



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

**CARACTERIZACIÓN DE LA REGIÓN
PROMOTORA DE LA PE_PGRS33 DE
Mycobacterium tuberculosis.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ANTONIO JAVIER VALLECILLO MAZA

TUTOR: DRA. CLARA INÉS ESPITIA PINZÓN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado de Examen:

Presidente: Dra. Gloria Soberón Chavéz

Vocal: Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Vocal: Dr. Victor Manuel González Zúñiga

Vocal: Dr. Jorge González y Merchand

Secretario: Dra. Clara Inés Espitia Pinzón

México DF, México, 2010.

Este trabajo fue realizado en las instalaciones del laboratorio de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el apoyo de una beca para estudios de Doctorado, Becario CONACYT No: 158490, y financiamiento de los proyectos del: Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (Proyecto PAPIIT IN221107-3) de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico de la UNAM, y del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Proyecto CONACYT 81214).

La Cruz de Lorena fue adoptada como el símbolo Internacional de lucha contra la tuberculosis en la primera Conferencia Internacional en 1902, actualmente es usada por las Asociaciones Antituberculosas de no menos de 55 países como su emblema en la cruzada contra esta enfermedad.

Desde los primeros tiempos, la Cruz Roja con doble barra ha sido usada como un símbolo en la cruzada contra el mal y ha figurado en Relicarios del Este, desde el Siglo VII. Los Cruzados la encontraron representada en monumentos cristianos de antes de la conquista de la Tierra Santa y desde ese tiempo fue usada como un Símbolo de Jerusalén. Cuando en 1099, Godofredo de Bouillón capturó Jerusalén y se advocó el Santo Sepulcro, él incorporó la cruz en su estandarte, como también lo hizo el Rey de Hungría en su retorno de las cruzadas.

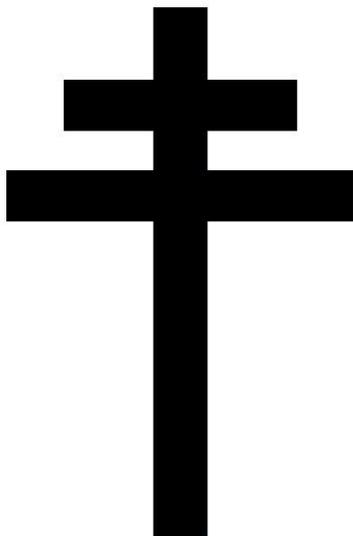
Esta forma de cruz fue siempre reconocida por los hombres de ese tiempo como la forma de "La verdadera Cruz". Ellos creían que la primera barra había sido usada para las palabras, IHS NA IUD (*Jhesus Naxareus Rex Iudeorum*), y con la segunda barra formando la actual cruz.

En el Siglo XV la familia de los De Guisa, la más prominente rama de la Casa de Lorena, todavía usaba la cruz en su escudo de armas y en monedas, en memoria de su antecesor Godofredo de Bouillón. La cruz de doble barra vino a ser famosa por todo la Europa del Oeste, bajo el nombre de Cruz de Lorena.

Juana de Arco, una muchacha francesa del siglo XV, que peleó para llevar a los ingleses fuera de Francia, fue quemada por ellos en la estaca y después canonizada como Santa, usaba también la Cruz de Lorena en su estandarte.

En 1487, la Cruz fue usada como símbolo del movimiento de resistencia en Lorena, contra la ocupación de Carlos El Temerario.

Este precedente fue seguido en los tiempos modernos cuando fue escogida por el General De Gaulle, como el emblema de la Francia libre en su resistencia contra los nazis. Y así a través de los años, la cruz roja de doble barra, ha venido a ser un símbolo de la cruzada contra el mal y la opresión.



Fue el doctor Gilbert Sersiron de París, quien sugirió en Octubre de 1902, que fuera usada como emblema internacional de lucha contra la tuberculosis, explicando su idea con estas palabras:

"La Cruz Roja con doble línea horizontal, es un símbolo de entendimiento, de paz y de hermandad, que puede llevar nuestro mensaje a los rincones más distantes del globo. Usando como emblema en la lucha diaria y en su viaje a través del mundo, puede convertirse en una marcha triunfal, que lentamente rechace un invasor que diezma nuestro ejército, y haga desaparecer las lágrimas del sufrimiento de la humanidad, sin darles causa justa a ellas para que fluyan".

Textos tomados y modificados de [2, 30].

Dedicatorias:

“E scientia hominis salus”.

Este trabajo está dedicado:

A la memoria de cada uno de los seres humanos que muere aproximadamente cada 19 segundos en el planeta Tierra (1,656,000 muertes para el año 2006), a los que han muerto y los que seguirán muriendo por la tuberculosis. Adicional a las micobacterias; estos seres humanos son víctimas de la ignorancia en la que vive el *Homo sapiens sapiens*, que privilegia el materialismo y el valor monetario de las cosas, que deben ser únicamente los medios y no el fin del efímero paso de nuestras existencias. El planeta se ha convertido en una lata de sardinas llena de menesterosos hambrientos, donde los únicos que disfrutan son los virus, bacterias y parásitos causantes de pandemias imparables. La guerra que se debe librar contra la ignorancia, la injusticia y el dolor humano es la única justificada; no aquellas negadas a la razón, sectarias y dogmáticas que llenan a la historia de criminales.

A mi familia, quienes me dieron la mayor fortuna; vivir sin apegos, libre para pensar y actuar en consonancia con la responsabilidad que conllevan la expresión de las ideas y la realización de los actos. Con mi mayor admiración, al ser hijo de personas sin conocimientos, me dieron la mayor de las sabidurías, amar el trabajo honesto y constante, el trabajo cotidiano para alcanzar los sueños y las metas sin pasar por encima de la dignidad de otro ser humano. Los valores no son atributos naturales codificados en los genes y que crecen como los cabellos o las uñas, sino que requieren de cierta educación y cierta ética ciudadana. Ustedes han sido el mejor ejemplo de ello.

A la Universidad Nacional Autónoma de México de la cual he sido parte; sueño que acaricie en mi niñez. Un espacio libre al pensamiento, donde la razón deambula en sus jardines, auditorios, aulas, laboratorios y talleres, recintos en los que se niega la aceptación de argumentos *ad baculum*. Un valuarte donde aún hay personas que no tienen como mayor valía que el producto de la ciencia sea una mercancía, sino gente que sabe y puede. Gente que aprende y valora las maneras más lícitas de demostrar el amor al prójimo; sea transformándose en maestro, investigador o científico, y menosprecia a aquellos creadores de sectas chifladas o a los tenebrosos manejadores de los medios masivos de comunicación que enajenan a la sociedad con fetiches y modelos que suplantán la realidad.

A cada una de las personas que contribuyeron a diario para que se diera fin a lo que ahora tienes en tus manos, y en especial a todo aquel que se digne a leerlo.

Agradecimientos:

“Quiquid recipitur, ad modum recipientis recipitur”.

Mi más sincero agradecimiento a la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón, en principio por la oportunidad de ser parte de su grupo de trabajo; darme el espacio para involucrarme en sus proyectos, de los cuales he adquirido un invaluable cúmulo de experiencias, mismas que podido compartir con mis compañeros de laboratorio y estudiantes a su cargo. Admiro profundamente su manera de realizar el trabajo científico con humildad, honestidad, sencillez, alejada de los protagonismos. Me ha enseñado que sólo hay dos tipos de ciencia, la ciencia bien hecha y la mal hecha. Gracias por todo Doctora!!

A mi Comité tutorial: Dr. Roberto Coria Ortega y Dr. Jorge Membrillo Hernández, gracias por su tiempo, por sus oportunos comentarios y las atenciones recibidas.

A mi Jurado de examen: Dra. Gloria Soberón Chávez (Presidente), Dr. Raúl Mancilla Jiménez (Vocal), Dr. Víctor Manuel González Zúñiga (Vocal), Dr. Jorge González y Merchand (Vocal) y Dra. Clara Inés Espitia Pinzón (Secretario). Gracias por sus comentarios.

A los compañeros de laboratorio: Martha, Jaime, Javier, Pedro, Fernando, Ingrid, Elizabeth, Edén, Anaid, Vanesa, Sharlen, en especial a Margarita, Wendy y Ana Laura. Soy muy afortunado por haber coincidido en el espacio-tiempo con todos ustedes. Gracias por todo!!

A la M en C. Cristina Parada C. por el apoyo técnico recibido en la realización de este trabajo, pero más aún por su invaluable amistad y generosidad. Gracias Cristina!!

Al Dr. José Ángel Gutiérrez Pabello y al M en C. Uziel Castillo del Laboratorio de Investigación en Tuberculosis Bovina de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia - UNAM por su ayuda y amistad. Gracias.

A la amistad y a la oportunidad de poder compartir vivencias, a mis amigos: Cony Moreno, Silvia Andrea Moreno, Augusto Cesar Lizarazo, Giovanna Salamanca, Elihú Aranday y Rigoberto Hernández. Gracias!!

Al resto de mis amigos, no por que no estén nombrados aquí dejan de ser importantes, lo son y lo seguirán siendo, estén en donde estén. Gracias por su amistad, cariño y aprecio!!

A ti, que no estás delante o detrás de mí, sino a mi lado; no mirádonos el uno al otro, sino mirando en la misma dirección. Gracias por tu compañía mi preciosa!! Paula Catherine.

A todas las personas que de una u otra manera han contribuido a la realización y culminación de este trabajo.

Gracias...

Resumen:

Caracterización de la región promotora de la PE_PGRS33 de *Mycobacterium tuberculosis*.

Vallecillo AJ y Espitia C.

