. Durante este proceso es muy importante tanto la información, supervisión como el apoyo por parte de un agente sanitario, con el objetivo de garantizar la finalización del tratamiento, crucial para evitar el desarrollo de resistencias a fármacos.

Existe además, una vacuna contra la tuberculosis: el bacilo de Calmette-Guerin (BCG). Contiene bacilos tuberculosos de origen bovino (*M. bovis*) atenuados, sin embargo, no ofrece una protección total ya que no previene ni de la infección primaria en adultos ni de la reactivación de la tuberculosis pulmonar latente. No obstante, protege contra las formas diseminadas de la tuberculosis, por lo que es de uso general en aquellos países donde la tuberculosis es común.

Mycobacterium tuberculosis

M. tuberculosis pertenece al dominio Bacteria, dentro de la clase *Actinobacteria*, del orden *Actinomycetales*, del suborden *Corynebacterineae* y de la familia *Mycobacterium* (Stackebrandt et al., 1997); agrupándose finalmente en el complejo de *Mycobacterium tuberculosis*.

Es un bacilo delgado recto o ligeramente curvado con bordes redondeados y cuyo tamaño suele oscilar entre 2-5 μm de longitud y 0,2-0,5 μm de anchura. Se caracteriza por ser un microorganismo aeróbico estricto, inmóvil (no posee flagelos), no formador de esporas, con bastantes gránulos citoplasmáticos y ácido-alcohol resistente. Posee una velocidad de crecimiento muy lenta y actividades catalasa y nitrato reductasa.

Filogenéticamente pertenece al grupo de bacterias Gram positivas, sin embargo, el alto carácter hidrofóbico de su pared celular, le hace adquirir una leve coloración en la tinción de Gram. Por este motivo, las micobacterias suelen teñirse mediante la tinción de Ziehl-Neelsen.

Posee una envoltura de estructura compleja, formada por cápsula, pared celular y membrana plasmática (Brennan, 1989). La cápsula es la capa más externa y se encuentra constituida por ácidos micólicos, proteasas, lipasas y glicolípidos. Posee la función de proteger y se ha visto que es la encargada de interactuar con componentes del sistema inmunitario, explicándose de esta manera la gran inmunopatología de la tuberculosis (Daffé and Etienne, 1999). La pared celular se

localiza a continuación, constituida por cuatro capas. La más interna se denomina peptidoglicano, encargada de dar forma y rigidez a la bacteria y se encuentra compuesta por moléculas de N-acetilglucosamina y ácido-N-glucolilmurámico con cortas cadenas de alanina. Posteriormente, se localiza una capa de polímeros formada por arabinosa y galactosa, seguida de un manto de ácidos micólicos (*Barry et al., 1998*), en cuyo extremo se sitúa una estructura de lípidos superficiales. Finalmente, y más internamente, se halla la membrana celular cuya peculiaridad es la gran glicosilación de los fosfolípidos, los cuales poseen un papel muy importante en la patogénesis de la tuberculosis (**Figura 1**).

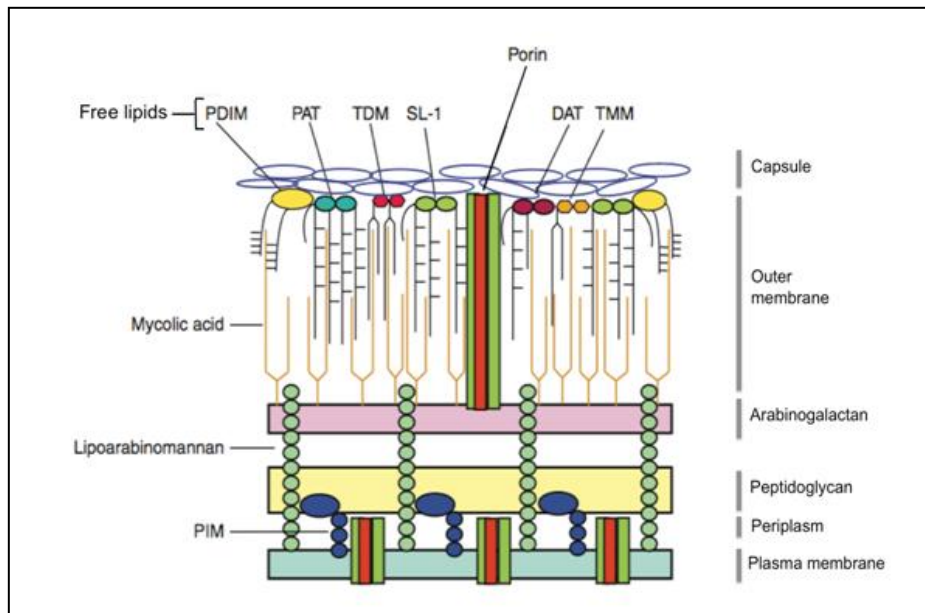


Figura 1. Estructura esquemática de la envoltura de *M. tuberculosis* (*Ouellet et al., 2011*).

Resistencias bacterianas a fármacos

La resistencia a fármacos por parte de las bacterias implica la inactivación o modificación del sustrato, la alteración de la diana o la disminución de la concentración del propio sustrato, conllevado por un descenso de la permeabilidad de la pared bacteriana o por un incremento en el eflujo (*Li and Nikaido, 2004*).

Esta resistencia puede ser natural (intrínseca) o adquirida como resultado de mutaciones espontáneas o por la adquisición de genes de resistencia exógenos (*Hogan and Kolter, 2002; Levy, 2002; Normark and Normark, 2002*). Hasta hace bien poco se pensaba que la resistencia intrínseca era debida a la ausencia de la diana o por la falta de permeabilidad de la bacteria. Sin embargo, existen pruebas de que este tipo de resistencia en ciertas bacterias es consecuencia de la expresión constitutiva o inducible de los sistemas de eflujo (*Li et al., 1994; Nikaido, 2001; Piddock, 2006; Ryan et al., 2001*). De esta manera, los fármacos harían de inductores, aumentando su nivel de expresión al interactuar con los sistemas de regulación (*Roberts, 1996*). Asimismo, la sobreexpresión de los transportadores puede ser también resultado de mutaciones en los sistemas de regulación (*Zgurskaya and Nikaido, 2000*), contribuyendo así tanto a la resistencia natural como adquirida.

McMurry et al. (1980) fueron los primeros en demostrar que estas resistencias podían estar causadas por un eflujo activo. Desde entonces, este mecanismo ha sido reconocido como uno de los principales causantes de dicha resistencia (*Nikaido, 1994*), convirtiéndose en una de las mayores preocupaciones en aquellas cepas de determinadas especies que han desarrollado resistencia a múltiples fármacos.

Bombas de eflujo

Las bombas de eflujo son proteínas de membrana encargadas del transporte de distintos compuestos desde el interior de las bacterias al exterior, contribuyendo de esta forma a la resistencia bacteriana. En los procariontes, estas proteínas están presentes tanto en Gram positivos como en Gram negativos y están relacionadas con multiresistencia a antibióticos y a otros procesos celulares como el transporte de lípidos, resistencia frente al estrés, regulación de la homeostasis o virulencia (*Nguyen and Thompson, 2006; Piddock, 2006*).

Las bombas de eflujo bacterianas (**Figura 2**) han sido clasificadas en cinco familias (*Li and Nikaido, 2004; Fernandez and Hancock, 2012*):

- *ATP-Binding Cassette Superfamily (ABC)*

Esta familia de transportadores se encuentra presentes en todos los organismos vivos, y conduce sustratos como azúcares, aminoácidos, iones, fármacos, polisacáridos o proteínas gracias a la hidrólisis del ATP. Algunos de estos transportadores se ha visto que contribuyen a la resistencia frente a antibióticos, como por ejemplo: MacAB-TolC en *E. coli* o Rv2686c-Rv2688c en *M. tuberculosis*.

- *Major Facilitator Superfamily (MFS)*

Es una de las familias más grandes de transportadores de membrana que se conocen, constituida por 74 familias. Todos los MFS transportadores implicados en el eflujo de antibióticos se piensa que funcionan como antitransportadores monoméricos impulsados por un gradiente de H⁺.

- *Resistance Nodulation-Cell Division Superfamily (RND)*

Es una familia de bombas presentes en bacterias Gram negativas, constituidas por tres elementos: una proteína transportadora situada en la membrana interior, una proteína accesoria periplasmática y una proteína canal localizada en la membrana exterior. El eflujo a través de ellas es conducido gracias a la fuerza motriz de protones, un gradiente electroquímico en el que el movimiento de los iones de hidrógeno conduce el transporte del sustrato.

- *Small Multidrug Resistance family (SMR)*

Se trata de una familia de proteínas pequeñas de aproximadamente 110 residuos. Generalmente, forman tetrámeros en la membrana citoplasmática y transportan un número muy reducido de sustratos, los cuales son impulsados gracias a un gradiente de protones.

- Multidrug and Toxic Compound Extrusion (MATE)

Estas proteínas funcionan como antitransportadores, donde la mayoría de ellos son accionados por un gradiente de iones Na^+ aunque algunos se valen de un gradiente de protones. Sus sustratos incluyen fluoroquinolonas, aminoglucósidos, y colorantes catiónicos.

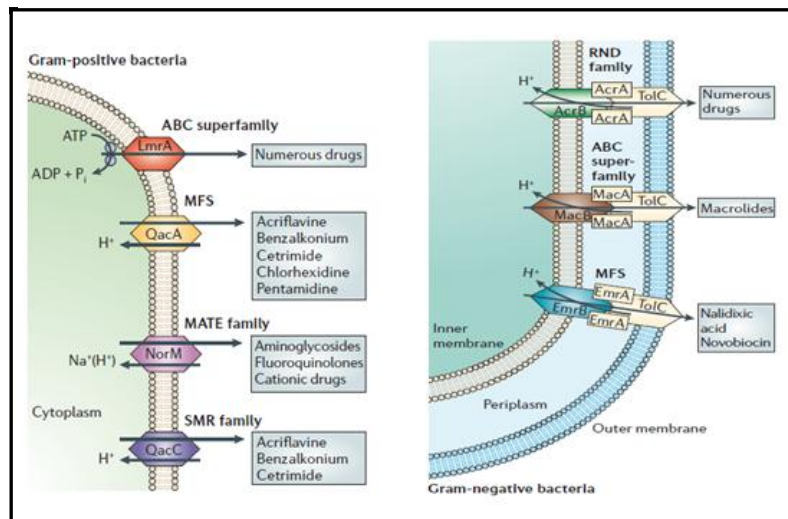


Figura 2. Representación esquemática de las familias de bombas de eflujo en Gram positivas y Gram negativas (Rosner, 1993).

Resistencia a fármacos y bombas de eflujo en *M. tuberculosis*

M. tuberculosis posee la peculiaridad de poder sobrevivir de forma latente en el hospedador asintomático dando lugar más tarde a su forma activa (Stewart et al., 2003; Viveiros et al., 2012; Zhang, 2004). Esto conlleva que el control de la enfermedad sea un gran reto, a pesar de la existencia de medicamentos eficaces y de la vacuna actual (BCG). Asimismo, la aparición de cepas multirresistentes (MDR-TB, TB causada por *M. tuberculosis* resistente a los fármacos de primera línea isoniazida y rifampicina) y extremadamente farmacorresistentes (XDR-TB, MDR-TB con resistencia adicional a las fluoroquinolonas y a uno de los tres medicamentos inyectables de segunda línea kanamicina, amikacina o capreomicina) son cada vez más comunes contribuyendo así,

a la falta de opciones terapéuticas disponibles. En este tipo de cepas, las resistencias pueden deberse a diversas causas tales como mutaciones en genes (la más frecuente), disminución de la permeabilidad o a la actuación de las bombas de eflujo. A los sistemas de eflujo se les atribuye un papel importante como primer paso de la resistencia adquirida, ya que estos sistemas se encargan de expulsar los fármacos facilitando así la adquisición de las mutaciones relevantes que conferirán altos niveles de resistencia. Por lo tanto, el estudio de compuestos que inhiban estas vías de transporte es de gran importancia y se ha convertido en uno de los principales objetivos para intentar combatir esta enfermedad (*Viveiros et al., 2012; Rodrigues et al., 2011*).

M. tuberculosis posee 13 transportadores RND, denominados MmpL (Mycobacterial Membrane Protein Large). Estos presentan una gran homología respecto a AcrB de *E. coli* y se ha demostrado que podrían estar implicados en el transporte de lípidos a través de la pared celular así como en la propia virulencia de *M. tuberculosis* (*Varela et al., 2012*). Asimismo, uno de estos transportadores, el denominado MmpL7, se ha relacionado con la resistencia a INH en *M. smegmatis* (*Pasca et al., 2005*).

Este organismo contiene además, varios transportadores del tipo MFS tales como Rv1258c (Tap) y Rv1410c (P55). Se encuentran involucrados en la resistencia a fármacos como la tetraciclina, estreptomina y gentamicina, así como en otros procesos fisiológicos como son la respuesta frente al estrés oxidativo o cinética de crecimiento (*Aínsa et al., 1998; Paulsen et al., 1996; Ramón-García et al., 2006; Ramón-García et al., 2009; Ramón-García et al., 2012; Silva et al., 2001*).

Objetivos y Justificación

Con este trabajo, se pretende caracterizar en un modelo de *E. coli* las bombas de eflujo Rv1258c (Tap), Rv1410c (P55) y Rv2942 (MmpL7) presentes en *M. tuberculosis* e implicadas en la resistencia intrínseca a varios compuestos. A consecuencia del lento crecimiento de *M. tuberculosis* y también a la complejidad de su envoltura celular, se ha diseñado una estrategia rápida para detectar posibles sustratos de estas bombas de eflujo en *E. coli*, bacteria que presenta una envoltura celular más simple y permeable. Para ello, estas bombas micobacterianas se han expresado en cepas de *E. coli*, las cuales han sido previamente deleccionadas en los genes que codifican algunas de sus propias bombas.

Se conoce que *M. tuberculosis* es un organismo altamente sensible a la INH, lo cual ha sido atribuido en parte a lesiones en el gen *oxyR*. Este gen, tanto en *E. coli* como en *S. typhimurium*, es un regulador positivo de un conjunto de genes relacionados con el estrés oxidativo (Christman et al., 1989), y los mutantes en este gen son altamente sensibles a la INH (Rosner, 1993; Sinha et al., 2006). Siendo que la bomba de eflujo MmpL7 se ha relacionado con la resistencia a INH, uno de nuestros retos será la construcción de un mutante knock-out de *oxyR* en *E. coli*, para así poder analizar las bombas de eflujo de *M. tuberculosis* (y en especial MmpL7) en ese fondo genético y poder hacer ensayos de susceptibilidad a INH.

Por lo tanto, con las cepas de *E. coli* ya disponibles en el laboratorio y con el mutante knock-out en el gen *oxyR* que vamos a construir, los objetivos concretos que se pretenden alcanzar son:

- Determinación de los niveles de resistencia para las cepas de *E. coli* que llevan bombas de eflujo de *M. tuberculosis*

Las concentraciones inhibitorias mínimas (CIM) de diferentes compuestos se determinarán por dilución seriada en medio líquido.

- Ensayos de cinética de eflujo en cepas de *E. coli* que expresan bombas de eflujo de *M. tuberculosis*

Se utilizarán técnicas de acumulación y eflujo de compuestos fluorescentes como el EtBr, para identificar sustratos potenciales de los transportadores estudiados en *E. coli*.

- Determinación de la expresión de los genes de las bombas de eflujo de *M. tuberculosis* en *E. coli*

El nivel de expresión de los genes para los transportadores Tap, P55 y MmpL7 se efectuará por PCR a tiempo real. De esta forma, se confirmará la expresión o no de los genes micobacterianos en *E. coli*.

- Análisis de proteínas

Se utilizarán técnicas de proteómica para comprobar si las proteínas transportadoras micobacterianas son producidas en *E. coli*. También se evaluará el proteoma de las cepas de *E. coli*, para determinar si la producción de proteínas micobacterianas causa alteraciones en su perfil normal proteico.

Materiales y Métodos

Cepas bacterianas, plásmidos, medios de cultivo y condiciones de crecimiento

En este trabajo se han usado las cepas *E. coli* BW25113 (Tal and Schuldiner, 2009) y *E. coli* 3AG100 (Jellen-Ritter and Kern, 2001), ambas derivadas de *E. coli* K-12. Mientras que 3AG100 es una cepa generada a partir de la cepa AG100 con sobreexpresión de la bomba de eflujo AcrAB-TolC como consecuencia de una exposición repetida a una fluoroquinolona (Bohnert et al., 2008), BW25113 es una cepa de referencia utilizada en diversos laboratorios.

En las **Tablas 1 y 2** se muestra una descripción detallada de las cepas empleadas, así como, de los plásmidos presentes en las mismas (**Tabla 3**).

| Derivadas de 3AG100 | Descripción | Marcador de resistencia | Ref. |
|---------------------|--|-------------------------|------|
| St. 540 | Cepa con delección en el gen <i>acrB</i> (Δ <i>acrB</i>) | - | 1 |
| CVF13 | Cepa con el gen <i>acrB</i> reemplazado por el gen <i>mmpL7</i> (<i>acrB::mmpL7</i>) | SM | 2 |
| CVF16 | Δ <i>acrB</i> con el plásmido pCVF1 | Ap | 2 |
| CVF17 | Δ <i>acrB</i> con el plásmido pCVF2 | Ap | 2 |
| CVF18 | Δ <i>acrB</i> con el plásmido pCVF7 | Ap | 2 |
| CVF19 | Cepa con un gen híbrido de <i>acrB</i> y <i>mmpL7</i> (<i>acrB615-28::mmpL7</i> 535-48) | SM | 2 |

Tabla 1. Cepas derivadas de 3AG100 empleadas en este trabajo. Referencias: 1: Bohnert et al, 2008; 2: Villellas, 2013.

| Derivadas de BW25113 | Descripción | Marcador de resistencia | Ref. |
|-------------------------------|--|-------------------------|------|
| <i>ΔacrB</i> | Cepa con delección en el gen <i>acrB</i> (<i>ΔacrB</i>) | - | 1 |
| <i>ΔemrE</i> | Cepa con delección en el gen <i>emrE</i> (<i>ΔemrE</i>) | - | 1 |
| <i>ΔmdfA</i> | Cepa con delección en el gen <i>mdfA</i> (<i>ΔmdfA</i>) | Km | 1 |
| <i>ΔacrBΔemrE</i> | Cepa con delecciones en los genes <i>acrB</i> y <i>emrE</i> (<i>ΔacrB ΔemrE</i>) | - | 1 |
| <i>ΔemrEΔmdfA</i> | Cepa con delecciones en los genes <i>emrE</i> y <i>mdfA</i> (<i>ΔemrE ΔmdfA</i>) | Km | 1 |
| <i>ΔacrBΔemrEΔmdfA</i> | Cepa con delecciones en los genes <i>acrB</i> , <i>emrE</i> y <i>mdfA</i> (<i>ΔacrB ΔemrE ΔmdfA</i>) | Km | 1 |
| CVF1 | Cepa con el plásmido pT7-7 | Ap | 2 |
| CVF2 | Cepa con el plásmido pCVF1 | Ap | 2 |
| CVF3 | <i>ΔemrE ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF1 | Ap, Km | 2 |
| CVF4 | <i>ΔacrB ΔemrE ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF1 | Ap, Km | 2 |
| CVF5 | <i>ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF1 | Ap, Km | 2 |
| CVF6 | <i>ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF2 | Ap, Km | 2 |
| CVF7 | <i>ΔemrE</i> con el plásmido pCVF1 | Ap | 2 |
| CVF8 | <i>ΔemrE</i> con el plásmido pCVF2 | Ap | 2 |
| CVF9 | <i>ΔemrE ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF2 | Ap, Km | 2 |
| CVF10 | <i>ΔacrB</i> con el plásmido pCVF1 | Ap | 2 |
| CVF11 | <i>ΔacrB</i> con el plásmido pCVF2 | Ap | 2 |
| CVF12 | <i>ΔacrB ΔemrE ΔmdfA</i> con el plásmido pCVF2 | Ap, Km | 2 |
| CVF14 | <i>ΔacrB</i> con el plásmido pET6Ap | Ap | 2 |
| CVF15 | <i>ΔacrB</i> con el plásmido pCVF7 | Ap | 2 |
| CVF22 | <i>ΔemrE</i> con el plásmido pT7-7 | Ap | 2 |

Tabla 2. Cepas derivadas de BW25113 empleadas en este trabajo. Referencias: 1: Tal and Schuldiner, 2009; 2: Villellas, 2013.

| Plásmido | Descripción | Marcador de resistencia | Ref. |
|-------------|---|-------------------------|------|
| pT7-7 | Vector de expresión bajo el control del promotor T7 en <i>E. coli</i> . | Ap | 1 |
| pCVF1 | Derivado del plásmido pT7-7 con el gen <i>rv1258c</i> (Tap), bajo el control del promotor T7. | Ap | 2 |
| pCVF2 | Derivado del plásmido pT7-7 con el gen <i>rv1410c</i> (P55), bajo el control del promotor T7. | Ap | 2 |
| pET30a-ORF6 | Vector de expresión bajo el control del promotor T7 en <i>E. coli</i> , tras la inducción con IPTG. | Km | 3 |
| pET6Ap | Derivado de pET30a-ORF6, con Km ^R inactivado mediante la inserción del fragmento Ω-Ap ^R . | Ap | 2 |
| pCVF7 | Derivado del plásmido pET6Ap con el gen <i>mmpL7</i> bajo el control del promotor T7, tras la inducción con IPTG. | Ap | 2 |

Tabla 3. Descripción de los plásmidos presentes en las cepas de estudio. Referencias: 1: Ninio et al., 2001; 2: Vilellas, 2013; 3:Guo et al., 2009.

Las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB) en tubos de cristal y/o en placas LB agar a la temperatura de 37°C en la oscuridad, siendo preciso añadir en determinadas muestras los antibióticos necesarios para un correcto crecimiento, hasta la concentración final que muestra la **Tabla 4**.

El almacenamiento de las cepas se llevó a cabo en congeladores a -80°C en presencia de glicerol al 15% (w/v).

| Compuesto | Concentración |
|--------------------|---------------|
| Ampicilina (Ap) | 100 µg/ml |
| Kanamicina (Km) | 20 µg/ml |
| Estreptomycin (SM) | 50 µg/ml |

Tabla 4. Concentraciones finales de los antibióticos empleados.

Técnicas generales de ácidos nucleicos

1. Extracción de DNA en E. coli

Reactivos:

- Solución de lisis (10 ml): 9,34 ml buffer TE + 600 μ l SDS 10% (w/v) + 60 μ l Proteinasa K (20 mg/ml)
- Cloroformo:Isoamílico (24:1)
- EtOH frío (-20°C)
- Buffer TE
- RNasa (1 mg/ml)

Procedimiento:

- Se transfieren 1,4 ml de cultivo, crecido previamente en medio LB, a un eppendorf de 1,5 ml para ser centrifugado durante 3min a máxima velocidad.
- Se decanta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 600 μ l de solución de lisis, gracias a la ayuda del vórtex.
- Se incuba durante 1h a 37°C, se añade un volumen igual de cloroformo:isoamílico y se centrifuga a máxima velocidad durante 5min.
- Se transfiere la fase acuosa a un nuevo eppendorf, se completa con un volumen igual de cloroformo y se invierte el tubo. Se centrifuga y se transfiere a un eppendorf nuevo la fase acuosa.
- Para precipitar el DNA se añaden 2,5 volúmenes de EtOH frío, se agita y se deja incubar durante 30min o más a la temperatura de -20°C.
- Se centrifuga durante 15min a velocidad máxima, se descarta el sobrenadante y se deja secar al aire libre.
- Se resuspende el DNA en buffer TE y se añade 1 μ l de RNasa para así conseguir su total digestión dejándolo incubar durante 15min a 37°C.
- Finalmente, se cuantifica el DNA extraído mediante la medida de la absorbancia a 260nm y se almacena a -20°C.

2. Extracción de RNA en *E. coli*

Para la extracción del RNA en las respectivas cepas de *E. coli*, se hizo uso del kit RNeasy Mini Kit de Qiagen, que contiene columnas RNeasy y los tampones RNA protect, Buffer RLT, Buffer RW1 y Buffer RPE.

Reactivos adicionales:

- Buffer TE + lisozima: se prepara una alícuota en la que la concentración final de la enzima sea de 3 mg/ml
- Buffer RLT + β -mercaptoetanol: 10 μ l of β -mercaptoetanol en 1 ml de RLT

Procedimiento:

- Se deja crecer *E. coli* en medio LB hasta alcanzar una DO_{600} de 0,6. Se transfieren 500 μ l a un eppendorf de 1,5 ml junto con 1 ml de RNA protect y se deja incubar a temperatura ambiente durante 5min.
- Se centrifuga 10min a 9000rpm y se decanta el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 100 μ l de buffer TE + lisozima y se deja incubar durante 5min.
- Se adicionan 350 μ l de buffer RLT + β -mercaptoetanol y se agita vigorosamente. Se vierte un volumen igual de etanol y se homogeniza por pipeteo.
- Se transfieren 700 μ l de lisado a una columna RNeasy y se centrifuga 15s a 10000rpm. Se descarta el sobrenadante, se añaden 700 μ l de buffer RW1 a la columna y se centrifuga. Se descarta el sobrenadante, se añaden 500 μ l de buffer RPE a la columna y se centrifuga (x2).
- Se añaden 500 μ l de buffer RPE y se centrifuga 2min a 10000rpm.
- Se saca la columna, se introduce en un eppendorf de 2 ml y se centrifuga a máxima velocidad durante 1min.
- Se repite el paso anterior, pero añadiendo 30 μ l de agua libre de RNasa a la columna y se centrifuga. De esta manera se consigue la elución del RNA al eppendorf.
- Finalmente, se cuantifica el RNA extraído mediante la medida de la absorbancia a 260nm y se almacena a -20°C.

3. Extracción de plásmidos (Mini-preparación)

Reactivos:

- Solución I (50 ml):
 - 1 ml EDTA 0,5 M pH 8,0
 - 1,25 ml TRIS 1 M pH 8,0
 - 5 ml Glucosa 0,5 M
 - 42,75 ml H₂O
- Solución II (10 ml):
 - 7 ml H₂O
 - 1 ml SDS 10% (w/v)
 - 2 ml NaOH 1 M
- Solución III (100 ml):
 - 60 ml KAc 5 M
 - 11,5 ml HAc glaciar
 - 28,5 ml H₂O
- NaAc 3 M
- EtOH absoluto frío (-20°C)
- RNasa (1 µg/ml)
- H₂O estéril

Procedimiento:

- Se centrifugan 1,4 ml de cultivo, crecido previamente en medio LB, a 10000rpm durante 3min. Se descanta el sobrenadante, se resuspende el pellet en 100 µl de Solución I y se deja incubar durante 5min.
- Se añaden 200 µl de Solución II, se mezcla suavemente invirtiendo el tubo hasta que el contenido tenga un aspecto viscoso y se deja incubar en hielo 5min.
- Se añaden 150 µl de Solución III fría y se deja incubar en hielo 5min.
- Se centrifuga a 12000rpm durante 10min y se transfiere el sobrenadante a un eppendorf nuevo.

- Se añaden 0,1 volúmenes de NaAc y 2 volúmenes de EtOH, se invierte el tubo y se incuba 30min a -20°C. Se centrifuga a 12000rpm durante 5min y se elimina el EtOH.
- Se deja secar el precipitado al aire libre, se resuspende el pellet en 50 µl de H₂O estéril y se añade 1µl de RNasa para incubarlo a 37°C durante 15min.
- Finalmente, se cuantifica el plásmido extraído mediante la medida de la absorbancia a 260nm y se almacena a -20°C.

4. PCR

La reacción en cadena de la polimerasa o Polimerase Chain Reaction (PCR) consiste en la amplificación de fragmentos de DNA comprendidos entre dos zonas determinadas del genoma cuya secuencia es conocida.