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510. México, D.F. México

Se ha demostrado recientemente que la expresión de proteínas de la familia PE/PE_PGRS ocurre bajo condiciones de estrés tanto *in vitro* como *in vivo*, sin embargo poco se conoce de sus secuencia promotoras y como son reguladas. En este trabajo, mostramos que el mensajero transcrito del *pe_pgrs33* es monocistrónico. Adicionalmente, la funcionalidad de la secuencia promotora fue evaluada en *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 utilizando diferentes longitudes de la secuencia promotora del *pe_pgrs33* fusionadas al gen reportero de la proteína fluorescente verde (GFP). La expresión de la GFP disminuyó significativamente en cultivos en fase estacionaria, en depleción de nutrientes y de oxígeno, lo cual sugiere que bajo esas condiciones de estrés, la regulación del gen podría estar bajo el control de una proteína represora. En otro sentido, recientemente se descubrió que el *pe_pgrs33* se sobreexpresa en *Mycobacterium tuberculosis* mutante en *sigD*, éste resultado lo confirmamos en un ensayo de qRT-PCR en la cepa de *M. tuberculosis* CDC1551, sugiriendo ésta observación que la proteína represora es expresada por SigD. Un ensayo de amplificación rápida del extremo 5' del cDNA de las fusiones transcripcionales evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 y en el mensajero de la PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv reveló un sitio de inicio de la transcripción 75 nt corriente arriba del codón ATG y una caja -10 semejante a los reconocidos por SigA. Un ensayo de transcripción *in vitro* confirmó que SigA media la expresión del *pe_pgrs33*. Interesantemente, se encontraron secuencias con homología a la caja -10 en varias secuencias corriente arriba de genes PE_PGRS. Nuestros resultados sugieren que la expresión de algunos *pe_pgrs* puede ser mediado por SigA y la diferencia en la expresión observada en la familia de genes PE_PGRS puede ser explicada por la participación elementos genéticos regulatorios adicionales.

Palabras clave: *Mycobacterium tuberculosis*, PE_PGRS, promotor, inicio de transcripción, factor sigma A, ensayo de transcripción.

Summary:

Promoter region characterization of the PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis*.

Vallecillo AJ y Espitia C.

Departamento de Inmunología. Instituto de Investigaciones Biomédicas. Universidad Nacional Autónoma de México. C.P. 04510. México, D.F. México

Although recent work shows that the expression of the PE/PE_PGRS protein family occur both *in vitro* and *in vivo* under stress conditions, very little is known about their promoter sequences and how they are regulated. This work shows that *pe_pgrs33* mRNA is monocistronic. In addition, the gene promoter functionality was assayed in *Mycobacterium smegmatis* mc² 155 transformed with the green fluorescent protein (GFP) reporter gene fused to different lengths of *pe_pgrs33* promoter sequences. The GFP was down-regulated in the stationary phase, under nutrient starvation and oxygen depletion, when the longest 5' *pe_pgrs33* upstream regions were assayed, suggesting that, in stress conditions, regulation of the gene could be under control of a repressor protein. On the other hand, it was recently found that *pe_pgrs33* is upregulated in the *Mycobacterium tuberculosis sigD* mutant, we confirming these finding by qRT-PCR in *M. tuberculosis* CDC1551 strain, this result suggests repressor protein it can be expressed by SigD. A 5' rapid amplification of cDNA end assay of transcriptional fusions evaluated in *M. smegmatis* mc² 155 and in PE_PGRS33 mRNA of *M. tuberculosis* H37Rv revealed a transcription start point 75 nt upstream of the ATG codon and a -10 like-SigA box. Furthermore, a transcription run assay confirmed that SigA mediates *in vitro* transcription of *pe_pgrs33*. Interestingly, conserved -10 SigA boxes were found in the intergenic region of several PE_PGRS genes. These results suggest that expression of some PE_PGRS genes may be mediated by SigA, and the differences in expression observed in the gene family could be explained by the participation of additional regulatory genetic elements.

Keywords: *Mycobacterium tuberculosis*, PE_PGRS, promoter, transcription start mapping, sigma factor A, transcription run assay.

Índice:

Unidad	Título	Página
	Dedicatorias. -----	iii
	Agradecimientos. -----	iv
	Resumen. -----	v
	Summary. -----	vi
	Índice. -----	vii
	Índice de figuras y tablas. -----	xii
	Lista de abreviaturas empleadas. -----	xvi
<hr/>		
1	Introducción. -----	1
1.1	Tuberculosis humana. -----	1
1.2	Aspectos históricos de la tuberculosis humana. -----	3
1.3	Situación mundial de la tuberculosis humana. -----	13
1.4	Situación de la tuberculosis humana en México. -----	18
1.5	Evolución del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . -----	24
1.6	Secuencia del genoma de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . -----	30
1.7	Subfamilias multigénicas PE y PE_PGRS. -----	32
1.8	Expresión y función de las PE_PGRS. -----	35
2	Antecedentes. -----	42
3	Justificación. -----	44
4	Hipótesis. -----	45
5	Objetivos. -----	45
5.1	General. -----	45
5.2	Específicos. -----	45

6	Análisis de la transcripción de la PE_PGRS33. -----	46
6.1	Introducción. -----	46
6.2	Material y Métodos. -----	46
6.2.1	Diseño de oligonucleótidos y extracción de RNA total de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	46
6.2.2	Síntesis del cDNA, amplificación por PCR y visualización de los productos de la PCR en gel de agarosa-TAE. -----	48
6.3	Resultados. -----	53
7	Evaluación de la funcionalidad de la secuencia promotora de la PE_PGRS33. -----	54
7.1	Introducción. -----	54
7.2	Material y métodos. -----	54
7.2.1	Construcción de las fusiones transcripcionales. -----	54
7.2.2	Evaluación de las fusiones transcripcionales en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155. -----	57
7.3	Resultados. -----	69
8	Regulación de la PE_PGRS33. -----	70
8.1	Introducción. -----	70
8.2	Material y Métodos. -----	71
8.2.1	Diseño de oligonucleótidos para el ensayo de RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) y extracción de RNA total de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 y <i>M. tuberculosis</i> CDC1551. -----	71
8.2.2	Ensayo qRT-PCR. -----	72
8.3	Resultados. -----	78
9	Identificación de los elementos de la secuencia promotora de la PE_PGRS33. -----	79
9.1	Introducción. -----	79

9.2	Material y métodos. -----	79
9.2.1	Ensayo de 5'-RACE. -----	79
9.2.2	Secuenciación de los productos de PCR obtenidos en el ensayo de 5'-RACE. -----	82
9.3	Resultados. -----	87
10	Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> . -----	89
10.1	Introducción. -----	89
10.2	Material y métodos. -----	89
10.2.1	Producción de las proteínas del core de la RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	89
10.2.2	Purificación de la subunidad α del core de la RNA polimerasa. -----	91
10.2.3	Procesamiento de los cuerpos de inclusión de las subunidades β y β' del core de la RNA polimerasa. -----	92
10.2.4	Plegamiento y purificación del core de la RNA polimerasa. -----	93
10.2.5	Producción de los factores sigma A y D de la holoenzima RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	94
10.2.6	Purificación de los factores sigma A y D recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	94
10.2.7	Plegado y almacenado de los factores sigma A y D recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	95
10.2.8	Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> con la RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	96
10.3	Resultados. -----	113
11	Localización de otras posibles secuencias promotoras en las secuencias corriente arriba de otros genes <i>pe_pgrs</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	114
11.1	Introducción. -----	114
11.2	Material y métodos. -----	115

11.3	Resultados. -----	120
12	Discusión. -----	121
13	Conclusiones y perspectivas. -----	126
14	Bibliografía. -----	128
15	Anexos. -----	143
15.1	Protocolos. -----	143
6.2.1a	Preparación de medio de cultivo Middlebrook 7H9-ADC-Tween. -----	143
6.2.1b	Preparación de solución GTC. -----	144
6.2.1c	Tratamiento de agua con DEPC. -----	145
6.2.1d	Electroforesis en gel de agarosa-Formaldehído. -----	146
7.2.1a	Captura de productos de PCR en el vector pCR4 [®] Blunt-TOPO [®] . -----	147
7.2.1b	Preparación de cepas de <i>E. coli</i> competentes por Calcio y transformación por choque térmico. -----	149
7.2.2a	Preparación de cepas de micobacterias para electrocompetencia y transformación por electroporación. -----	152
7.2.2b	Preparación de placas de medio Middlebrook 7H11-OADC. -----	153
7.2.2c	Cuantificación de proteínas por el método de Lowry en microplaca. -----	154
7.2.2d	SDS-PAGE. -----	155
10.2.2a	Procedimiento para obtención de cuerpo de inclusión de proteínas sobre-expresadas en <i>E. coli</i> . -----	159
10.2.2.b	Procedimiento de purificación por afinidad a metales de la subunidad α del core de la RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	160
10.2.4a	Buffers para el plegado del core de la RNA polimerasa y los factores sigma A y D, recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv -----	162

10.2.4b	Procedimiento de purificación por afinidad a metales del core de la RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	164
10.2.6	Procedimiento de purificación por afinidad a metales de los factores sigma A y D recombinantes de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv.	166
10.2.8a	Procedimiento de purificación de oligonucleótidos en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida.	178
10.2.8b	Electroforesis en gel desnaturalizante de poli-acrilamida y electrotransferencia a membrana de Nylon del cDNA marcado con Biotina.	170
10.2.8c	Detección en la membrana de Nylon del cDNA marcado con Biotina.	171
15.2	Genotipo y características de la cepas empleadas.	172
15.3	Publicación.	173

Índice de figuras y tablas:

Figura:	Título:	Página:
1	Número de nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial. -----	15
2	Tasa estimada de incidencia de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial. -----	16
3	Porcentaje de asociación la infección de HIV a los nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial.	17
4	Número de casos de tuberculosis humana en su forma pulmonar y tasa de incidencia en México. -----	21
5	Número de defunciones por tuberculosis humana en su forma pulmonar y tasa de mortalidad en México. -----	22
6	Distribución de la morbilidad de tuberculosis humana en su forma pulmonar en México. -----	23
7	Relación evolutiva del complejo <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .	27
8	Escenario evolutivo de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> . -----	28
9	Estructura filogenética de la población global de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> y distribución geográfica. -----	29
10	Familias PPE y PE en los genomas secuenciados de <i>M. tuberculosis</i> . -----	31
11	Esquema de las proteínas de la familia PE. -----	34
12	Región genómica de la PE_PGRS33 y de la Rv1819c y gel de agarosa-TAE con los productos de la PCR del análisis de transcripción. -----	52
13	Región genómica de la PE_PGRS33 y de la Rv1819c y gel de agarosa-TAE con los productos de la PCR clonados en el vector	

	pFPV27. -----	61-62
14	Cinética de crecimiento de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. -----	63-64
15	Expresión de la GFP en cultivos en fase logarítmica de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. -----	65-66
16	Expresión de la GFP en cultivos en fase estacionaria, depletados de nutrientes y oxígeno de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. -----	67-68
17	Expresión de la GFP en la fusión transcripcional pCA18-245 evaluada en <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 y expresión de la PE_PGRS33 en <i>M. tuberculosis</i> CDC1551 y su mutante en sigD. -----	76-77
18	Ensayo de amplificación rápida del extremo 5' del cDNA con RNA total de <i>M. smegmatis</i> mc ² 155 y <i>M. tuberculosis</i> . -----	85
19	Identificación de los elementos del promotor del <i>pe_pgrs33</i> . -----	86
20	Vectores de expresión procariontes que contienen las secuencias codificantes de los genes <i>ropA</i> , <i>rpoB</i> y <i>rpoC</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	99
21	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS:pSR52, Rosetta (DE3):pJF09 y Rosetta (DE3):pJF10. -----	101-102
22	Fraccionamiento de las células bacterianas inducidas y purificación por afinidad a metales de la subunidad α de la RNA polimerasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	103
23	Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de las subunidades β y β' y purificación del core de la RNA polimerasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	104-105
24	Vectores de expresión procariontes que contienen las secuencias codificantes de los genes <i>sigA</i> y <i>sigD</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	106
25	Cinética de crecimiento de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) pLysS:pSR01 y -----	

	BL21 (DE3) pLysS:pSR28. -----	108-109
26	Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de los factores sigma A y D de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	110
27	Purificación de los factores sigma A y D de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por afinidad a metales. -----	111
28	Ensayo de transcripción <i>in vitro</i> con la RNA polimerasa recombinante de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	112
29	Alineamiento de las secuencias intergénicas 5' corriente arriba los genes <i>pe_pgrs</i> de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	117-119

Tabla:

I	Principales eventos históricos en el conocimiento de la tuberculosis humana. -----	4-12
II	Datos publicados que refieren la expresión de los genes <i>pe_pgrs</i> . -----	38-41
III	Oligonucleótidos empleados en el análisis de transcripción del mRNA de la PE_PGRS33. -----	51
IV	Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de secuencias de diferente longitud de la región corriente arriba de la secuencia codificante de la PE_PGRS33 a partir de gDNA de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	60
V	Oligonucleótidos empleados en el RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) del mRNA de la GFP de las fusiones transcripcionales y del mRNA de la PE_PGRS33. -----	75
VI	Oligonucleótidos empleados en el ensayo de amplificación rápida del extremo 5' del cDNA (5'-RACE) del mRNA de la PE_PGRS33. -----	84
VII	Características de los vectores para la expresión de las	

	proteínas recombinantes que integran el core de la RNA polimerasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	100
VIII	Características de los vectores para la expresión de los factores sigma A y D recombinantes que integran la holoenzima de la RNA polimerasa de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv. -----	107

Lista de abreviaturas empleadas:

DNA	Ácido desoxiribonucleico (Del ingles Desoxiribonucleic acid)
gDNA	DNA genómico (Del ingles genomic DNA)
cDNA	DNA complementario (Del ingles complementary DNA)
RNA	Ácido ribonucleico (Del ingles Ribonucleic acid)
mRNA	RNA mensajero (Del ingles messenger RNA)
rpm	Revoluciones por minuto
x g	Gravedades
min	Minuto
s	Segundo
ml	Mililitro
µl	Micro litro
g	Gramo
g/l	Gramos por litro
m	Metro
ng	Nanogramo
mM	Milimolar
pM	Picomolar
cbp	Cuanto baste para
DEPC	Diethylenepycarbonate
Agua MQ	Agua obtenida por el sistema de purificación Milli-Q (Millipore)
bp	Pares de bases (Del ingles base pairs)
ORF	Marco abierto de lectura (Del ingles Open reading frame)
Kn	Kanamicina

Car	Carbenicilina
DTT	Dithiothreitol
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside
LB	Luria-Bertani
GAS	Medio de cultivo Sales-alanina-glicerol (Del ingles Glycerol alanine salts médium)
HRP	Peroxidasa de rabano picante (Del ingles Horseradish preoxidase)
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (Del ingles Ethylenediaminetetraacetic acid)

1 Introducción.

1.1 Tuberculosis humana.

“Hay dos maneras de difundir la luz: ser la vela o el espejo que la refleja.”

Edith Wharton, **Vesalius in Zante**, citado en C. Pickover, **Surfing through hyperspace**, Oxford University Press, Nueva York, 1999. tomado de [9].

Mycobacterium tuberculosis es el agente etiológico en el humano de la enfermedad infecto-transmisible denominada tuberculosis. Ésta bacteria con características de Gram positivo tiene un tamaño de 1-4 μm de largo por 0.4-0.8 μm de ancho y por la riqueza de lípidos en su pared celular es capaz de retener colorantes aún después del tratamiento con soluciones ácido-alcohólicas, por lo que se conoce como bacilo ácido-alcohol resistente [13]. La principal ruta de transmisión de la tuberculosis humana es la vía aerógena y como consecuencia de ello las lesiones características generadas por la presencia de la bacteria, llamadas granulomas se asientan con mayor frecuencia en los tejidos del parénquima pulmonar y nódulos linfáticos asociados a las vías respiratorias [2, 48].

Una vez en el tejido pulmonar la micobacteria tuberculosa induce una respuesta inflamatoria local con reclutamiento de fagocitos polimorfonucleares neutrófilos, seguidos de macrófagos los cuales al ser incapaces de controlar el crecimiento de los bacilos fagocitados se convierten en el nicho donde se reproduce ésta bacteria [2, 48]

La lesión granulomatosa donde se inicia la infección se denomina folículo de Ghon y es a partir de este foco desde donde los bacilos tuberculosos se pueden dispersar a tejidos de cualquier órgano por vía hematogena o linfática, causando éstas mismas lesiones de manera diseminada (Tuberculosis miliar, por la similitud de las pequeñas lesiones granulomatosas con las semillas de mijo) o localizadas. Las lesiones están

caracterizadas a nivel histológico por la presencia de células gigantes multinucleadas, rodeadas por células epitelioides, así como de una capa de células linfocíticas y una malla de fibrina [133].

Ésta lesión puede evolucionar hasta desarrollar una necrosis focal, caseificarse y rodearse de una cubierta fibrosa y/o calcificada, lo que permite mantener localizado la masa de bacilos que sobreviven y se pueden reproducir de manera extracelular en el material caseoso [61]. Recientemente se ha sugerido que la estructura del granuloma es dinámica, en lo que refiere a un recambio celular que permite el traslado de micobacterias que infectan a las células que son movilizados hacia otros tejidos, contribuyendo así a la diseminación orgánica [15, 38].

Finalmente, éstas lesiones caseosas del tejido pulmonar pueden perder la barrera que las limita y abrirse a los espacios alveolares, descargar su contenido y este ser expulsado por las vías respiratorias altas al ambiente, en los aerosoles generados al toser, hablar o estornudar y en las secreciones denominadas esputos, cerrando así el ciclo de la enfermedad.

1.2 Aspectos históricos de la tuberculosis humana.

En la ontogenia de las civilizaciones humanas se ha hecho presente la tuberculosis como una de las mayores plagas que han afectado al ser humano. Esto ha sido evidente por el descubrimiento de lesiones en restos humanos en los sitios arqueológicos de civilizaciones antiguas de la mayoría de las regiones del planeta [25, 31, 34-36, 44, 95, 96]. Es claro que las lesiones y la presencia de material genético de la micobacteria en los tejidos preservados de antiguas culturas no nos permite conocer con exactitud la dinámica y magnitud con se presentaba ésta enfermedad dentro de las poblaciones. Sin embargo, el desarrollo de medios como la pintura, escultura y escritura, le permitieron al ser humano dejar registros materiales de sus vivencias, lo cual ahora nos proporciona la posibilidad de generar un conocimiento más cercano a la realidad histórica de ésta enfermedad, así como delinear de manera cronológica todos aquellos eventos importantes que dieron origen al actual conocimiento de ésta infección [8, 72]. En la siguiente tabla se resumen algunos de los eventos registrados y los personajes partícipes de ellos a lo largo de la lucha que ha entablado el ser humano contra *M. tuberculosis* (Tabla I).

Tabla I: Principales eventos históricos en el conocimiento de la tuberculosis humana [2, 34-36, 37, 51, 62, 70, 72, 85-88, 118, 127, 135].

La antigüedad:

Pueblos antiguos de Mesopotamia	De estos pueblos datan las primeras descripciones de las primeras enfermedades, con una mezcla de racionalismo empírico y misticismo curativo. Lo que en la actualidad se denomina tuberculosis, los médicos asirios y babilónicos la atribuían al demonio <i>Asakku</i> , con descripciones exactas de los síntomas.
Chinos e Hindúes	Se sabe que estas culturas trataban a los enfermos de tuberculosis con reposo y medidas higiénico-dietéticas.
Egipcios	De acuerdo a los relatos de Homero, los médicos egipcios eran considerados excelentes en sus artes. Cada uno era dedicado a una enfermedad en particular, incluyendo las de carácter “invisible” como la tuberculosis (Herodoto).
Hebreos	<i>Shachepheh</i> era como los hebreos designaban a la tuberculosis, según se relata en el Viejo Testamento: “En esto estará la plaga... la carne se consumirá y los ojos se consumirán en sus cuencas” (Zacarías).

La era Hipocrática:

Hipócrates de Cos (460-370 a.C.)	Con gran sagacidad clínica describe los signos y síntomas de la tuberculosis hasta llegar a la caquexia. Sus observaciones plasmadas en los <i>Aforismos</i> establecen las primeras observaciones epidemiológicas de la enfermedad. Aplicó el nombre de <i>tisis</i> a ésta enfermedad, con un significado de <i>consumción</i> o <i>decaimiento</i> . En las <i>facies hipocráticas</i> describe a los tísicos: “Los ojos hundidos, la nariz afilada, las sienas huecas, la piel tensa, las orejas frías, la cara enjuta y descolorida, los párpados lívidos, la boca abierta y los labios pálidos.” En la autopsia en animales tuberculosos, principalmente cerdos, encontró nódulos que denominó <i>phymata</i> .
Aulo Cornelio Celso (25 a.C.-50 d.C.)	Continuo divulgando los conceptos Hipocráticos de la tuberculosis en su enciclopedia; aunque no fue médico, contribuyo a mantener por casi cuatro siglos

las ideas de la escuela de Cos, ya que mientras la medicina estuvo en manos de los griegos en las escuelas de Alejandría y Roma, no se adicionó conceptos nuevos sobre ésta enfermedad.