Mezcla:

- | | |
|-----------------------------------|----------|
| - H ₂ O: | 16,75 µl |
| - 5x MyTaq buffer (Bioline): | 5 µl |
| - Cebador directo (25 µM): | 0,5 µl |
| - Cebador inverso (25 µM): | 0,5 µl |
| - MyTaq DNA polimerasa (Bioline): | 0,25 µl |

El volumen final por pocillo es de 23 µl, a los cuales han de añadirse 2 µl del DNA que se desee amplificar.

Programa PCR:

- Fase inicial de desnaturalización: 1min a 95°C
- 35 ciclos compuestos por tres fases:
 - Desnaturalización: 30s a 95°C
 - Annealing: 30s a 56/58°C (en función de los cebadores usados).
 - Elongación: 1min a 72°C
- Fase final de elongación: 10min a 72°C
- Almacenamiento: ∞ 4°C

Para verificar las PCR realizadas, se realizan geles de agarosa al 1% con SybrGreen. Como marcador de pesos moleculares se usa el 100pb DNA Ladder, el cual proporciona el siguiente patrón de bandas: 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1500, 2000 y 3000 pb. Finalmente, se enciende el dispositivo a la corriente durante 40min a 120V.

5. Purificación de productos obtenidos tras la PCR

Para la purificación de los productos obtenidos tras la PCR, se hizo uso del kit High Pure PCR Product Purification Kit de Roche, que contiene columnas High pure filter tube y los tampones Binding buffer, Wash buffer y Elution buffer.

Procedimiento:

- Tras las PCR, se juntan 100 μ l en un eppendorf al cual se le añaden 500 μ l Binding buffer.
- Se transfiere a una columna High pure filter tube y se centrifuga 1min a velocidad máxima.
- Se descarta el contenido de la columna y se añaden 500 μ l Wash buffer. Se centrifuga y se descarta el contenido de la columna.
- Se añaden 200 μ l Wash buffer, se centrifuga y se descarta el contenido de la columna.
- Se traspara la columna a un eppendorf de 1,5ml, se añaden 50 μ l de Elution buffer y se centrifuga 1min a velocidad máxima. De esta manera, se consigue que el producto purificado se eluya al eppendorf.
- Se cuantifica el producto purificado mediante la medida de la absorbancia a 260nm y se almacena a -20°C.

Generación y transformación de células *E. coli* competentes

Generación de células competentes:

- Se deja crecer *E. coli* en medio LB hasta que alcance una DO_{600} de 0,6 y se detiene el crecimiento en hielo durante 10min.
- Se centrifugan las células 5min a velocidad máxima y se lavan con 1 ml, dos veces con H_2O estéril y una vez con glicerol al 10% (w/v).
- Se vuelve a centrifugar, se reparte el contenido en alícuotas de 50 μ l y se almacenan a $-80^\circ C$.

Transformación de células competentes:

- Se mezclan 150 μ l de células competentes con 100 ng del plásmido o con 500 ng del producto purificado en cubetas de 0,2cm (Bio-Rad) preenfriadas a $4^\circ C$ y se les da un pulso eléctrico (2,5kV, 25 μ F, 200 Ω) en un GenePulser XcellTM (Bio-Rad). Las células se recogen en 900 μ l de LB y se incuban durante 1h a $37^\circ C$.
- Se plaquean 100 μ l de los controles (cuando proceda) y de las diluciones: 10^0 , 10^{-1} y 10^{-2} del experimento de transformación en presencia de los antibióticos necesarios y se mantienen durante toda la noche en la estufa a $37^\circ C$.

Construcción del mutante *oxyR* por intercambio alélico en *E. coli*

Gracias a la metodología del intercambio alélico, es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibióticos, generado por PCR, usando cebadores con extensiones homólogas correspondientes al gen que se desea deleccionar (*Datsenko and Warnner, 2000*), siendo en este caso el gen *oxyR* (**Figura 3**).

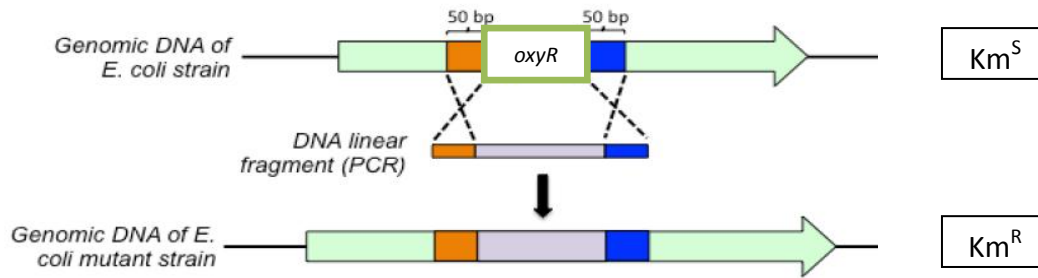


Figura 3. Representación esquemática del reemplazamiento alélico para la generación del mutante *oxyR* en *E. coli*.

Para llevar a cabo la construcción del mutante, se diseñaron los cebadores descritos en la **Tabla 5**.

| Nombre | Secuencia 5'→3' | Tm (°C) |
|----------------|--|---------|
| OxyR1 | ATGAATATTCGTGATCTTGAGTACCTGGTGGCATTGGCTGAACACCGCCA | 92 |
| OxyR2 | TTAAACCGCCTGTTTTAAACTTTATCGAAATGGCCATCCATTCTTGCGC | 85,8 |
| P1 | GTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | 64,1 |
| P2 | CATATGAATATCCTCCTTAGT | 51,5 |
| OxyR_Fw | CCTATCGCCATGAACTATCG | 62 |
| OxyR_Rv | CCTTTAACTACCCGACGATG | 61 |
| Tn 5D | GGCGATGGCGTGCGAATCGGGAG | 81,9 |

Tabla 5. Cebadores diseñados para llevar a cabo la construcción del mutante *oxyR* en *E. coli*.

1. Proceso de construcción del mutante *oxyR* en *E. coli*

Para llevar a cabo la construcción del mutante *oxyR* en *E. coli*, se procede en un primer paso, a la preparación de células competentes BW25113, las cuales poseen el plásmido pKD46. Este plásmido codifica para la recombinasa Red del fago λ , la cual se encuentra bajo el control de un promotor inducible por L-Arabinosa. Los cultivos que contienen este plásmido, han de incubarse a 30°C ya que posee un origen de replicación

termosensible. Además, tiene un gen de resistencia a antibióticos β -lactámicos (**Figura 4**).

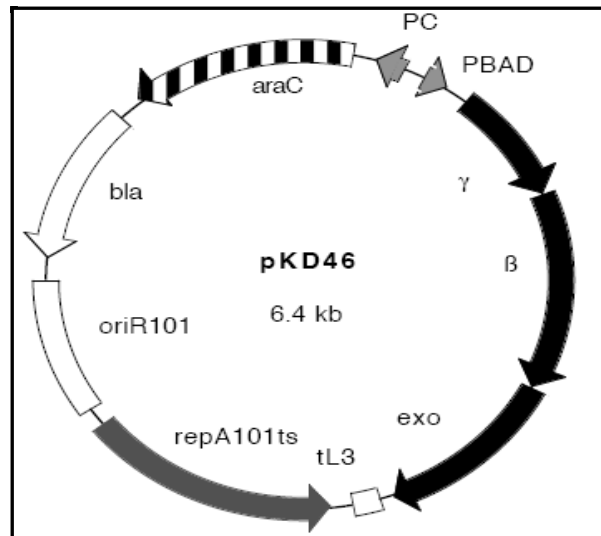


Figura 4. Representación gráfica del plásmido pKD46.

Debido a las características del plásmido pKD46, la preparación de células competentes varía significativamente del protocolo general descrito en la sección anterior.

Por ello, estos cultivos se inoculan en un medio compuesto por: 100 ml LB, 0,2% L-arabinosa y 100 $\mu\text{g/ml}$ Ap; el cual debe prepararse con anterioridad y almacenarse a 30°C durante 2h. A continuación, se traspasan 5 ml de cultivo, crecido previamente en presencia de Ap a 30°C, al medio y se introducen en la estufa a 30°C hasta que alcance una DO_{600} de 0,6. A partir de este momento, el protocolo de preparación de células competentes sigue las mismas indicaciones que el protocolo general descrito anteriormente.

A continuación, se procede a la amplificación del fragmento que se utilizará en el intercambio alélico, empleando como sustrato el plásmido pKD4. Este plásmido posee dos genes de resistencia a antibióticos, kanamicina y ampicilina, colindantes a regiones flanqueantes (FRT) denominadas P1 y P2 (**Figura 5**).

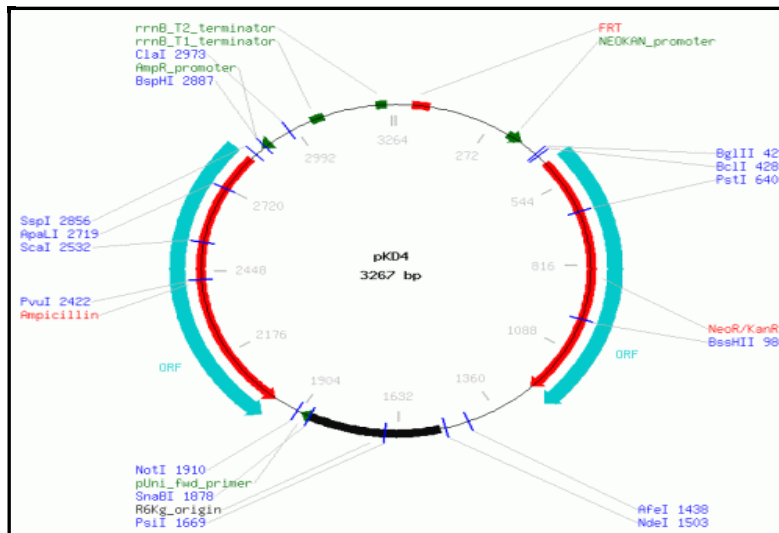


Figura 5. Representación gráfica del plásmido pKD4.

La reacción de amplificación se llevó a cabo gracias al uso de los cebadores OxyR1 y OxyR2 a una temperatura de annealing de 58°C. Estos cebadores presentan la característica de poseer en sus extremos 5' extensiones homólogas al gen *oxyR* de *E. coli*, y en sus extremos 3' llevan las secuencias de las regiones P1 y P2. El producto de amplificación resultante se denominó *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR*. Además, se realizó otra amplificación con los cebadores P1 y P2, los cuales hibridan solamente en las regiones P1 y P2 del plásmido pKD4 a una temperatura de annealing de 56°C. En este caso el producto resultante se denominó P1-Km-P2.

Se espera que el uso de los cebadores P1 y P2 rinda fragmentos de aproximadamente 1,5Kb, mientras que el de los cebadores OxyR1 y OxyR2, será de 1,6Kb (**Figura 6**).

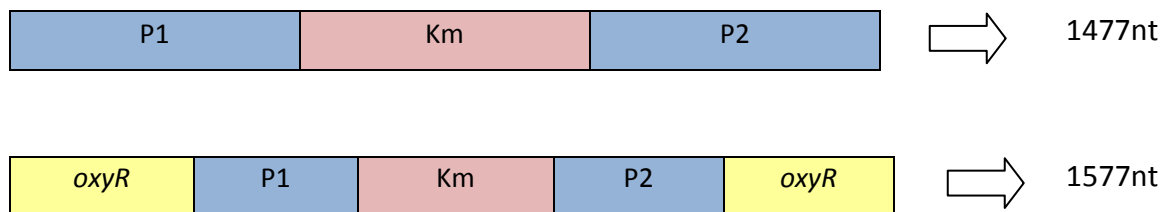


Figura 6. Representación esquemática de los fragmentos resultantes al emplear los cebadores P1 vs P2 y OxyR1 vs OxyR2.

Finalmente, las células competentes BW25113/pKD46 se electroporaron con el producto *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR* y se seleccionaron las colonias candidatas a recombinantes en medio con Km. Con estas candidatas se llevaron a cabo dos PCR para verificar la transformación de las colonias. En la primera, se usaron los cebadores OxyR_Fw vs OxyR_Rv, los cuales hibridan en regiones *upstream* y *downstream* del gen *oxyR*; y en la segunda, OxyR_Rv vs Tn 5D. Este último cebador, tiene la peculiaridad de hibridar dentro de la cassette de Km, lo cual quiere decir, que solo lo hará en las colonias transformadas. Ambas PCR se llevaron a cabo a una temperatura de annealing de 56°C.

Si en las colonias se ha producido el evento de intercambio alélico, el uso de los cebadores OxyR_Fw y OxyR_Rv, producirá fragmentos de aproximadamente 1,7Kb, mientras que con los cebadores OxyR_Rv y Tn 5D, éstos serán de 410pb (**Figura 7**).

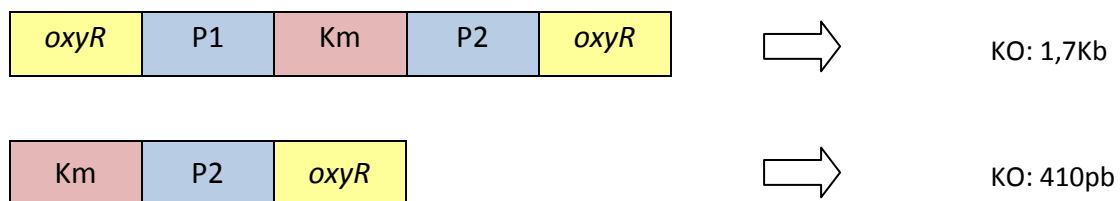


Figura 7. Representación esquemática de los fragmentos resultantes al emplear los cebadores OxyR_Fw vs OxyR_Rv y OxyR_Rv vs Tn 5D.

Ensayos de susceptibilidad

La concentración inhibitoria mínima (CIM) es la mínima concentración de fármaco para la cual no existe crecimiento bacteriano visible.