Areteo de Capadocia (30 a 90 d.C.)

En su *De causis et signis morborum*, expresa sobre los signos clínicos: "... las uñas curvas, los dedos encogidos y enclenques, la nariz afilada, los ojos hundidos y brillantes, el semblante y el color cadavéricos; los músculos consumidos y la espantosa prominencia de los huesos; las escápulas salientes como las alas de un pájaro; los miembros delgados como marcos o piñones de ala, la garganta prominente el tórax adelgazado." Él es quien refiere por primera vez los pronósticos de los enfermos y la muerte de los mismos.

Galeno de Pérgamo (130-200 d.C.)

Consideró a la tisis como una enfermedad contagiosa y recomendó el aislamiento de los enfermos. Afirmaba que las personas que dormían en la misma cama con los enfermos, usaban sus ropas y sus sábanas, o que convivían durante largo tiempo con ellos desarrollaban la enfermedad. Fue quien designó *escapula alada* al omoplato saliente del tórax tísico.

La Edad Media:

Los conceptos de Hipócrates y Galeno permanecieron prácticamente invariables hasta la desintegración del Imperio Romano de Occidente y aún durante la Edad Media. La escrófula (Enfermedad regia), forma de tuberculosis muy frecuente en ésta época, se creía que era curada después de ser tocadas por un rey, de allí su nombre.

La cultura árabe de igual manera siguió los mismos preceptos. Siglos después, hasta la época de las Cruzadas cuando se dio la fundación de espacios para la atención de los heridos de guerra y para el aislamiento de los enfermos de algunos de los ocho padecimientos ya considerados contagiosos: Peste bubónica, Tuberculosis, Lepra, Ántrax, Tracoma, Sarna, Erisipela y erróneamente considerada, la Epilepsia.

El renacimiento:

Philippus Aureolus Theophrastus Bombast von Hohenheim (Paracelso) (1493-1541)

Sugirió un camino más científico de la medicina al oponerse a las entonces ideas imperantes, tratando de despojar a la ciencia de la época de prejuicios, supersticiones y dogmas que habían permanecido inmutables por varios siglos y aumentados por el escolasticismo.

Girolamo Fracastoro (1483-1553) Sugirió la existencia de agentes causales desconocidos e imperceptibles a simple vista a los que llamó *seminaria contagionis*, especial para cada enfermedad, su teoría del contagio se extendió por casi toda Europa. Se le considera el primer epidemiólogo al señalar con considerable precisión la transmisión de la tuberculosis a nivel intrafamiliar.

Los siglos XVII y XVIII:

Franz de Le Boe (Silvio) (1614-1672) Aportó importantes descripciones de las lesiones tuberculosas en cadáveres mientras enseñaba anatomía en Ámsterdam y Leyden. Consideró que la causa de la tuberculosis se podría encontrar en estas lesiones, a las que denominó tubérculos.

Richard Morton (1637-1698) Demostró la lentitud en la evolución de la enfermedad, consideró 16 variedades de ésta. Consideró que la enfermedad iniciaba con la inflamación, posterior formación de los tubérculos, progresión de las úlceras que conducían a la tisis como resultado final.

Teófilo Bonet (1628-1689) Describió las lesiones miliars en tuberculosis pulmonar, fue el primero en hacer un símil con los granos de mijo (*magnitudine seminis milii*).

Jean-Baptiste Morgagni (1682-1771) Creador de la anatomía patológica, realizó descripciones de la lesión tuberculosa en vías de licuefacción, a pesar de negarse a realizar disecciones en los cadáveres de los tísicos.

Carl Linnaeus (Carl von Linné) (1707-1778) En apoyo a las ideas de Fracastoro, expresó que la propagación de las enfermedades infecciosas depende de la implantación de diminutos organismos sobre el individuo afectado.

Fernando VI de Borbón (España) Basado en la idea del contagio promulgó en 1757 la obligación de los médicos a declarar todos los casos de tuberculosis, con la finalidad de que los parientes del enfermo incineraran sus enseres una vez muerto éste. Medidas similares ya habían sido aplicadas en la República de Lucca (Italia) en 1699.

Pierre-Joseph Desault (1738-1795) Se le atribuye el señalar que los esputos eran el medio de diseminación de la tuberculosis. Hipótesis confirmada posteriormente por Pedro Mauriac.

Joseph Leopold Auenbrugger (1722-1798) En su pequeña obra *Inventum Novum Ex Percussione Thoracis Humani Ut Signo Abtrusos Interni Pectoris Morbos Detegendi* publicada en 1761, la cual describía su nuevo procedimiento de oscultación, la percusión. Sin embargo, esta pequeña obra permaneció por varios años en el olvido hasta que Maximiliano Stoll en 1788 la resucitó y encomió.

La época anatomoclínica. Siglo XIX:

Matthew Baillie (1761-1823) Precisó que los tubérculos no eran un tipo especial de nódulos, si no una lesión peculiar del tejido pulmonar.

Gaspard Laurent Bayle (1774-1861) Describió 6 variedades clínicas de tisis (*Recherches sur la ptisis poumonaire*, 1810), con diversa localización en el cuerpo, cuyo carácter esencial era la presencia de materia caseosa. Redescubrió la forma miliar de la tuberculosis, 100 años antes descrita por Bonet.

René Théophile Hyacinthe Laënnec (1781-1826) Se dedicó al estudio clínico de los enfermos como médico del Hospital Necker, inventó el estetoscopio (Mayo de 1815, *De l'auscultation médiate ou Traité du diagnostic des maladies des poumons et du coeur*, Paris, 1819), instrumento que permitió un estudio más concienzudo de los enfermos mediante la auscultación. Construyó una doctrina unicista de la tuberculosis y estableció las bases para su diagnóstico que anteriormente sólo era basado en signos triviales. Logró la separación de la tuberculosis como entidad nosológica específica de otras enfermedades pulmonares entonces reunidas en una confusión caótica.

Pierre Charles Alexandre Louis (1787-1872) Defensor ferviente de las ideas de Laënnec. La teoría unicista quedó olvidada por 30 años después de los embates de Virchow en 1850, quedando en su lugar la teoría dualista de la enfermedad.

Jean-Antoine Villemin (1827-1892) Posterior a que en 1846 Philipp Friedrich Hermann Klencke (1813-1881) demostró la transmisión de la tuberculosis bovina al humano, en 1865 Villemin demostró la inoculabilidad de la tuberculosis. Inoculó conejos por vía subcutánea en las orejas, con esputos de enfermos y material caseoso de pulmones y nódulos linfáticos de cadáveres de personas muertas por tuberculosis. Los animales muertos en

pocas semanas después mostraron lesiones caseosas asentadas principalmente en el pulmón, similares a la del humano.

Con estos experimentos, se reconsideró de nuevo la teoría unicista de la enfermedad y tiró por tierra la idea de la herencia proclamada desde Hipócrates (Un tísico nace de otro tísico).

Finalmente, en este período la obra de Laënnec fue confirmada por los trabajos a nivel histológico de Langhans, Koester y Friedlaender.

La época bacteriológica:

Benjamin Marten (1704-1722) En su libro *A new theory of consumptions, more specially of a phthisis or consumption of the lungs* (1720) indica sus sospechas de que pequeñas criaturas vivas puedan entrar al cuerpo y producir las lesiones y los síntomas de la tisis.

Hermann Heinrich Robert Koch (1843-1919) El 24 de Marzo de 1882 ante la Sociedad de Fisiología de Berlín, en su presentación “Die Aetiologie der Tuberculose” dio a conocer su sensacional descubrimiento. Después de numerosos intentos de coloración, pudo descubrir el germen de la tuberculosis, aislarlo, cultivarlo y reproducir la enfermedad. Siguiendo las ideas enunciadas por su antiguo maestro, Friedrich Gustav Jacob Henle; los ahora llamados postulados de Kock. La búsqueda de técnicas rápidas de tinción, permitió a Paul Ehrlich y a George Eduard Rindfleisch descubrir la propiedad de resistir la decoloración del bacilo con soluciones de ácidos diluidos, por el primero y el segundo al emplear soluciones alcohólicas. Esto permitió a Franz Ziehl y a Friedrich Karl Adolph Neelsen desarrollar la técnica tinción que actualmente lleva sus nombres y que permite en pocos minutos demostrar la presencia de la micobacteria en varios tipos de muestras orgánicas de los enfermos.

El descubrimiento del germen causal de la tuberculosis confirmó sin dejar dudas los experimentos realizados por Villemin y así el carácter infeccioso de la enfermedad. Koch pensó que al igual que con otras enfermedades infecciosas debería inmunizar al organismo y en 1890 prematuramente anunció haber encontrado un remedio para la prevención de la enfermedad. Sin embargo, las dosis excesivas provocaron efectos mortales, cayendo en descrédito total la idea de Koch.

La época radiológica:

Hasta entonces la tuberculosis tenía tres hechos esenciales conocidos: la clínica, la anatomía patológica y la bacteriología, que posteriormente junto con la aplicación del descubrimiento de Röengten, el radiodiagnóstico; conformaron los cuatro pilares de la fisiología.

Wilhelm Conrad Röntgen (1845-1922) El 28 de Diciembre de 1895, frente a la Sociedad Físico Médica de Würzburg dio a conocer los datos de lo que él denominó rayos incógnita o rayos X, estos aunque invisibles al ojo humano eran capaces de atravesar la mayor parte de los cuerpos. Por otro lado, tenían un efecto similar a la luz sobre las placas fotográficas. Así de manera accidental al ser asistido por su esposa, a esta le fue tomada la primera placa radiográfica de la mano.

Poco tiempo después, en 1898 Bouchard y Beclere aplicaron los rayos X al diagnóstico de enfermedades pulmonares. Así se podía conocer el daño que silenciosamente hacía estragos en los pulmones de los enfermos sin que estos mostraran alguna expresión clínica de la enfermedad.

Durante este mismo periodo, en 1897 Fluegge demostró la transmisión de la micobacteria por medio de las gotitas de saliva arrojadas por los enfermos al hablar, toser o estornudar.

La época patogénica:

El inicio y la evolución de la tuberculosis fueron algo que siempre inquietó a las mentes de los que trabajaron con ésta enfermedad, aún antes de conocerse el agente causal de la misma.

Julio Maria Parrot (1829-1883) “... he observado que cuando hay tuberculosis en los nódulos linfáticos hiliares del pulmón hay siempre un foco en el segmento pulmonar que es drenado por estos nódulos, y que este *complejo* es siempre el sitio de la tuberculosis más antigua en el organismo.” Fueron las palabras de Parrot en 1876 ante la Academia de Medicina de París, palabras que no obstante pasaron inadvertidas por algún tiempo como otros tantos conceptos en medicina.

Anton Ghon (1886-1936) Sus observaciones de las lesiones parenquimatosas unida a la adenopatía hilar pulmonar en 1912, hicieron retomar las aseveraciones hechas años atrás por Parrot.

Hasta que se encontró gran cantidad de personas con lesiones de tuberculosis conteniendo el bacilo, nadie sospechaba de la presencia de gran número de personas sin signos clínicos con la capacidad de transmitir la enfermedad a las personas sanas con las que convivían.

Otto Naegeli (1843-1922) En 1900 mostró las cifras que asombraron sobre la gran cantidad de personas afectadas por la enfermedad con un estado clínico aparentemente sano.

Clemens Peter Freiherr von Pirquet (1874-1929) Con la aplicación de la tuberculina de Koch pudo confirmar las aseveraciones de Naegeli. Todos los enfermos de tuberculosis reaccionaban, aunque tardíamente, a la aplicación cutánea de la tuberculina, y lo mismo ocurría con personas aparentemente sanas.

Carl Mantoux (1877-????) En 1908 modificó la forma de aplicar la tuberculina, de manera intradérmica, con diluciones pudo obtener resultados similares o superiores a los observados por von Pirquet. En 1941, Florence Seibert (1898-1991) propuso en USA el empleo del PPD (Derivado proteico purificado obtenido mientras trabajaba en la Universidad de Uppsala, Suecia) como un método estándar de diagnóstico de la tuberculosis.

Karl Ernst Ranke (1870-1926) Emitió de manera clara y precisa sus ideas sobre la entrada del bacilo al pulmón, la linfadenitis consecutiva (Complejo primario), la bacilemia ulterior y la consecutiva destrucción del tejido pulmonar en los tejidos afectados por la diseminación extrapulmonar.

Albert León Charles Calmette (1863-1933) La idea de la profilaxis contra la peste blanca, iniciada por Kock continuo, hasta que en 1921 junto con el veterinario Jean Marie Camille Guérin (1872-1961) lograron la atenuación de una cepa de origen bovino tras cientos de pases sucesivos en medio de cultivo de papa glicerizada con bilis de buey. *Mycobacterium bovis* BCG, inmunógeno aplicado por primera vez a un niño recién nacido que no desarrolló la enfermedad siendo hijo de una mujer que murió de tuberculosis y criado por su abuela afectada con el mismo padecimiento. Pese a sus detractores hasta el momento ésta vacuna no ha sido reemplazada en su uso en humanos.

Junto con la adquisición de conocimientos relacionados con la patogénesis de la enfermedad en el humano, el diagnóstico, la epidemiología y la profilaxis; el tratamiento de los pacientes ha evolucionado con el tiempo, en principio las terapias eran basadas en el empirismo y el fanatismo, doctrinas que ahora se antojan absurdas.

En la ontogenia del tratamiento de la tuberculosis humana podemos distinguir seis períodos principales:

1. Tratamientos por medios físicos u otros derivados de los recursos del ambiente: clima, aire, ejercicio y alimentación. El ejercicio vigoroso, como caminatas de 8 a 10 km diarios, montar a caballo, viajar en carruajes por caminos ásperos e incluso se inventó una silla mecánica que imitaba este movimiento; fueron elementos empleados como métodos terapéuticos contra la tuberculosis. Por otro lado, el clima gozó de gran fama; en 1859 Herman Brehmer (1826-1889) abrió su “Brehmerschen Heilanstalt für Lungenkranke” en la montaña Silesia de la villa Gomersdorf (Sokolowsko, Polonia), posteriormente muchas ciudades nacieron y se desarrollaron alrededor de sanatorios ubicados en regiones con clima propicio para la recuperación de los enfermos, como Davos y Azosa en Suiza, Saranac Lake y Denver en USA y Perote en México. Un aspecto del clima que se empleó con mucha frecuencia fue la radiación solar. La helioterapia o exposición solar de los enfermos se remonta a la época de Hipócrates, quien la recomendaba como tratamiento para algunas enfermedades. Finalmente, la alimentación se consideró fundamental para el tratamiento de la tuberculosis, al grado del fanatismo, como es descrito en *La montaña mágica* de Thomas Mann, regímenes alimenticios de hasta 8 comidas al día.
2. Reposo en cama. Contrario a lo anterior, se sugirió que la recuperación era alcanzada con el reposo debido a una disminución de la acción tóxica de la enfermedad; con la actividad física reducida mejoraba el apetito, el tono fisiológico y las fuerzas del enfermo. Este método de tratamiento fue implantado en USA por Joseph Gleitsman en el primer sanatorio de Norteamérica en Asheville, Carolina del Norte, seguido por Edward Livingston Trudeau (1848-1915) en las montañas Adirondaks de Nueva York, en 1884. El reposo alcanzó aplicaciones extremas, hubo enfermos que pasaron años en sus camas, alimentados y bañados en sus lechos, se les indicaba hablar en voz baja para evitar el esfuerzo físico.
3. Tratamiento activo local y mecánico: colapso gaseoso y quirúrgico. Para hacer más selectivo el reposo, se desarrolló el colapso pulmonar, los métodos empleados para inducir el neumotórax fueron numerosos. Inicialmente el colapso pulmonar como terapia antituberculosis fue introducida por Carlo Forlanini (1847-1918) en 1887, sin embargo su mayor auge fue de 1915 a 1945.
4. Resecciones. La cirugía reseccional empleada en cáncer, comenzó a dar resultados positivos en el tratamiento de la tuberculosis en 1945, año en el que inició el uso de la Estreptomina descubierta (1943) por Albert Schatz (1922-2005) y Elizabeth Bugie, bajo la supervisión de Selman Abraham Waksman (1888-1973) quien gozó del crédito total. El auge de las resecciones fue por un período corto de tiempo en la década de los 50's, antes de ser remplazado por la antibioterapia.
5. Tratamiento antimicrobiano. Durante el período final del siglo XIX y principios del XX, se realizaron un sin número de trabajos con el uso de sueros de animales de diferentes especies, inmunizados o no inmunizados; con la idea de que el agente activo del suero, los anticuerpos, funcionaran como una terapia específica

contra la micobacterias. La terapia antimicrobiana de la tuberculosis llega tiempo después al tratamiento específico de otras enfermedades infecciosas causadas por bacterias, la idea de que el bacilo de la tuberculosis era inatacable por los antibióticos fue desechada en 1945 con el uso de la Estreptomina, no sin antes haber pasado por una serie de incursiones desafortunadas con el empleo de la Creosota, el Yodo, el Calcio, derivados del Salvarsán que había demostrado su eficacia contra la Sífilis, la Sanacristina y otros derivados del Oro.

6. Tratamiento ambulatorio. Finalmente, la aplicación efectiva de la terapia contra el bacilo de la tuberculosis ha hecho que su empleo pueda realizarse de manera eficaz en el domicilio del paciente sin tener que encontrarse confinado en el sanatorio. Sin embargo, esto también ha favorecido que de manera equivocada, no se considere que medidas como, la elevación de las condiciones generales de nutrición, de habitación, de enseñanza y de seguridad social, en general, de la elevación de la equidad y calidad de vida individual y colectiva tengan un impacto significativo en el control y erradicación de la tuberculosis humana.
-

1.3 Situación mundial de la tuberculosis humana.

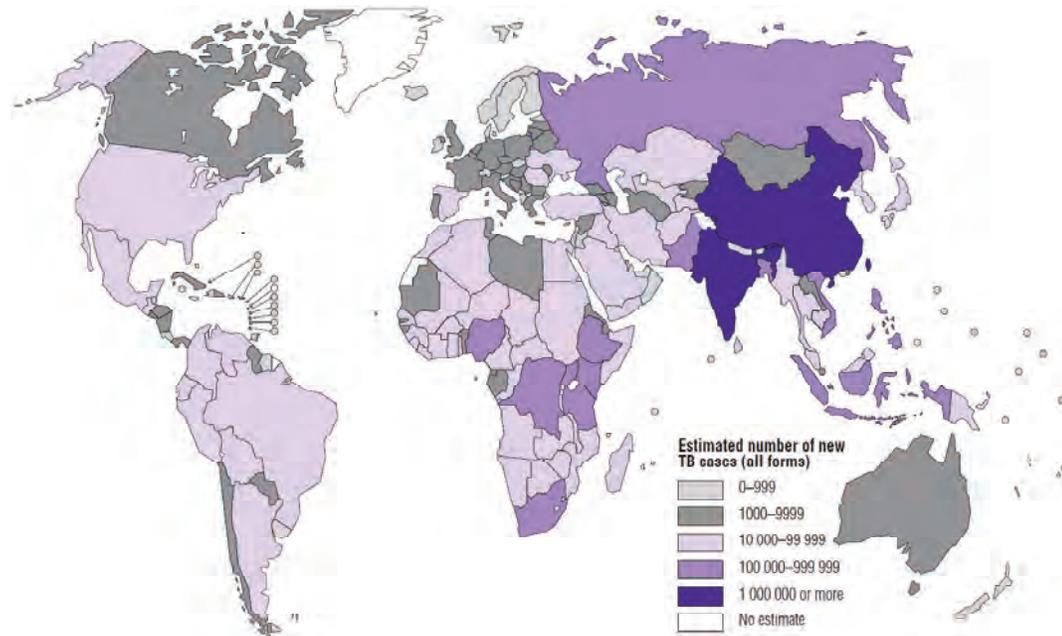
En la actualidad se calcula que la población mundial asciende a alrededor de 6,590,088,000 seres humanos, del total de esta población en el año 2006 fue estimada una incidencia de 9,157,000 enfermos de todas las formas tuberculosis en los 202 países (Donde habita el 99.6% de la población mundial) que anualmente reportan a la Organización Mundial de la Salud (WHO, por sus siglas en ingles de World Health Organization) de los 217 países en los que en la actualidad se dividen políticamente los territorios mundiales (Figura 1). Con estos datos la tasa de incidencia se estima en alrededor de 139 por cada 100,000 personas (Figura 2); de ésta población infectada el 44.4% son positivos en la baciloscopia, es decir, aproximadamente 62 personas recién infectadas al año por cada 100,000 están secretando al ambiente *M. tuberculosis* capaz de infectar más personas [143].