- En placas de 96 pocillos se realizan diluciones seriadas en medio LB de los fármacos correspondientes hasta conseguir un volumen final de 50 µl por pocillo.
- Se hacen pases de una colonia a 10 ml de PBS para ajustar la turbidez a una DO₆₀₀ de 0,8-1,0 (equivalente a 0,5 McFarland).

- Se diluye la suspensión 1/50 en LB y se inoculan 50 µl en cada pocillo de la placa.
- Los resultados pueden ser observados después de 15-18h de la incubación a 37°C.

Ensayos de cinética de eflujo en cepas de E. coli

Procedimiento:

- En placas de 96 pocillos oscuras se realizan diluciones seriadas de EtBr en PBS, hasta conseguir un volumen final de 100 µl por pocillo.
- Se inoculan los cultivos en medio LB y se introducen en la estufa a 37°C hasta alcanzar una DO₆₀₀ de 0,6. Una vez conseguido, se reparte el contenido en eppendorf de 1 ml.
- Se centrifugan las células a 13000rpm durante 3 min y se lavan dos veces con 1 ml de PBS.
- Se reúnen todas las alícuotas de una misma cepa en un falcon, se ajusta la DO₆₀₀ a 0,5 y se inoculan 100 µl de la cepa por pocillo.
- La fluorescencia se determina gracias al lector de microplacas de detección Sinergia HT durante 60min en ciclos de 51s a 37°C. Se usan como longitudes de onda de excitación y de detección, 530/25nm y 590/20nm respectivamente.

Determinación de la expresión de los genes de las bombas de eflujo de M. tuberculosis en E. coli

La cuantificación del nivel de expresión de los genes para los transportadores Rv1258c (Tap), Rv1410c (P55) y Rv2942 (MmpL7) se efectuó por RT-PCR, para confirmar si los genes micobacterianos se estaban expresando en *E. coli* o no.

1. Curva de calibración

Para poder realizar los experimentos de expresión génica es necesario verificar previamente que los cebadores amplifican de manera correcta sin dar lugar a productos inespecíficos. Asimismo, se requiere emplear un control endógeno, es decir, un gen que amplifica de manera constante en el hospedador de interés. En este caso se usó el gen *gapA*, que codifica para la deshidrogenasa gliceraldehido-3-fosfatasa (Fitzmaurice et al., 2004).

Se extrae el DNA de las cepas de interés, se cuantifica y se preparan 4 ó 5 diluciones 1:10, necesarias para construir la curva de calibración. A continuación, se prepara la siguiente mezcla:

- | | |
|--|--------|
| - H ₂ O: | 3,5 µl |
| - FastStart Sybr Green Master Mix (Roche): | 5 µl |
| - Cebador directo (25 µM): | 0,5 µl |
| - Cebador inverso (25 µM): | 0,5 µl |

Es recomendable preparar la mezcla conjunta para todos los pocillos en un eppendorf de 200 µl. A continuación, se reparten 29 µl de esta mezcla junto con 1,5 µl del DNA correspondiente, teniendo en cuenta que cada muestra se ensaya por triplicado. Se le da un pulso con el vórtex y se dividen 10 µl a cada pocillo de la placa. Se tapa con un adhesivo y se le da otro pulso ahora con la centrifuga. Finalmente, se introduce en el termociclador y se ajusta el programa:

- 10min a 95°C
- 40 ciclos compuestos por dos fases:
 - 15s a 95°C
 - 1min a 60°C
- 15s a 95°C
- 1min a 60°C
- 15s a 95°C

Una vez finalizada la reacción, se obtiene la curva de *melting* del producto amplificado y se verifica si se ha obtenido un único producto o si se han formado productos inespecíficos.

2. Obtención de cDNA a partir de RNA

Se realiza una genoteca a partir del RNA extraído de las cepas de interés. Para ello, primero se cuantifica el RNA y en función de su concentración se determina el volumen (x) que se utilizará en la reacción para alcanzar una concentración final de 1µg/µl. A continuación, se prepara la siguiente *mezcla*:

- RNA: x µl
- Random primers (0,5 µg/ml) (Invitrogen): 5 µl
- dNTPs (10 mM): 0,5 µl
- H₂O RNase-free:

Se completa con el volumen necesario de H₂O hasta los 11 µl. Es recomendable preparar esta mezcla conjunta, repartir en distintos eppendorf y completar con el RNA correspondiente. A continuación, se introducen en el termociclador durante 5min a 65°C con el objetivo de romper todo tipo de estructura secundaria.

Mientras transcurre este tiempo se procede a preparar la siguiente *mezcla*:

- Reverse Transcriptase Buffer 5x (Invitrogen): 4 µl
- DTT (0,1 M) (Sigma): 1 µl
- Actinomicina D: 2 µl
- RNaseOut Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Invitrogen): 1 µl
- Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen): 1 µl

Es aconsejable preparar esta mezcla conjunta y luego repartir 9 µl en cada eppendorf, los cuales ya poseen los 11 µl previos.

A continuación, se introducen los eppendorf en el termociclador con el siguiente programa:

- 5min a 25°C
- 2h a 50°C
- 15min a 70°C
- 4°C ∞

Una vez terminado el programa se recomienda congelar los cDNAs y diluirlos 1:20 antes de volver a emplearlos.

3. RT-qPCR

Mezcla:

- | | |
|--|--------|
| - H ₂ O: | 3,5 µl |
| - FastStart Sybr Green Master Mix (Roche): | 5 µl |
| - Cebador directo (25 µM): | 0,5 µl |
| - Cebador inverso (25 µM): | 0,5 µl |

Es recomendable preparar la mezcla conjunta para todos los pocillos en un eppendorf de 200 µl, teniendo además en cuenta que es aconsejable hacer triplicados. A continuación, se reparten 29 µl de esta mezcla junto con 1,5 µl del cDNA correspondiente. Se le da un pulso con el vórtex y se dividen 10 µl en cada pocillo de la placa. Se tapa con un adhesivo, se le da otro pulso ahora con la centrífuga y se introduce en el termociclador con el siguiente programa:

- 10min a 95°C
- 40 ciclos compuestos por dos fases:
 - 3s a 95°C
 - 30s a 60°C

Análisis proteico de las cepas de *E. coli* con bombas transportadoras micobacterianas

Para comprobar si las proteínas transportadoras micobacterianas son producidas e incorporadas en la membrana plasmática de *E. coli*, se emplearon técnicas basadas en la proteómica. Para ello se procedió a la visualización del perfil proteico en geles SDS-PAGE.

1. Análisis del contenido proteico total en *E. coli*

Tratamiento de la muestra:

Se transfiere 1 ml de cultivo, crecido previamente en medio LB, a un eppendorf de 1,5 ml para ser centrifugado durante 3min a máxima velocidad. Se lava el pellet con 1 ml de PBS y se centrifuga en las mismas condiciones. Se resuspende la muestra en 20 μ l de tampón de carga y se hierve a 100°C durante 10min en un termobloque.

Reactivos:

- Gel separador (12%):
 - 3,2 ml H₂O
 - 4 ml Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)
 - 2,6 ml Tris-HCl 1,5 M pH:8,8
 - 100 μ l SDS 10% (w/v)
 - 10 μ l TEMED
 - 100 μ l Persulfato amónico (AP) 10% (w/v)
- Gel concentrador:
 - 2,975 ml H₂O
 - 670 μ l Acrilamida/bis-acrilamida (30%/0.8% w/v)
 - 1,25 ml Tris-HCl 0,5 M pH:6,8
 - 50 μ l SDS 10% (w/v)
 - 5 μ l TEMED
 - 50 μ l Persulfato amónico 10% (w/v)

- Tampón de carga:
 - 743 μ l Tris 0,5 M pH:6,8
 - 0,0025% Azul de bromofenol
 - 2,3 ml Glicerol 87% (w/v)
 - 375 μ l β -Mercatoetanol
- Tampón de electroforesis (1 L):
 - Tris-HCl 25 mM
 - Glicina 200 mM
 - SDS 0,1% (w/v)
- Solución de fijación:
 - 50 ml MeOH
 - 10 ml HAc
 - 40 ml H₂O
- Solución de teñido:
 - 45 ml MeOH
 - 10 ml HAc
 - 45 ml H₂O
 - 0.025% Azul de coomasie
- Solución de desteñido:
 - 90 ml MeOH
 - 20 ml HAc
 - 90 ml H₂O

Procedimiento:

- Con ayuda de una pipeta se va vertiendo el gel separador en el molde de los geles, completando las 2/3 partes. Se rellena con isopropanol para igualar el frente y se deja solidificar durante 30min. Transcurrido el tiempo se vierte el gel concentrador y se introduce el peine de los pocillos.
- Una vez polimerizado, se retiran los peines, se introduce en la cubeta de electroforesis y el tampón de electroforesis se vierte en los reservorios exteriores e interiores del dispositivo. Posteriormente, se cargan las muestras junto con el marcador de pesos moleculares PageRuler Plus Prestained Protein

Ladder, el cual proporciona el siguiente patrón de bandas: 10, 15, 25, 35, 55, 70, 100, 130 y 250pb. Finalmente, se enciende el dispositivo a la corriente durante 40min a 120V.

- Se saca el gel del dispositivo y se pone en contacto durante 30min con la solución de fijación, se tiñe el gel durante 1h con la solución de tinción y se deja durante toda la noche destiñendo.

2. Análisis de la fracción de proteínas de membrana de E. coli

Tratamiento de la muestra:

- Se transfiere 1 ml de cultivo, crecido previamente en medio LB, a un eppendorf de 1,5 ml para ser centrifugado a 4°C durante 5min a 14000rpm. Se lava el pellet con 500 µl de PBS y se centrifuga en las mismas condiciones.
- Se resuspende la muestra en 500 µl de Tris pH 7,5 + NaCl 50 mM y se somete a descargas de ultrasonidos a 4°C con 3 pulsos de 30-45s con ciclos de 30s de intervalo.
- Se centrifuga durante 5min a 4000rpm para eliminar las células no rotas.
- Se recoge el sobrenadante y se ultracentrifuga 1h a 100000xg y a 4°C. El sobrenadante son las proteínas citosólicas mientras que el pellet, las de membrana. Este se resuspende en 100 µl de PBS + 30 µl de tampón de carga y se hierve a 100°C durante 10min en un termobloque.
- Se centrifuga a 14000rpm durante 1min y se carga en el gel preparado previamente.

Resultados y Discusión

Estudio de las bombas de eflujo micobacterianas en un modelo de E. coli

1. Ensayos de susceptibilidad para las cepas de E .coli complementadas con bombas de eflujo de M. tuberculosis

Uno de los principales objetivos era averiguar si las bombas Tap, P55 y MmpL7 pertenecientes a *M. tuberculosis* e implicadas en la resistencia intrínseca a varios compuestos (Aínsa et al., 2008; De Rossi et al., 2006), eran capaces de expresarse en *E. coli* y complementar la ausencia de las propias bombas de eflujo presentes en este microorganismo. Para llevar a cabo dicho propósito, se compararon los niveles de resistencia a varios fármacos empleando las cepas *E. coli* deleccionadas en sus bombas con las complementadas con bombas de *M. tuberculosis* gracias a la introducción de los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7.

Los fármacos empleados en este estudio fueron las siguientes: INH, la cual tiene un papel muy importante en la terapia contra la tuberculosis; doxorubicina, descrita por ser sustrato de bombas de eflujo RND tales como AcrB y MmpL7 (Eicher et al., 2012); EtBr, sustrato común de diversas bombas de eflujo (Rodrigues et al., 2011); vancomicina, un antibiótico al que la bomba de eflujo P55 de *M. tuberculosis* confiere resistencia intrínseca (Villemas, 2013) y tres inhibidores indirectos de las bombas de eflujo clorpromazina (CPZ), carbonil cianida m-clorofenilhidrazona (CCCP) y verapamil (VP), los cuales actúan preferentemente sobre la fuerza protón-motriz o a nivel de los canales de calcio (Ramón-García et al., 2006).

En la **Tabla 6**, en las cepas derivadas de la estirpe 3AG100, se puede observar como al realizar estos ensayos con determinados fármacos tales como la INH, VP, vancomicina, CPZ y CCCP, no se encontraron diferencias apreciables respecto a las CIM.

Una diferencia de CIM se toma como significativa, cuando ésta represente al menos un cambio de 4 veces respecto a la cepa control.

No obstante, en el caso de la doxorubicina y del EtBr se obtuvieron resultados coherentes con lo que se ha descrito en otros artículos, debido a que ambos compuestos son sustratos de la bomba AcrB.

De esta manera, al suministrar doxorubicina y deleccionar la bomba AcrB en la cepa 3AG100, se observó una bajada bastante considerable de la CIM, la cual no se consiguió recuperar ni tras la incorporación de los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7 ni tras el reemplazamiento cromosómico del gen *acrB* por el gen híbrido de *acrB* y el que codifica la proteína transportadora MmpL7. En el caso del reemplazamiento cromosómico total del gen de la bomba AcrB por el gen completo de la proteína transportadora MmpL7, se obtuvo una CIM mayor que no alcanza nuestro criterio para ser considerada significativa, pero que sin embargo, podría estar sugiriendo una cierta expresión de la bomba micobacteriana MmpL7 en *E. coli*.

En el caso del EtBr, al deleccionar la bomba AcrB en la cepa 3AG100, ocurre algo similar a lo descrito anteriormente. Se contempló una disminución bastante significativa de la CIM, sin embargo, en este caso, al complementar la cepa con los plásmidos pCVF1, pCVF2 o al reemplazar la bomba AcrB por la proteína transportadora MmpL7, de manera total o parcial, se percibió un aumento de la CIM que tampoco resulta significativo. En el caso de la complementación de la cepa con pCVF7, se observó un ligero aumento en la CIM, lo cual podría estar sugiriendo una expresión de la bomba micobacteriana MmpL7 en *E. coli*.

En la **Tabla 7**, con las cepas de *E. coli* derivadas de BW25113, se puede apreciar como al realizar los ensayos de susceptibilidad con determinados fármacos tales como la INH, VP, vancomicina y CCCP, no se hallaron diferencias apreciables respecto a las CIM. Además, cuando la cepa BW25113 se complementó con los plásmidos pT7-7 y pCVF1, no se observaron diferencias relevantes respecto de la cepa wild-type, sugiriendo que estas construcciones no interfieren sobre el metabolismo de la cepa.

Sin embargo, en el caso de la doxorubicina y del EtBr se obtuvieron resultados coherentes con lo que se ha descrito en otros artículos, debido a que ambos compuestos son sustratos de la bomba AcrB.

Al proporcionar doxorubicina y deleccionar la bomba AcrB en la cepa BW25113, se advirtió una caída bastante significativa de la CIM y mucho más notoria en el caso del doble knock-out *AcrB EmrE* y del triple knock-out *AcrB MdfA EmrE*. Esta disminución no se logró recuperar en ninguno de los tres casos, sino que además en la cepa BW25113 Δ *acrB* al complementar la cepa con los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7, se observó una bajada leve de la CIM que resulta inexplicable; en cualquier caso, este descenso no se puede considerar significativo. Por el contrario, cuando se deleccionaron individualmente las bombas MdfA y EmrE, no se encontraron diferencias relevantes respecto a las CIM del wild-type, lo sugiere que la doxorubicina no es sustrato de estas bombas.

En el caso del inhibidor CPZ, al deleccionar la bomba AcrB en la cepa BW25113, se observó una bajada significativa de la CIM, la cual también se hizo evidente en el doble knock-out *AcrB EmrE* y el triple knock-out *AcrB MdfA EmrE*. Esto lo que podría estar sugiriendo es que la CPZ es sustrato de la bomba AcrB. Esta disminución de la CIM no se recuperó tras la complementación de las cepas con los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7. Por el contrario, cuando se deleccionaron individualmente las bombas MdfA y EmrE, no se encontraron diferencias significativas respecto a las CIM del wild-type, lo cual está insinuando que la CPZ no es sustrato de estas bombas.

Al suministrar EtBr y deleccionar la bomba AcrB en la cepa BW25113, se apreció una bajada bastante relevante de la CIM, así como en el caso del doble knock-out *AcrB EmrE* y del triple knock-out *AcrB MdfA EmrE*, siendo en esta última mucho más visible. Sin embargo, esta disminución no se consiguió recuperar, tras la transformación de la cepa con los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7. Por el contrario, cuando se deleccionaron individualmente las bombas MdfA y EmrE, no se encontraron diferencias significativas respecto a las CIM del wild-type, lo cual está sugiriendo que la EtBr no es sustrato de estas bombas. A pesar de ello, cuando se adicionó EtBr al doble knock-out *MdfA EmrE*, se percibió una disminución de la CIM respecto del wild-type, lo cual podría indicar que la eliminación de estas bombas, aunque no estén involucradas en el transporte de este sustrato, podrían afectar a la viabilidad de la cepa.

En definitiva, el hecho de que las bombas Tap, P55 y MmpL7 micobacterianas no complementen el fenotipo de las cepas de *E. coli* delecionadas en el gen *acrB*, puede ser debido a que estas proteínas no se estén expresando o en caso de que lo estén haciendo se produzcan de una manera no funcional. Hay que tener en cuenta que la membrana bacteriana de *M. tuberculosis* es distinta en composición a la de *E. coli* y esto podría afectar al anclaje de las proteínas de *M. tuberculosis* en la membrana de *E. coli*, y/o a su actividad o a la interacción con otras proteínas.

| Cepas | CIM ($\mu\text{g/ml}$) | Compuestos | | | | | |
|---|--------------------------|---------------|-----------|-------------|-----|------|------|
| | INH | Doxorrubicina | Verapamil | Vancomicina | CPZ | CCCP | EtBr |
| 3AG100 | >200 | 50 | >500 | >100 | 25 | 12,5 | 70 |
| ΔacrB | >200 | 3,1 | >500 | >100 | 25 | 6,25 | 4,1 |
| ΔacrB pCVF1 [CVF16] | >200 | 3,1 | 250 | >100 | 25 | 25 | 8,7 |
| ΔacrB pCVF2 [CVF17] | >200 | 3,1 | 250 | >100 | 25 | 25 | 8,7 |
| ΔacrB pCVF7 [CVF18] | >200 | 3,1 | 500 | >100 | 25 | 6,25 | 17,5 |
| $\text{acrB}::\text{mmpL7}$ [CVF13] | >200 | 1,56 | >500 | >100 | 25 | 6,25 | 8,7 |
| acrB615-28mmpL7 [CVF19] | >200 | 6,25 | 250 | >100 | 25 | 25 | 8,7 |

Tabla 6. CIM de distintos compuestos para 3AG100 y derivados.

| Cepas | Compuestos | | | | | | |
|--|------------|---------------|-----------|-------------|-----|------|-------|
| | INH | Doxorrubicina | Verapamil | Vancomicina | CPZ | CCCP | EtBr |
| BW25113 | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 12,5 | >140 |
| pT7-7 [CVF1] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 12,5 | >140 |
| pCVF1 [CVF2] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | >140 |
| ΔacrB | >200 | 12,5 | 500 | >100 | 25 | 12,5 | 17,5 |
| ΔacrB pCVF1 [CVF10] | >200 | 6,25 | 500 | 100 | 25 | 12,5 | 17,5 |
| ΔacrB pCVF2 [CVF11] | >200 | 6,25 | 500 | 100 | 50 | 12,5 | 17,5 |
| ΔacrB pCVF7 [CVF14] | >200 | <3,12 | 500 | >100 | 50 | 12,5 | 17,5 |
| ΔemrE | >200 | 100 | >500 | 100 | 100 | 12,5 | >140 |
| ΔemrE pCVF1 [CVF7] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | >140 |
| ΔemrE pCVF2 [CVF8] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | >140 |
| ΔemrE pT7-7 [CVF22] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 70 |
| ΔmdfA | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | >140 |
| ΔmdfA pCVF1 [CVF5] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 140 |
| ΔmdfA pCVF2 [CVF6] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 140 |
| ΔacrB ΔemrE | >200 | 6,25 | 500 | >100 | 25 | 12,5 | 8,76 |
| ΔmdfA ΔemrE | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 35 |
| ΔmdfA ΔemrE pCVF1 [CVF3] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 35 |
| ΔmdfA ΔemrE pCVF2 [CVF9] | >200 | 100 | >500 | >100 | 100 | 25 | 35 |
| ΔacrB ΔmdfA ΔemrE | >200 | 3,12 | 500 | >100 | 25 | 6,25 | <2,18 |
| ΔacrB ΔmdfA ΔemrE pCVF1 [CVF4] | >200 | 3,12 | 500 | >100 | 25 | 6,25 | <2,18 |
| ΔacrB ΔmdfA ΔemrE pCVF2 [CVF12] | >200 | 3,12 | 500 | >100 | 25 | 6,25 | <2,18 |

Tabla 7. CIM de distintos compuestos para BW25113 y derivados.

2. Ensayos de cinética de eflujo

Para corroborar los datos obtenidos mediante ensayos de susceptibilidad, se realizaron experimentos de acumulación y eflujo con EtBr, compuesto fluorescente muy empleado en este tipo de estudios (Rodrigues *et al.*, 2013). Se llevó a cabo esta comparación para ver si se detectaba algún tipo de diferencia, ya que la determinación de CIM nos indica el nivel de resistencia de una cepa al final del periodo de incubación como consecuencia de todos los mecanismos de resistencia que disponga, mientras que los ensayos de cinética de eflujo son pruebas donde los resultados se obtienen de modo continuo durante un periodo de tiempo corto y permiten detectar la actividad de la bomba directa.

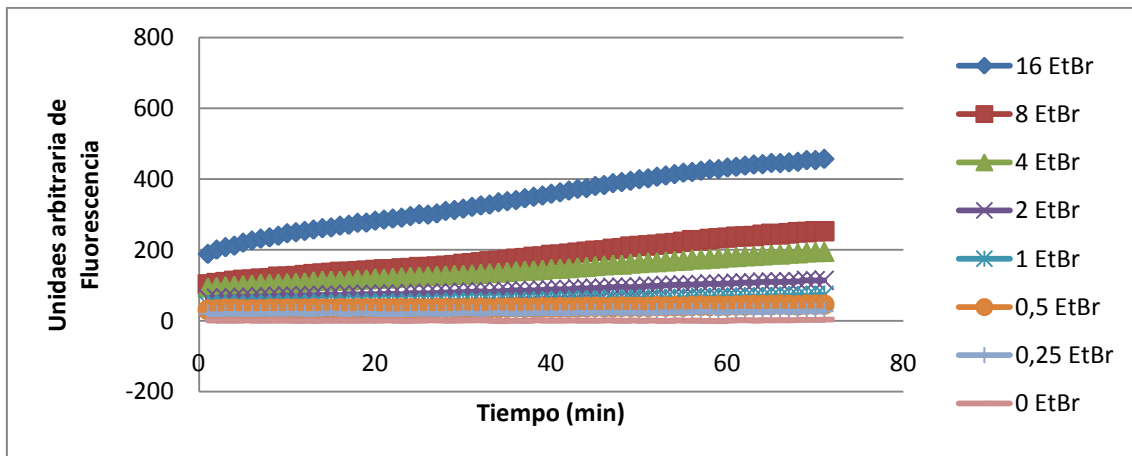


Figura 8. Ensayo de cinética de eflujo para la cepa 3AG100.

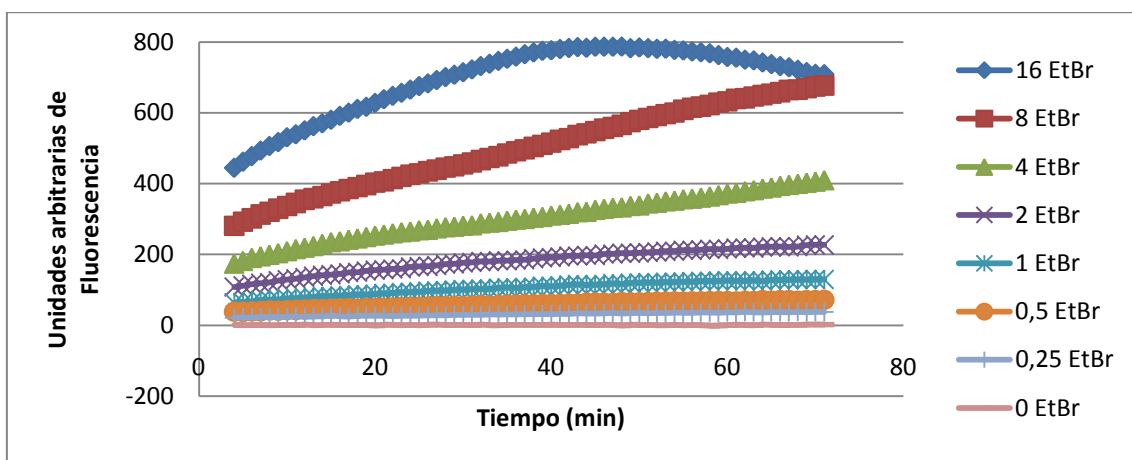


Figura 9. Ensayo de cinética de eflujo para la cepa ST.540.

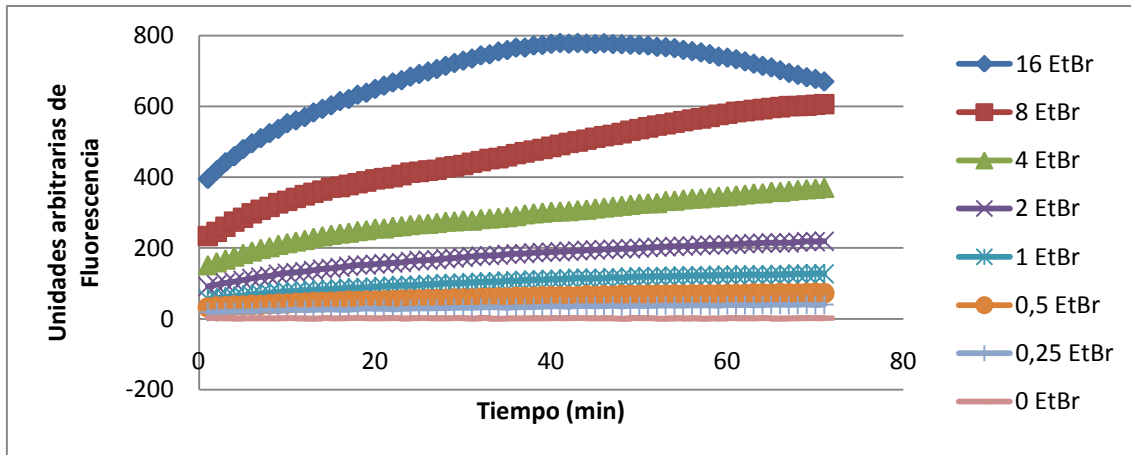


Figura 10. Ensayo de cinética de eflujo para la cepa CVF18.

Como se puede observar, a modo de ejemplo, en las **Figuras 8, 9 y 10**, la cepa 3AG100 acumula mucho menos EtBr que la cepa St.540, la cual tiene delecionada la bomba de eflujo AcrB. Este dato concuerda con el obtenido en los ensayos de susceptibilidad en el que se vio que el EtBr era sustrato de esta bomba de eflujo. Al comparar la cepa St.540 con CVF18, se ratifica el dato de que la bomba MmpL7 no suple la deficiencia de AcrB ya que ambas cepas acumulan cantidades similares.

Se realizaron más experimentos, en los que se empleó la cepa BW25113 delecionada en las bombas de eflujo AcrB, MdfA y EmrE. Sin embargo, el único resultado significativo que se obtuvo, fue que siempre que la bomba AcrB estaba delecionada se acumulaba más EtBr.

3. Ensayos de expresión génica

Los resultados de los ensayos de susceptibilidad y de los estudios de acumulación y eflujo sugirieron que las bombas micobacterianas no se expresan en *E. coli*, o lo hacen a muy bajo nivel, por esto, se quiso verificar su expresión a nivel transcripcional mediante RT-PCR.