Hasta el año 2006, la WHO estimó que en el mundo había 14,424,000 enfermos de tuberculosis (Tasa de prevalencia de 219 por cada 100,000 habitantes), de los cuales murieron de dicha enfermedad 1,656,000 personas en ese año (Tasa de mortalidad de 25 muertes por cada 100,000 habitantes). En promedio el 7.7% de la incidencia de tuberculosis en el 2006 se asoció a la infección del virus de la inmunodeficiencia humana adquirida (HIV por sus siglas en ingles de Human Immunodeficiency Virus) (Figura 3) [143].

Los datos anteriores nos muestran un panorama general de la tuberculosis a nivel mundial; sin embargo, en algunos sitios del planeta la tuberculosis es una de las mayores plagas que afectan al ser humano; Sudáfrica por ejemplo, con una población de 48,282,000 habitantes, reportó a la WHO en el año 2006 una tasa de incidencia 940 enfermos de tuberculosis en cualquiera de sus formas por cada 100,000 habitantes, de los cuales 384 por cada 100,000 eran bacilíferos. El número de enfermos por cada

100,000 habitantes fue de 998, de los cuales 218 por cada 100,000 murieron directamente por la enfermedad. En el 44% de los nuevos casos de tuberculosis reportados en Sudáfrica en el año 2006 había una coinfección con el HIV, este porcentaje de coinfección sólo es superado por Kenya con un 52% y es seguido por Zimbabwe con un 43%; sin embargo, estos últimos países mostraron tasas de incidencia menores (384 y 557 enfermos de tuberculosis en cualquiera de sus formas por cada 100,000 habitantes respectivamente) [143].

Al ser la tuberculosis humana un problema de salud de escala mundial como ya se ha revisado, México no se escapa de ser un país con tasas importantes de incidencia y prevalencia de ésta enfermedad como se hace notar en la siguiente sección, en la que se describe con los datos más recientes la situación de ésta afección en la población mexicana.



¹ *The Global Plan to Stop TB, 2006-2015*. Geneva, Stop TB Partnership and World Health Organization, 2006 (WHO/HTM/STB/2006.35).

Figura 1: Número de nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial. Se muestra en el mapa los intervalos del número de nuevos casos reportados a la WHO por 202 países en el año 2006. En estos países vive el 99.6% de la población mundial (6,590,088,000 personas), los países o territorios de los que no se obtuvo un reporte son: las Bahamas, las Islas Vírgenes Británicas, Chad, Guinea Ecuatorial, Mónaco, San Marino, Senegal, los Estados Unidos de Islas Vírgenes y las islas Wallis y Futuna. Figura tomada y modificada de [143].

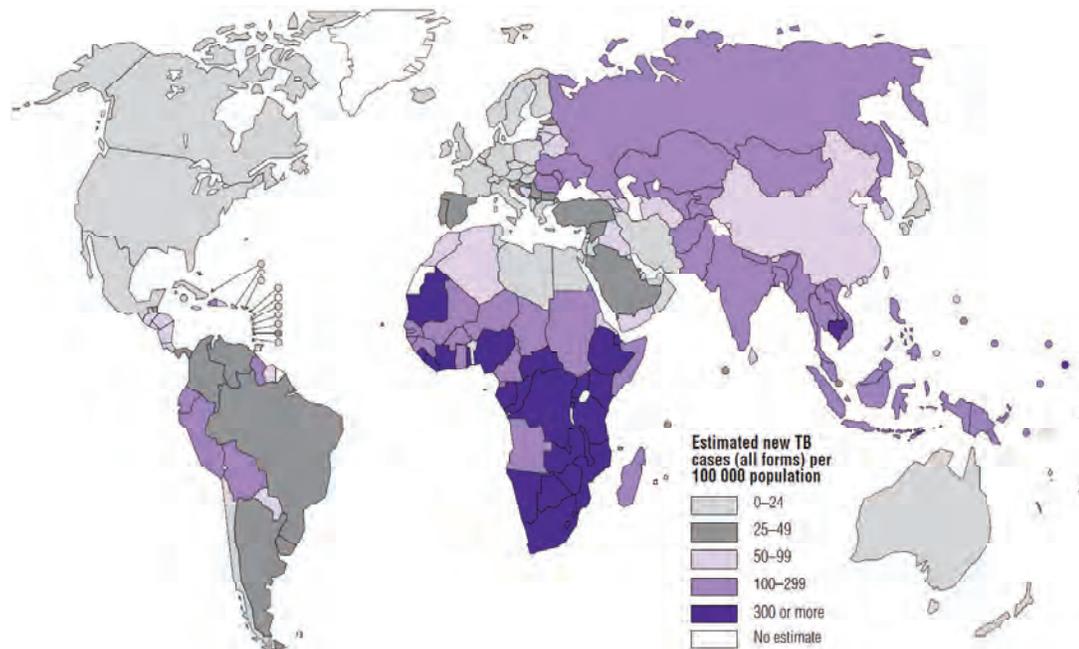


Figura 2: Tasa estimada de incidencia de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial. Se muestra en el mapa los intervalos de las tasas de incidencia estimada a nivel mundial por la WHO para los 202 países de los que en el año 2006 se obtuvo reporte de los nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas. De estos nuevos casos de tuberculosis el 44.4% de ellos fueron positivos a la baciloscopía. Figura tomada y modificada de [143].

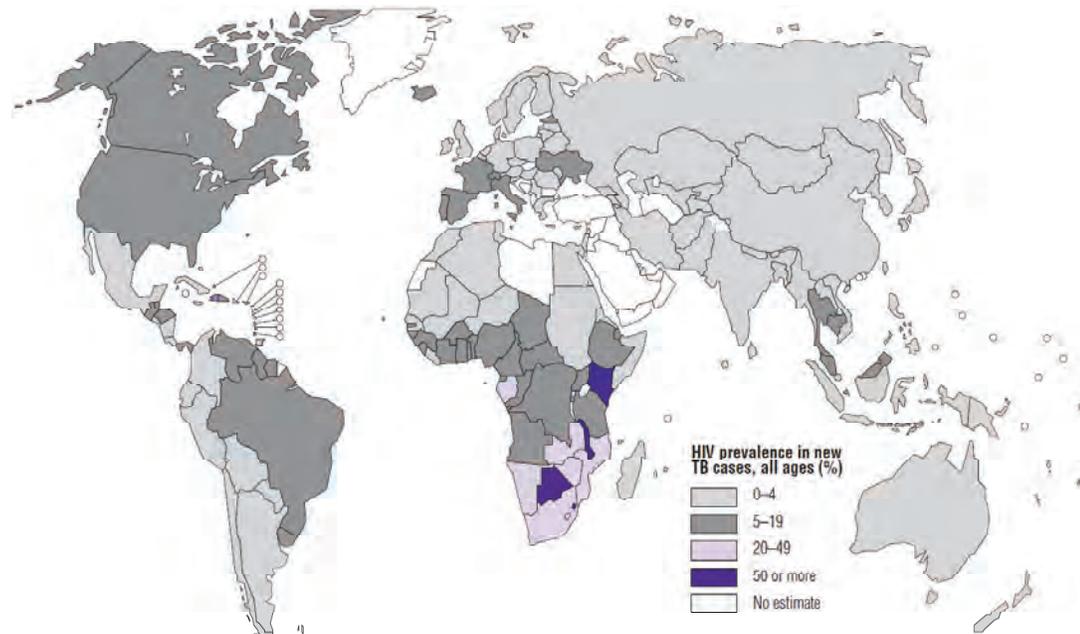


Figura 3: Porcentaje de asociación la infección de HIV a los nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas a nivel mundial. Se muestra en el mapa los intervalos de los porcentajes de la coinfección del HIV con *M. tuberculosis* en los nuevos casos de tuberculosis humana en todas sus formas reportados en el año 2006. Figura tomada y modificada de [143].

1.4 Situación de la tuberculosis humana en México.

La tuberculosis humana en México, de acuerdo con la información recabada por el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SINAVE), ha presentado una disminución en la incidencia con respecto a la estimada en años anteriores; no obstante, dicha enfermedad continúa presentándose con 15,091 casos nuevos (2008) y cerca de dos mil defunciones cada año, lo que se traduce en una importante pérdida de años potenciales de vida saludable y por consiguiente, un obstáculo para el desarrollo socioeconómico de México, ya que el promedio de edad de muerte por este padecimiento es de 54 años [22, 49].

En el año 2007 la información preliminar de la Plataforma Única de Tuberculosis estimó una tasa de 16.3 casos de tuberculosis en todas sus formas por cada 100,000 habitantes (17,143 casos nuevos), esto muestra una disminución de 11% respecto a la tasa registrada en el año 2000, en él que se identificaron 18,434 nuevos casos de tuberculosis en todas sus formas, lo que representa una tasa de 18.3 enfermos por cada 100,000 habitantes. De los casos notificados en 2007, la forma más frecuente diagnosticada fue la presentación pulmonar (14,422 casos nuevos), la tasa de incidencia para esta forma de tuberculosis es de 13.5 enfermos por cada 100,000 habitantes, esto se traduce en una disminución de 8% respecto a los 15,649 casos del año 2000 (Figura 4) [22].

En cuanto a la mortalidad, en el año 2006 se estimó una tasa de 1.8 fallecimientos por cada 100,000 (1,896 defunciones) lo que reflejó una disminución importante con respecto a la de 1997, cuando se registraron 3,663 defunciones (3.9 muertes por cada 100,000). Al comparar las tasas de mortalidad del año 2006 con respecto al 2000, se advierte un descenso de casi 36% en esta (Figura 5) [22].

Haciendo un análisis detallado de la situación de la tuberculosis pulmonar por entidades federativas se observan patrones de concentración bien definidos de estados con tasas de incidencia elevadas, principalmente estados de la región del occidente y del Golfo de México y con menor incidencia en los estados del centro del país. Estados como Tamaulipas (32.67 nuevos casos por cada 100,000 habitantes) y Baja California Norte (35.34) duplican la tasa promedio de incidencia nacional (13.5) en el año 2007, estos estados junto con Veracruz, Chiapas, Nuevo León, Jalisco, Sinaloa, Nayarit, Guerrero, Sonora, Oaxaca y Chihuahua concentran 70% de los casos identificados en el país (Figura 6). El intervalo de tasas de incidencia entre los estados varía desde 2.3 en Tlaxcala hasta 35.34 en Baja California Norte, lo que refleja diferencias importantes en el riesgo de contagio [23].

En cuanto a la mortalidad, las entidades federativas con el mayor número de defunciones por tuberculosis pulmonar durante 2006 fueron: Baja California Norte (234 fallecimientos), Chiapas (204), Veracruz (168), Jalisco (120) y Nuevo León (120) que, en conjunto concentran el 45% de las defunciones [23].

La tuberculosis en edad adulta sigue siendo más frecuente en el sexo masculino (Razón hombre: mujer de 1.5:1), con ciertas variaciones de un estado a otro, lo que puede ser explicado por factores socioculturales y económicos como la migración, ya que en la edad pediátrica prácticamente no existe diferencia (Razón 1.1:1). Sólo uno de cada 10 casos (11%) se presenta en menores de 19 años y las tasas más altas de enfermos se ubican en los grupos de 60 años o más [23].

Con relación a la mortalidad por grupos de edad, se identifica el mayor riesgo de morir por ésta enfermedad, conforme aumenta la edad. Los adultos en edad productiva, en conjunto con los de 65 años o más, concentran 94% del total de las defunciones, siendo estos últimos los que registran el mayor riesgo de morir con una tasa de 12 defunciones

por cada 100,000 habitantes. Es importante destacar que no existe diferencia en estas estimaciones con relación a la de los años anteriores. La razón de la tasa de mortalidad hombre: mujer estimada es de 2.6:1 [23].

De las localizaciones extrapulmonares frecuentes de la tuberculosis en México son la que afecta a nódulos linfáticos (5%), intestinal y peritoneal (1.5%), miliar (<1%) y meníngea (<1%), estas dos últimas presentaciones de tuberculosis representan las formas de la enfermedad de mayor gravedad. La mitad de los casos no presenta ninguna infección y/o enfermedad concomitante, no obstante las más frecuentemente asociadas a tuberculosis son: diabetes mellitus con 18% (35% en mayores de 40 años), desnutrición en 11.6% de los casos (24% en niños), alcoholismo 6.8% e infección por HIV en 5% [23].

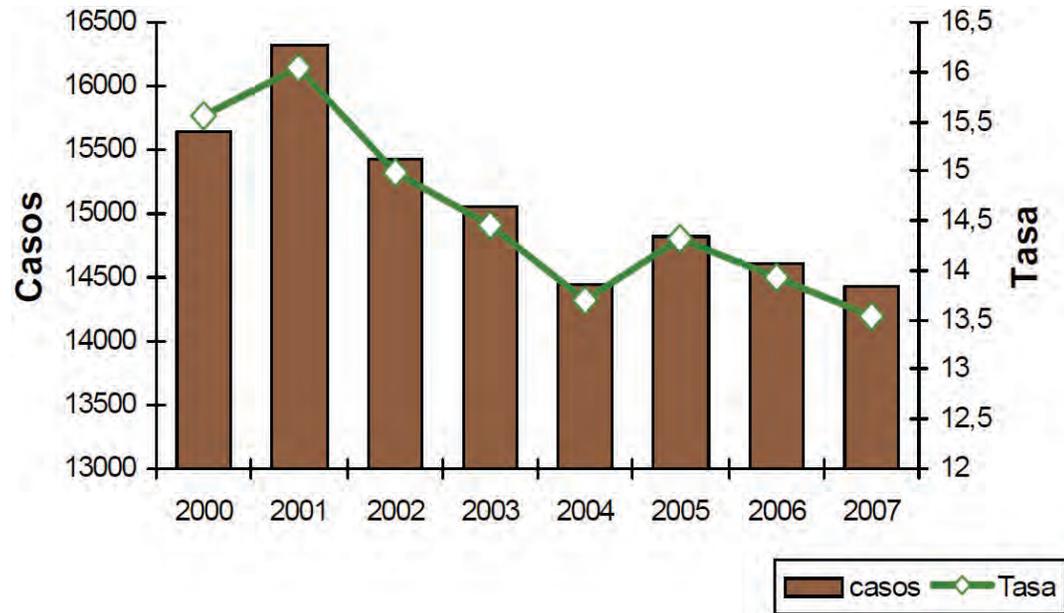


Figura 4: Número de casos de tuberculosis humana en su forma pulmonar y tasa de incidencia en México. Número de casos de tuberculosis pulmonar en la población mexicana en el período del año 2000 al 2007 (Barras), tasa de incidencia estimada para el mismo período (Línea) por cada 100,000 habitantes. Figura tomada y modificada de [22].

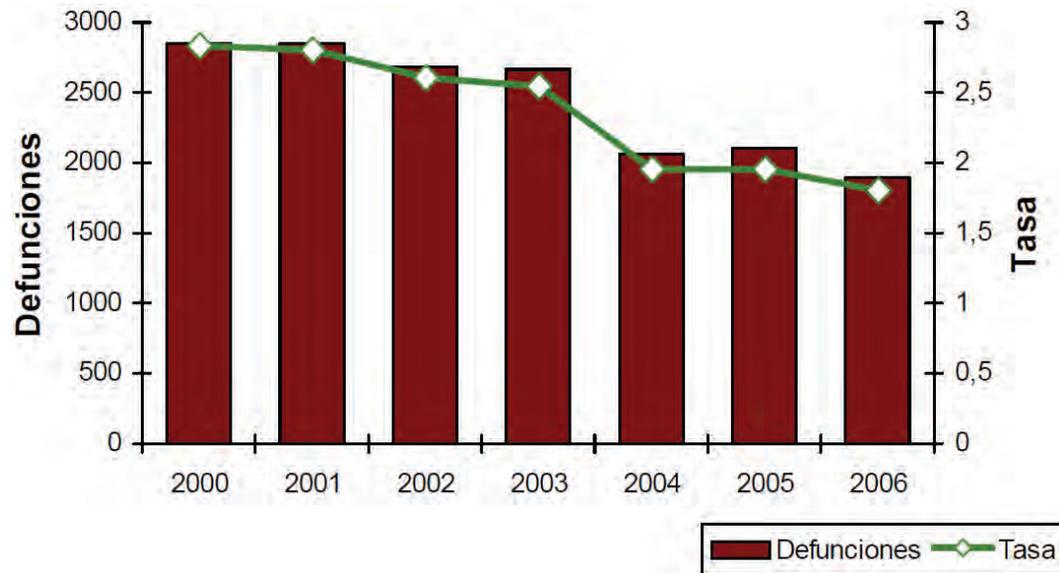


Figura 5: Número de defunciones por tuberculosis humana en su forma pulmonar y tasa de mortalidad en México. Número de defunciones por tuberculosis pulmonar en la población mexicana en el período del año 2000 al 2006 (Barras), tasa de incidencia estimada para el mismo período (Línea) por cada 100,000 habitantes. Figura tomada y modificada de [22].

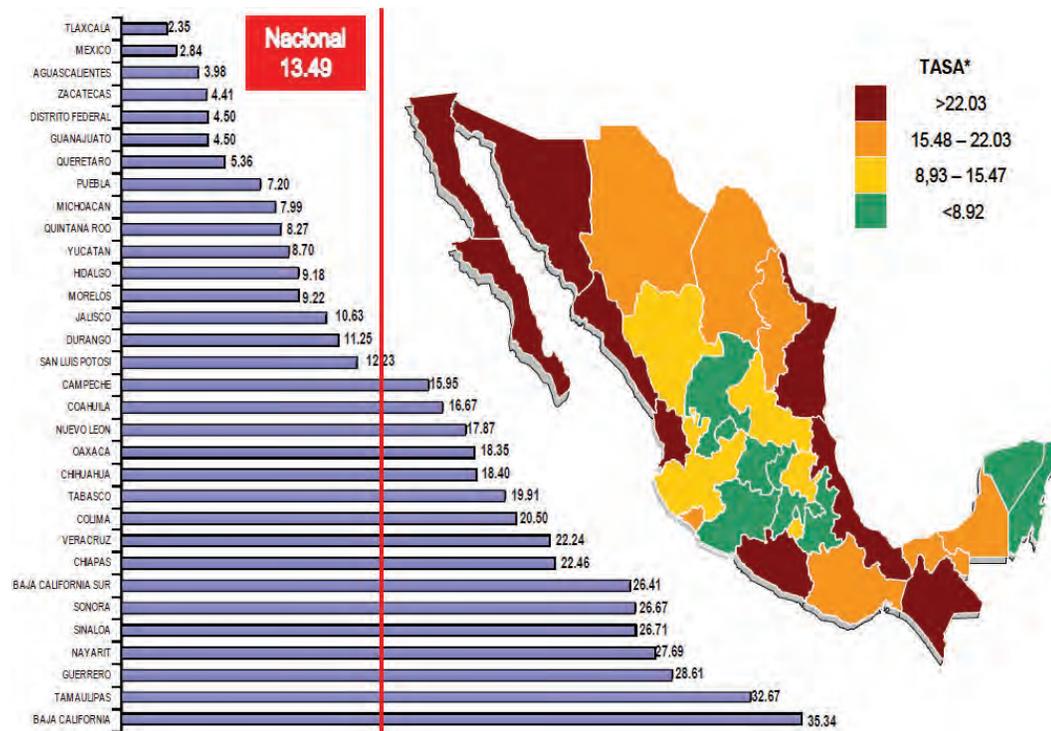


Figura 6: Distribución de la morbilidad de tuberculosis humana en su forma pulmonar en México. Tasa de incidencia por cada 100,000 habitantes de la tuberculosis pulmonar en cada una de las entidades federativas de México estimada en el año 2007. Figura tomada y modificada de [23].