Tal y como muestran las **Figuras 11 y 12**, los genes de las proteínas transportadoras Tap y P55 clonados en el plásmido pT7-7 de modo independiente sí que se están expresando, obteniéndose en los dos casos un nivel de expresión similar.

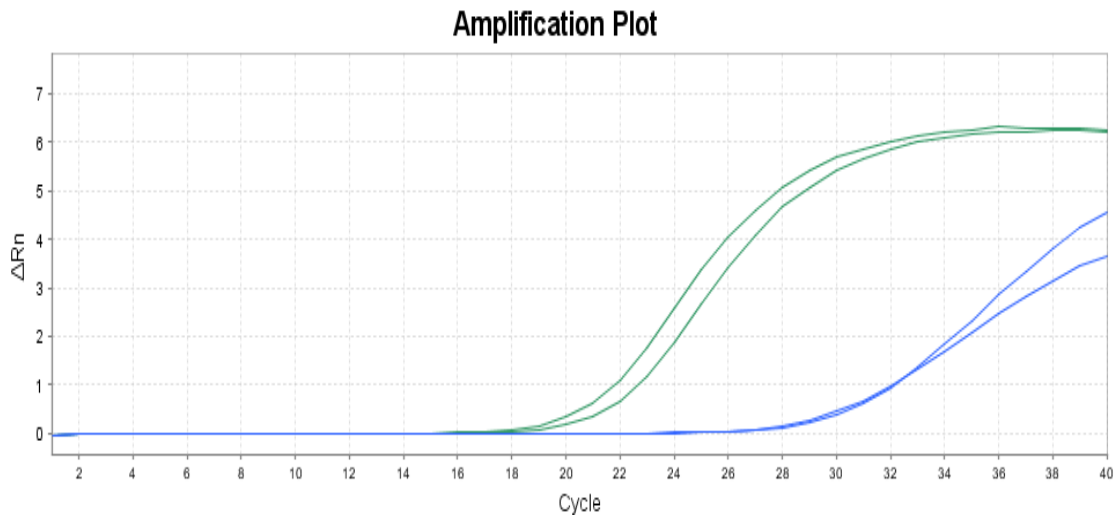


Figura 11. Expresión génica de la bomba transportadora *Tap* (verde) en comparación con el gen endógeno *gapA* (azul).

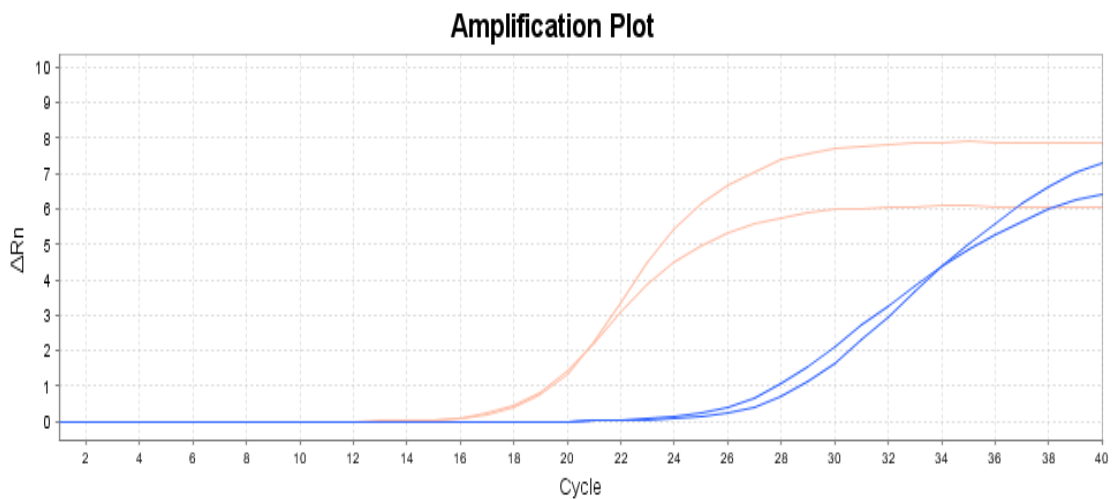


Figura 12. Expresión génica de la bomba transportadora *P55* (rosa) en comparación con el gen endógeno *gapA* (azul).

Sin embargo, el gen *mmpL7* sólo se detecta su expresión cuando está reemplazando al gen *acrB* en el cromosoma de *E. coli*, mientras que no se detecta expresión a partir del plásmido pCVF7 (**Figuras 13 y 14**).

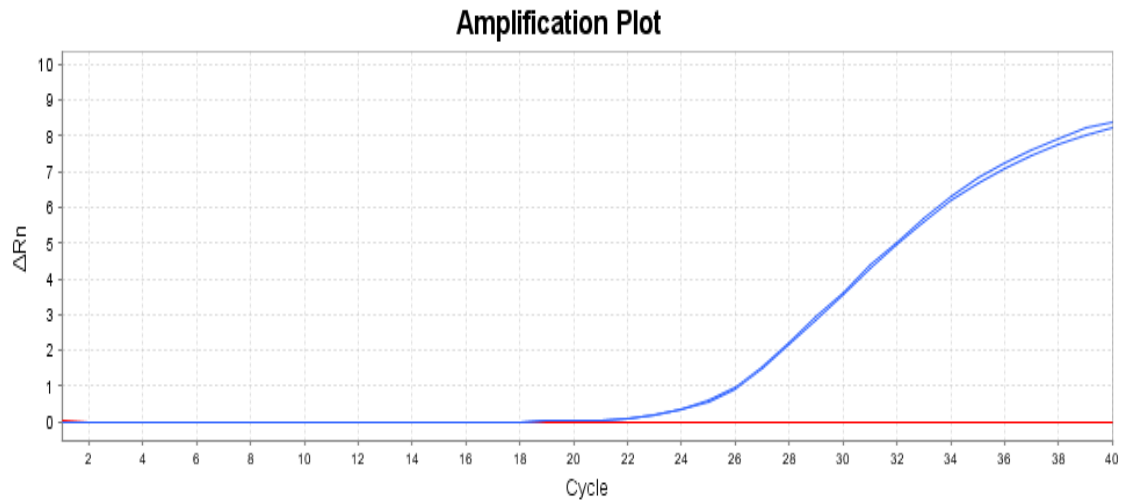


Figura 13. Expresión génica de la bomba transportadora *MmpL7* (rojo) en comparación con el gen endógeno *gapA* (azul).

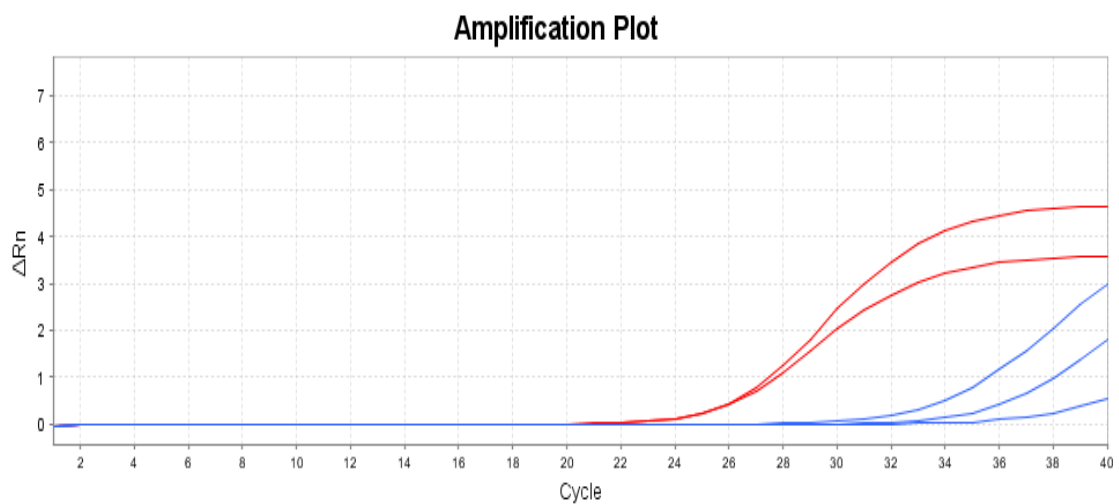


Figura 14. Expresión génica de la bomba transportadora *MmpL7* (azul), codificada en el cromosoma por reemplazamiento del gen *acrB*, en comparación con el gen endógeno *gapA* (rojo).

Generación y caracterización del mutante oxyR en E. coli

Tras no observarse ningún tipo de diferencia significativa en los ensayos de susceptibilidad entre las cepas delecionadas en sus propias bombas y las complementadas con las proteínas micobacterianas, se llevó a cabo la construcción del

mutante *oxyR* en *E. coli* BW25113. La generación de esta cepa tuvo un doble objetivo; por un lado, se trataba de volver a ensayar la actividad de las bombas de eflujo de micobacterias en una cepa defectiva en *oxyR*, por si este sistema pudiera tener mayor sensibilidad; además, al obtener un mutante de *E. coli* altamente sensible a la INH de modo similar a *M. tuberculosis*, se podría estudiar la resistencia a este compuesto.

Tal y como muestra la **Figura 15**, la PCR resultante de la amplificación del fragmento *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR* con los cebadores OxyR1 y OxyR2, funcionó correctamente y produjo fragmentos de aproximadamente 1,6Kb; mientras que con los cebadores P1 y P2, estos fueron de 1,5Kb. Como molde se utilizaron diversas diluciones del plásmido pKD4 a partir del stock 922ng/μl. Se observó, además, la presencia de varias bandas inespecíficas, donde las correspondientes al primer gel, por su pequeño tamaño, podrían deberse a la propia amplificación de los cebadores, y las del segundo gel, por su tamaño tan grande, podrían ser restos del plásmido entero.

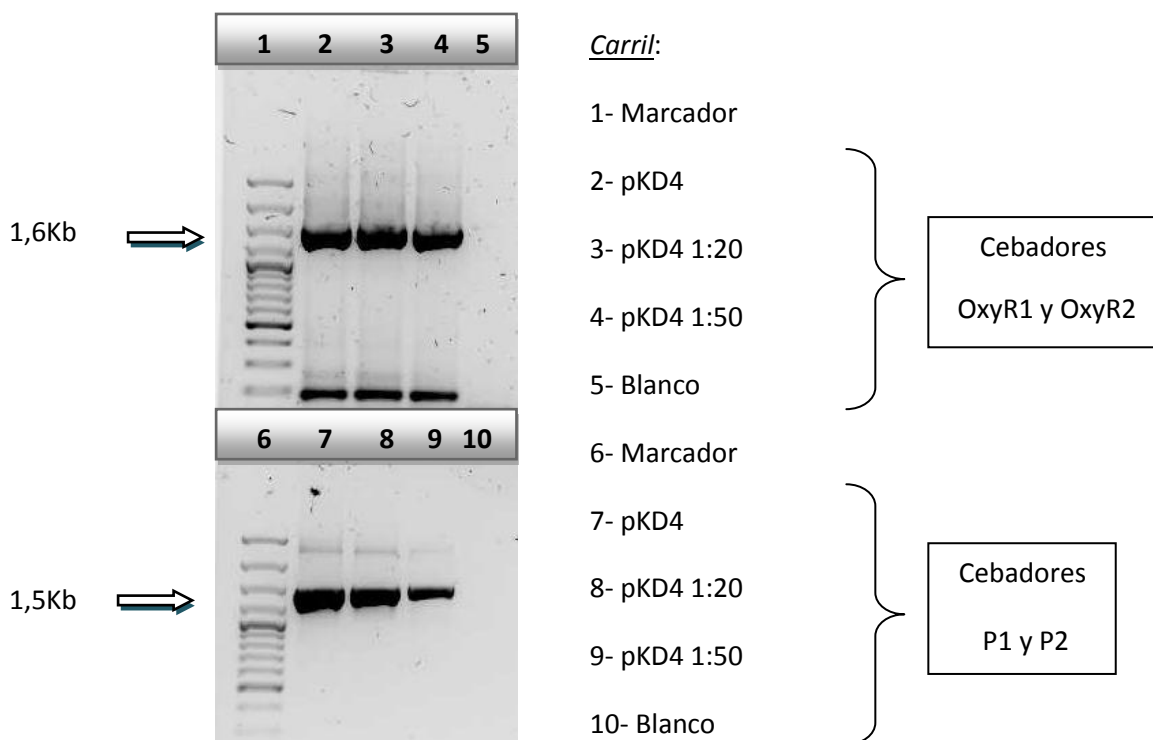


Figura 15. Electroforesis tras la realización de la PCR con los cebadores OxyR1 vs OxyR2 y P1vs P2.

A continuación, se intentó eliminar los productos inespecíficos de la reacción de amplificación con los cebadores OxyR1 y OxyR2, variando las condiciones experimentales de temperatura y de concentración de los cebadores (**Figura 16**).

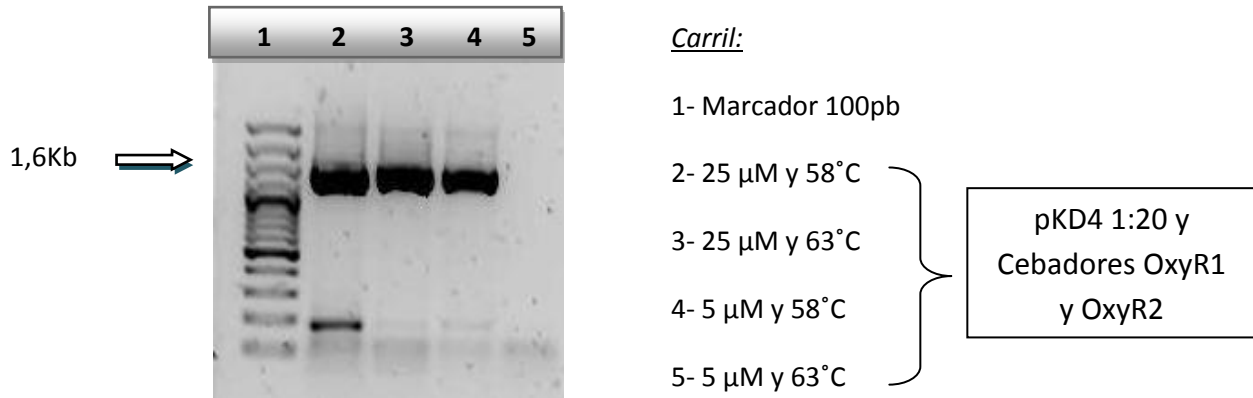


Figura 16. Electroforesis tras la modificación de las condiciones experimentales de temperatura de annealing y concentración de cebadores.

Se puede concluir que las condiciones idóneas para amplificar el fragmento *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR* con los cebadores OxyR1 y OxyR2 son las siguientes: una concentración final de plásmido pKD4 de 3,68ng/ μ l, una concentración de 25 μ M para los cebadores y una temperatura de annealing de 63°C.

A continuación, se procedió a la purificación del fragmento amplificado *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR*, para introducirlo en las células competentes de BW25113/pKD46. Para la transformación, se siguió el protocolo de electroporación previamente descrito, incluyendo además un control positivo y un control negativo. El primero se realizó añadiendo a los 150 μ l de células competentes 1 μ l del plásmido pKD4 mientras que al control negativo no se le adicionó nada. Tras plaquear y dejar incubar durante toda la noche, se obtuvieron colonias en la placa correspondiente a la transformación de las células competentes BW25113/pDK46 con el producto *oxyR*-P1-Km-P2-*oxyR*. En la electroporación de las células competentes BW25113/pDK46 con el plásmido pKD4 (control positivo) también se obtuvieron colonias. En los dos casos, se podían observar dos tipos de colonias distinguibles por el tamaño. En el control negativo también se obtuvieron colonias, y en este caso, todas eran de pequeño tamaño.

En este momento, se asumió que las colonias grandes eran producto de la transformación, ya que se obtuvieron tanto en la placa correspondiente a la transformación como en el control positivo, mientras que en el control negativo no aparecieron colonias con esta morfología. A partir de las colonias grandes, se realizaron nuevos cultivos y se procedió a la verificación del intercambio alélico mediante PCR. Para ello, se realizaron dos PCR, unas con los cebadores OxyR_Fw vs OxyR_Rv y la otra con OxyR_Rv vs Tn 5D.

Tal y como muestra la **Figura 17**, en todas las colonias se había producido el intercambio alélico, ya que se obtuvieron las bandas esperadas de 1,7Kb y 410pb, respectivamente. En conclusión, se ha obtenido el mutante con la delección en *oxyR*.

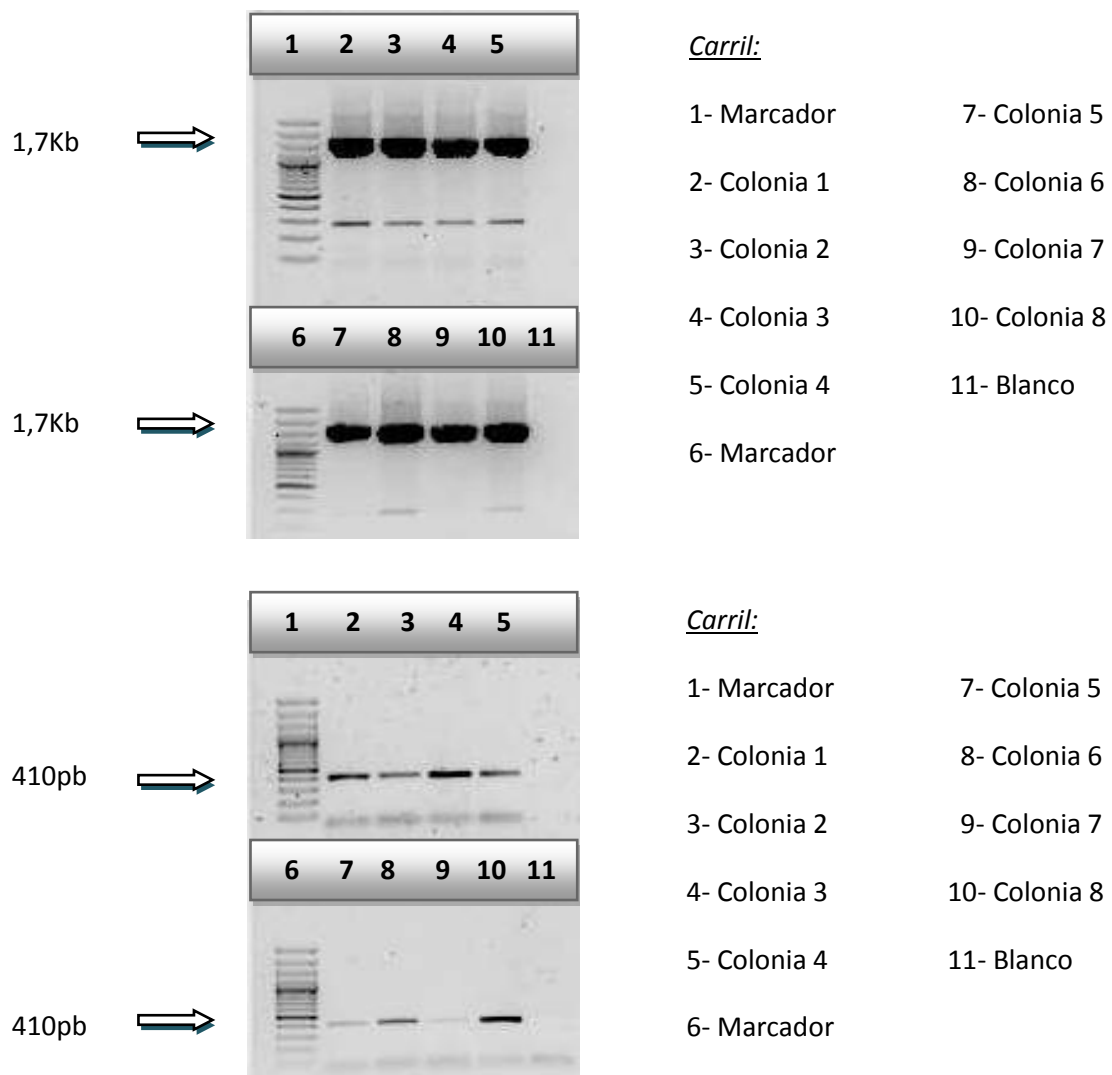
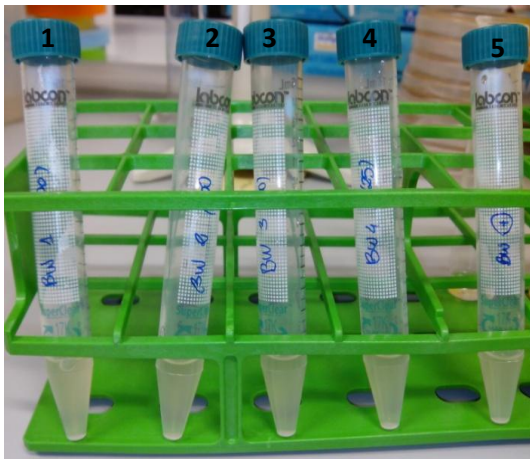


Figura 17. Electroforesis para comprobar la transformación tras la realización de las PCR con los cebadores OxyR_Fw vs OxyR_Rv y OxyR_Rv vs Tn 5D.

1. Ensayos de susceptibilidad a la INH

Tras construir el mutante knock-out en el gen *oxyR*, se realizaron ensayos de susceptibilidad a la INH para verificar la sensibilidad a este compuesto. Estos se efectuaron por macrodilución, ya que fue imposible hacerlo crecer en un volumen más pequeño, seguramente debido al desencadenamiento de una respuesta frente al estrés como consecuencia de la escasez de oxígeno y nutrientes.

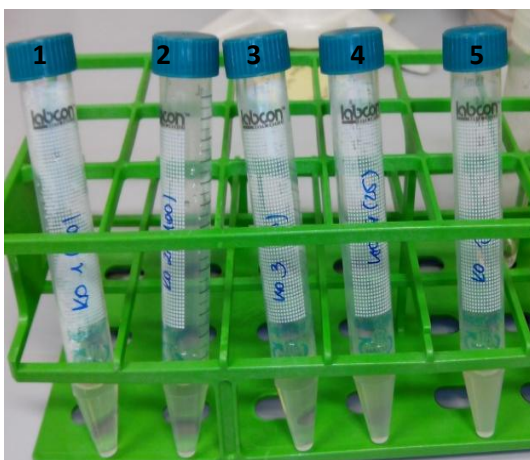
En las **Figuras 18 y 19** se puede observar que el mutante *oxyR* en *E. coli* BW25113 es sensible a la INH, tal y como se esperaba. Mientras que para la cepa wild-type la CIM para la INH es $>200 \mu\text{g/ml}$, para el KO es de $50 \mu\text{g/ml}$.



Falcon:

- 1-BW25113: $200 \mu\text{g/ml}$ INH
- 2- BW25113: $100 \mu\text{g/ml}$ INH
- 3- BW25113: $50 \mu\text{g/ml}$ INH
- 4- BW25113: $25 \mu\text{g/ml}$ INH
- 5- Control de crecimiento (sin INH)

Figura 18. CIM para *E. coli* BW25113 respecto a la INH.



Falcon:

- 1- BW25113 KO *oxyR*: $200 \mu\text{g/ml}$ INH
- 2- BW25113 KO *oxyR*: $100 \mu\text{g/ml}$ INH
- 3- BW25113 KO *oxyR*: $50 \mu\text{g/ml}$ INH
- 4- BW25113 KO *oxyR*: $25 \mu\text{g/ml}$ INH
- 5- Control de crecimiento (sin INH)

Figura 19. CIM para *E. coli* BW25113 KO en *oxyR* respecto a la INH.

2. Ensayos de susceptibilidad tras la complementación con los plásmidos pCVF1, pCVF2 y pCVF7

Tras comprobar que el mutante era más sensible a la INH que la cepa original BW25113, se llevó a cabo la complementación del mismo con los plásmidos pCVF1 (Tap), pCVF2 (P55) y pCVF7 (MmpL7). Lo que se pretende es verificar si la introducción de estos plásmidos altera la sensibilidad a la INH, ya que es conocido que la bomba MmpL7 es responsable del eflujo de este fármaco en *M. smegmatis* (Pasca et al., 2005). Antes de llevar a cabo los ensayos de susceptibilidad se comprobó mediante electroforesis que las cepas habían sido transformadas con éxito (resultados no mostrados).

Los resultados obtenidos en los ensayos de susceptibilidad a INH tras la complementación del mutante *oxyR* con las proteínas micobacterianas no rindieron diferencias significativas respecto al KO, poniéndose así de manifiesto que estas bombas pertenecientes a *M. tuberculosis* no contribuyen al transporte de INH en *E. coli*, ni siquiera en el caso de la complementación con la bomba MmpL7.

3. Determinación de la expresión génica de las bombas Tap, P55 y MmpL7

Tal y como se hizo en los experimentos anteriores con las cepas derivadas de 3AG100 y BW25113, se trató de detectar la expresión de los genes que codifican las bombas de eflujo Tap, P55 y MmpL7 en el mutante de *E. coli* con la delección en *oxyR*. Se observó la expresión génica de las bombas Tap y P55, sin embargo, no se detectó la expresión de MmpL7 (resultados equivalentes a los mostrados en las **Figuras 11, 12 y 13**).

4. Análisis del extracto proteico de membrana

Finalmente, tras comprobarse que las bombas micobacterianas Tap y P55 sí que se estaban transcribiendo dentro de *E. coli*, se quiso comprobar si finalmente se estaban sintetizando dentro de su pared bacteriana.

Para ello, se extrajeron las proteínas totales de *E. coli* y se realizó una electroforesis en gel de poliacrilamida al 12%. Sin embargo, en estas condiciones, no se observó ninguna diferencia significativa en los perfiles proteicos de la cepa wild-type (BW25113) respecto a sus derivados el mutante *oxyR* y las cepas que llevaban los plásmidos que expresan las proteínas Tap y P55 (resultados no mostrados).

A continuación, se procedió a extraer solo las proteínas de membrana de estas mismas cepas, asumiendo que al eliminar las proteínas citosólicas sería más probable observar alguna diferencia en el perfil de proteínas de membrana. En estas condiciones, en las cepas complementadas con los plásmidos pCVF1 (Tap) y pCVF2 (P55), cabía esperar la presencia de una nueva proteína correspondiente a la expresión de dichas proteínas micobacterianas. Mientras que Tap posee un peso molecular de 43KDa, el de P55 es de 55KDa.

Como muestra la **Figura 20**, los perfiles proteicos de expresión siguen siendo muy similares, pero ahora se observa una banda más intensa en la cepa complementada con el plásmido que expresa la bomba Tap, que según el tamaño estimado para esta banda, pudiera corresponder con la expresión de esta proteína.

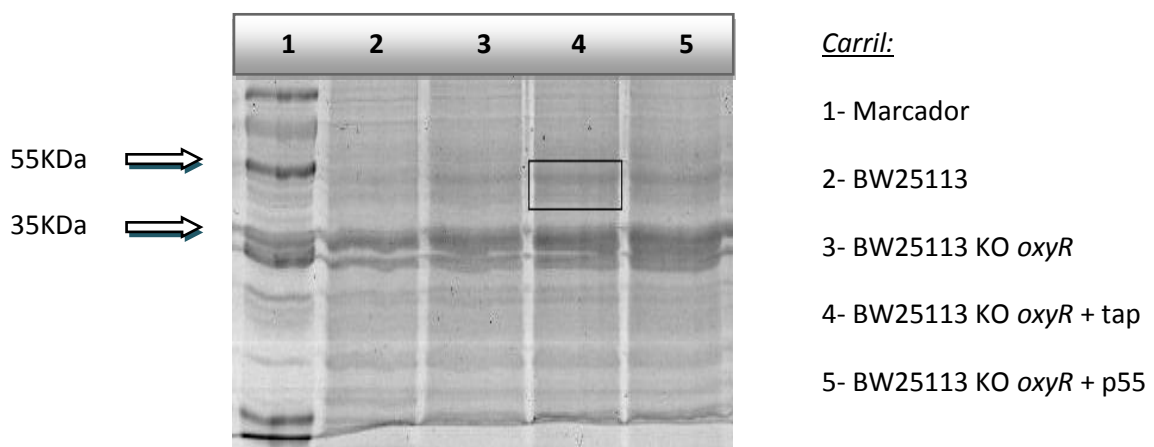


Figura 20. Electroforesis del extracto proteico de membrana. El recuadro mostrado en el carril 4, representa la banda que se recortó y se mandó a secuenciar.

A continuación, se recortó la banda que se muestra en el gel y se mandó a secuenciar al Servicio Científico-Técnico de Proteómica del IACS. Los resultados obtenidos tras la

identificación gracias al MALDI TOF, mostraron la presencia de cinco proteínas todas ellas pertenecientes a *E. coli* y con un peso molecular similar al de la proteína Tap. Sin embargo, la proteína Tap no fue identificada por esta técnica en esta muestra, lo cual no permite comprobar que esté presente en la muestra.

Conclusiones y Perspectivas

- Al complementar las cepas de *E. coli* (derivadas de BW25113 o de 3AG100) delecionadas en la bomba AcrB con las proteínas micobacterianas Tap y P55, no se alteran los niveles de resistencia a los sustratos de AcrB doxorubicina y EtBr.
- Las bombas micobacterianas Tap y P55 no suplen las deficiencias causadas por la deleción de los transportadores MdfA y EmrE en *E. coli* BW25113.
- El inhibidor CPZ es un sustrato de la bomba AcrB en *E. coli* BW25113.
- La expresión de las proteínas micobacterianas Tap y P55 en la cepa de *E. coli* delecionada en la bomba AcrB, no altera los niveles de acumulación de EtBr.
- Los genes que codifican las proteínas transportadoras Tap y P55 clonados, respectivamente, en los plásmidos pCVF1 y pCVF2 se expresan en *E. coli*.
- El mutante de *E. coli* delecionado en el gen *oxyR* muestra mayor sensibilidad a la INH que la cepa original. Sin embargo, las bombas micobacterianas Tap y P55 no son capaces de alterar esta sensibilidad.
- No se ha podido verificar la producción de la proteína Tap en *E. coli* mediante análisis del extracto proteico de membrana.
- El gen que codifica la bomba MmpL7 de *M. tuberculosis* no se expresa a partir del plásmido pCVF7.
- La sustitución en el cromosoma de *E. coli* 3AG100 del gen *acrB* por el gen híbrido de *acrB* y *mmpL7* o por el gen *mmpL7* completo, produce un fenotipo similar a la deleción del gen *acrB*.

En definitiva, las distintas aproximaciones utilizadas en este trabajo (sobrexpresión de genes en plásmidos, complementación de cepas deficientes en transportadores, sustitución de genes cromosómicos, utilización de distintos fondos genéticos) no han

permitido por el momento desarrollar un modelo rápido para estudiar la función y/o los sustratos de las bombas de eflujo de micobacterias. Por ello, se requieren más estudios e investigaciones en las que se optimice la síntesis de las proteínas micobacterianas en *E. coli*, se asegure su funcionalidad y el correcto anclaje en la membrana, entre otros factores.

En la actualidad existen pocas publicaciones destinadas a sintetizar proteínas micobacterianas en otro microorganismo que no pertenezca al género *Mycobacterium*, por lo que este trabajo abre nuevos horizontes mostrando una primera aproximación a ello.

Referencias Bibliográficas

1. **Aínsa, J.A., Blockpoel, C.J., Otal, I., Young, D.B., De Smet, K.A.L., and Martín, C.** 1998. *Molecular cloning and characterization of Tap, a putative multidrug efflux pump present in Mycobacterium fortuitum and Mycobacterium tuberculosis.* Journal of Bacteriology 180(22): 5836–5843.
2. **Barry, C.E. 3rd., Lee, R.E., Mdluli, K., Sampson, A.E., Schroeder, B.G., Slayden, R.A., and Yuan, Y.** 1998. *Mycolic acids: structure, biosynthesis and physiological functions.* Progress in Lipid research 37(2-3):143-79.
3. **Bohnert, J.A., Schuster, S., Seeger, M.A., Fähnrich, E., Pos, K.M., and Kern, W.V.** 2008. *Site-directed mutagenesis reveals putative substrate binding residues in the Escherichia coli RND efflux pump AcrB.* Journal of Bacteriology 190(24):8225.
4. **Brennan, P.J.** 1989. *Structure of mycobacteria: recent developments in defining cell wall carbohydrates and proteins.* Reviews of Infectious Diseases 1989:11 Suppl 2:S420–30.
5. **Christman, M.F., Storz, G., and Ames B.N.** 1989. *OxyR, a positive regulator of hydrogen peroxide-inducible genes in Escherichia coli and Salmonella typhimurium, is homologous to a family of bacterial regulatory proteins.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 86 (10):3484-8.
6. **Daffé, M., and Etienne, G.** 1999. *The capsule of Mycobacterium tuberculosis and its implications for pathogenicity.* Tubercle and Lung Disease 79(3):153-69.
7. **Datsenko, K.A., and Wanner, B.L.** 2000. *One-step inactivation of chromosomal genes in Escherichia coli K-12 using PCR products.* Proceedings of the National Academy of Sciences EE. UU 6;97(12):6640-5.
8. **De Rossi, E., Aínsa, J.A., and Riccardi, G.** 2006. *Role of mycobacterial efflux transporters in drug resistance: an unresolved question.* FEMS Microbiology Reviews 30(1):36-52.
9. **Eichera, T., Chaa, H., Seegerb, M.A., Brandstättera, L., El-Delika, J., Bohnertd, J.A., Kernd, W.V., Verreyb, F., Grütterc, M.G., Diederichse, K., and Posa, K.M.** 2012. *Transport of drugs by the multidrug transporter AcrB involves an access and a deep*

- binding pocket that are separated by a switch-loop.* Proceedings of the National Academy of Sciences USA 109(15): 5687–5692.
10. **Fernandez, L., and Hancock, R.E.** 2012. *Adaptive and mutational resistance: role of porins and efflux pumps in drug resistance.* Clinical Microbiology Reviews 25:661-681.
 11. Fitzmaurice, J., Glennon, M., Duffy, G., Sheridan, J.J., Carroll, C., and Maher, M. 2004. Application of real-time PCR and RT-PCR assays for the detection and quantitation of VT 1 and VT 2 toxin genes in *E. coli*O157:H7. Molecular and Cellular Probes 18(2):123-132.
 12. **Guo, Y., Wallace, S.S., and Bandaru, V.** 2009. *A novel bicistronic vector for overexpressing Mycobacterium tuberculosis proteins in Escherichia coli.* Protein expression and purification 65:230-237.
 13. **Hogan, D., and Kolter, R.** 2002. *Why are bacteria refractory to antimicrobials?* Current opinion in Microbiology 5:472-477.
 14. **Jellen-Ritter, A.S., and Kern, W.V.** 2001. *Enhanced expression of the multidrug efflux pumps AcrAB and AcrEF associated with insertion element transposition in Escherichia coli mutants Selected with a fluoroquinolone.* Antimicrobial agents and chemotherapy 45:1467-1472.
 15. **Levy, S.B.** 2002. *Active efflux, a common mechanism for biocide and antibiotic resistance.* Journal of Applied Microbiology 92:65S-71S.
 16. **Li, X.Z., and Nikaido, H.** 2004. *Efflux-mediated drug resistance in bacteria.* Drugs 64(2):159-204.
 17. **Li, X.Z., Livermore, D.M., and Nikaido, H.** 1994. *Role of efflux pump(s) in intrinsic resistance of Pseudomonas aeruginosa-resistance to tetracycline, chloramphenicol, and norfloxacin.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 38:1732-1741.
 18. **Neralla, S., and Glassroth, J.** 2003. *Mycobacterium tuberculosis: the treatment of active disease.* Seminars in Respiratory Infections 18(4):292-306.
 19. **Nguyen, L., and Thompson, C.J.** 2006. *Foundations of antibiotic resistance in bacterial physiology: the mycobacterial paradigm.* Trends in Microbiology 14: 304–312.
 20. **Nikaido, H.** 1994. *Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barriers and active efflux.* Science 264:382-388.

21. **Nikaido, H.** 2001. *Preventing drug access to targets: cell surface permeability barriers and active efflux in bacteria.* *Seminars in Cell & Developmental Biology* 12:215-223.
22. **Ninio, S., D. Rotem, and S. Schuldiner.** 2001. *Functional analysis of novel multidrug transporters from human pathogens.* *The Journal of Biological chemistry* 276:48250-48256.
23. **Normark, B.H., and Normark, S.** 2002. *Evolution and spread of antibiotic resistance.* *Journal of Internal Medicine* 252:91-106.
24. **Ouellet, H., J. B. Johnston, and P. R. de Montellano.** 2011. *Cholesterol catabolism as a therapeutic target in Mycobacterium tuberculosis.* *Trends in microbiology* 19:530-539.
25. **Pasca, M.R., Guglierame, P., De rossi, E., Zara, F., and Riccardi, G.** 2005. *MmpL7 gene of Mycobacterium tuberculosis is responsible for isoniazid efflux in Mycobacterium smegmatis.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49(11):4775-7.
26. **Paulsen, I.T., Brown, M.H., and Skurray, R.A.** 1996. *Proton-dependent multidrug efflux systems.* *Microbiological Reviews* 60:575–608.
27. **Piddock, L.J.** 2006. *Clinically relevant chromosomally encoded multidrug resistance efflux pumps in bacteria.* *Clinical Microbiology Reviews* 19:382-402.
28. **Piddock, L.J.** 2006. *Multidrug-resistance efflux pumps - not just for resistance.* *Nature Reviews Microbiology* 4:629-636.
29. **Ramón-García, S., Mick, V., Dainese, E., Martín, C., Thompson, C.J., De Rossi, E., Manganeli, R., and Aínsa, J.A.** 2012. *Functional and genetic characterization of the tap efflux pump in Mycobacterium bovis BCG.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 56(4):2074.
30. **Ramon-Garcia, S., Martin, C., C.J., and Aínsa, J.A., and De Rossi, E.** 2006. *Characterization of tetracycline resistance mediated by the efflux pump Tap from Mycobacterium tuberculosis.* *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 57, 252–259
31. **Ramon-Garcia, S., Martin, C., Thompson, C.J., and Aínsa, J.A.** 2009. *Role of the Mycobacterium tuberculosis P55 efflux pump in intrinsic drug resistance, oxidative stress responses, and growth.* *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 53:3675-3682.

32. **Roberts, M.C.** 1996. *Tetracycline resistance determinants: mechanisms of action, regulation of expression, genetic mobility, and distribution.* FEMS Microbiology Reviews 19:1-24.
33. **Rodrigues, L., Aínsa, J.A., Amaral, L., and Viveiros, M.** 2011. *Inhibition of drug efflux in Mycobacteria with phenothiazines and other putative efflux inhibitors.* Recent patents on anti-infective drug discovery 6, 000-000.
34. **Rodrigues, L., Villellas, C., Bailo, R., Viveiros, M., and Aínsa, J.A.** 2013. *Role of the Mmr efflux pump in drug resistance in Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 57(2):751-7.
35. **Rosner, J.L.** 1993. *Susceptibilities of oxyR regulon mutants of Escherichia coli and Salmonella typhimurium to isoniazid.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 37:2251-2253.
36. **Ryan, B.M., Dougherty, T.J., Beaulieu, D., Chuang, J., Dougherty, B.A., and Barrett, J.F.** 2001. *Efflux in bacteria: what do we really know about it?* Expert Opinion on Investigational Drugs 10:1409-1422.
37. **Silva, P.E., Bigi, F., Santangelo, M.P., Romano, M.I., Martín, C., Cataldi, A., and Aínsa, J.A.** 2001. *Characterization of P55, a multidrug efflux pump in Mycobacterium bovis and Mycobacterium tuberculosis.* Antimicrobial Agents and Chemotherapy 45(3):800-4.
38. **Sinha, P., Santha Kumar, T.R., Darokar, M.P., and Khanuja, S.P.S.** 2006. *Isolation of oxidative stress response mutants in Escherichia coli for their use as a genetic screen to identify new anti-mycobacterials as functional analogues of isoniazid.* World Journal of Microbiology & Biotechnology (2006) 22: 791–798.
39. **Stackebrandt, E., Rainey, F.A., and Ward-Rainey, N.L.** 1997. *Proposal for a new hierarchic classification system Actinobacteria classis nov.* International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology 47:479-491.
40. **Stewart, G.R., Robertson B.D., and Young D.B.** 2003. *Tuberculosis: a problem with persistence.* Nature reviews Microbiology 1:97-105.
41. **Tal, N., and S. Schuldiner.** 2009. *A coordinated network of transporters with overlapping specificities provides a robust survival strategy.* Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 106:9051-9056.

42. **Varela, C., Rittmann, D., Singh, A., Krumbach, K., Bhatt, K., Eggeling, L., Besra, G.S., and Bhatt, A.** 2012. *MmpL genes are associated with mycolic acid metabolism in Mycobacteria and corynebacteria.* Chemistry and Biology. 19(4):498-506.
43. **Villellas, C.** 2013. *A role of efflux pumps in intrinsic drug resistance and virulence of Mycobacterium tuberculosis.* Tesis Doctoral. Universidad de Zaragoza.
44. **Viveiros, M., Martis, M., Rodrigues, L., Machado, D., Aínsa, J., and Amaral, L.** 2012. *Inhibitors of mycobacterial efflux pumps as potential boosters for anti-tubercular drugs.* Expert Reviews 10(99):983-998.
45. **WHO.** 2014. *Global tuberculosis report 2013.* World Health Organization, Geneva, Switzerland.
46. **Zgurskaya, H.I., and Nikaido H.** 2000. *Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes.* Molecular Microbiology 37(2):219-25.
47. **Zhang, Y.** 2004. *Persistent and dormant tubercle bacilli and latent tuberculosis.* Frontiers in Bioscience 9:1136-1156.