1.5 Evolución del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

Como toda enfermedad infecto-transmisible, la tuberculosis humana es el resultado de tres elementos y de las relaciones establecidas entre ellos: el hospedero, el parásito y el ambiente. La forma como se relacionan estos elementos y los elementos en sí mismos pueden variar de muchas maneras a través del tiempo [27]. Conocer el proceso de desarrollo filogenético de una enfermedad infecciosa nos permite sugerir las posibles acciones que se puedan tomar en su contra el día de hoy [26].

La tuberculosis es una enfermedad totalmente dependiente de la densidad de la población para su transmisión y su persistencia dentro de ésta [98]. Ésto es, que para que se puedan establecer los contactos efectivos; contacto entre un enfermo que secreta el bacilo y una persona susceptible que se infecte y desarrolle la enfermedad, es necesario que exista un tamaño mínimo de la población efectiva (Número de individuos que interaccionan en un periodo de tiempo en un ambiente propicio para la transmisión de un parásito) [101]. Un modelo de simulación sugiere que se debe establecer una red social con un tamaño en un intervalo de 180 a 440 personas de población efectiva para que el bacilo de la tuberculosis tenga la capacidad de transmitirse y no desaparecer de la población, o por el contrario cuando el tamaño de la población efectiva es mayor a éste intervalo se genera un mayor número de enfermos y la mortalidad se ve incrementada en la población [101]. Adicionalmente, McGrath muestra que la fuerza de infectividad (Porcentaje de enfermos capaces transmitir la enfermedad dentro de una población dada en un periodo de tiempo) de *M. tuberculosis* es baja, puesto que es necesario un pequeño porcentaje de casos infecciosos para que la enfermedad se pueda transmitir constantemente dentro de la población [101].

Lo anterior sugiere que la cronicidad de la infección por especies miembros del complejo *Mycobacterium tuberculosis* (*Mycobacterium canetti*, *M. tuberculosis*,

Mycobacterium africanum, *Mycobacterium microti*, *M. bovis*, *Mycobacterium caprae* y las cepas de *Mycobacterium pinipedii* emparentadas con *M. bovis* que afectan a mamíferos marinos) fue un evento importante que se seleccionó a través de la evolución del bacilo, ya que la enfermedad al prevalecer dentro de una población efectiva pequeña en comparación con enfermedades infecciosas agudas y que dejan inmunes a los recuperados, como por ejemplo el Sarampión y la Poliomiélitis. Lo anterior se traduce en la permanencia prolongada de los pocos sujetos enfermos que permiten la transmisión dentro de un grupo pequeño de individuos, dada su fuerza de infectividad reducida, y por lo tanto se favorece la prevalencia de la enfermedad en la comunidad [14, 26, 27, 98]. Esto permitió que durante el periodo de la evolución de los primates que dieron origen al *Homo sapiens sapiens*, los grupos pequeños de individuos, al movilizarse constantemente a nuevas regiones practicando la caza y recolección, la enfermedad los acompañara a los nuevos territorios.

La idea anterior puede ser sostenida por las teorías y evidencias que sugieren que el humano evolucionó hace varios millones de años en la región que hoy ocupa el continente africano; adicionalmente, evidencias de tipo genético indican que el ancestro común de las especies de micobacterias que integran el complejo *M. tuberculosis* pudo haberse ubicado hace más de 40,000 años en la región Este de África, territorios de donde se diseminaron las poblaciones humanas primitivas aproximadamente en el mismo periodo de tiempo [26, 67, 91, 102, 142].

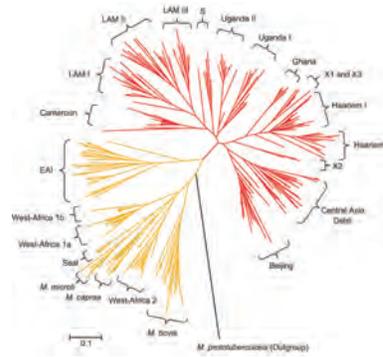
Posterior a este paso inicial, en donde *M. tuberculosis* acompañó a las civilizaciones humanas primitivas en su nomadismo, 10,000 a 20,000 años después se generó un evento de divergencia de especies micobacterianas del complejo *M. tuberculosis* que afectan a especies animales (*M. microti*, *M. bovis*, *M. caprae* y *M. pinipedii*) (Figura 7).

Esta dispersión del patógeno humano hacia especies animales coincide con uno de los

mayores eventos evolutivos en el ámbito sociocultural del género humano, el inicio de la domesticación de plantas y animales hace un poco más de 13,000 años (Figura 8) [43, 142].

Finalmente, coincidiendo con la explosión demográfica de las poblaciones humanas y la revolución industrial de los últimos 180 años, muchas de las líneas genéticas estrechamente relacionadas de *M. tuberculosis* se han expandido a lo largo del mundo, estableciendo una estrecha asociación con las distintas poblaciones humanas (Figura 9) [56, 57, 111, 142].

A



B

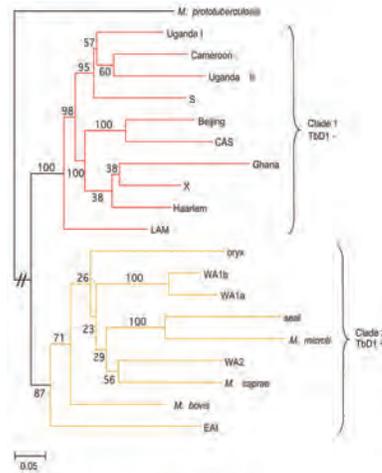


Figura 7: Relación evolutiva de los miembros complejo *Mycobacterium tuberculosis*. A). Fenograma no enraizado basa en las secuencias MIRU (Por las siglas del ingles Mycobacterial Interspersed Repetitive Units) utilizando en método Neighbour-joining. Se muestra la relación entre las distancias genéticas de las diferentes especies de bacilos miembros del complejo *M. tuberculosis*. B). Fenograma enraizado (Grupo externo *Mycobacterium prototuberculosis*) basa en las secuencias MIRU utilizando en método Neighbour-joining. Figura tomada y modificada de [142].

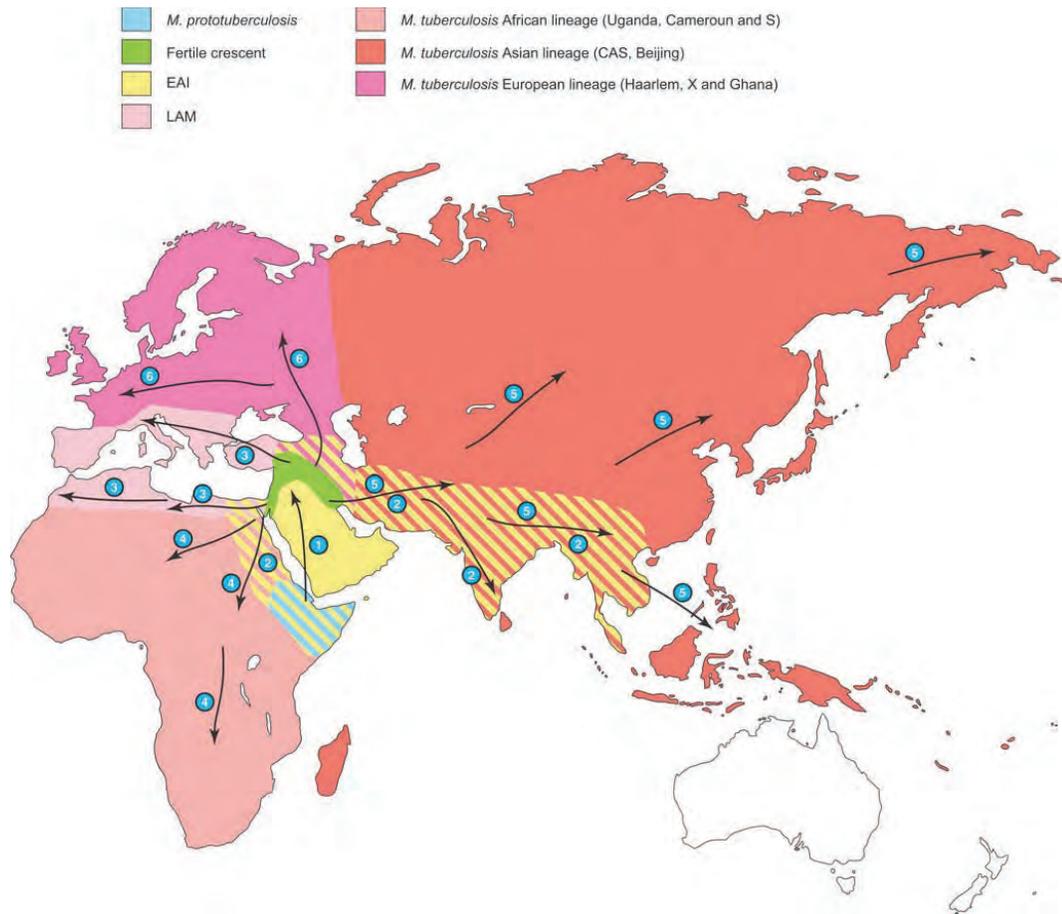


Figura 8: Escenario evolutivo de *Mycobacterium tuberculosis*. Los eventos de evolutivos y de dispersión del complejo *M. tuberculosis*: 1, *M. prototuberculosis*, el ancestro de complejo *M. tuberculosis* llegó de la región Este del continente Africano a los territorios del Fertil Crescente (Irak, Siria, Líbano, Israel, Palestina, Kuwait, Jordania, Nor-este de Egipto, Sur-oeste de Turquía, y Sur-oeste de Irán) hace alrededor de 40,000 años; 2 y 3, dos líneas genéticas se generaron, EAI (Eas-African-Indian) y LAM (Latino-American and Mediterranean) y se dispersaron fuera de Mesopotamia aproximadamente hace 10,000 años; 4, 5 y 6, líneas genéticas que acompañaron a las mayores migraciones humanas hacia África, Asia y Europa, estas líneas genéticas se adaptaron y posteriormente se diversificaron. Figura tomada y modificada de [142].

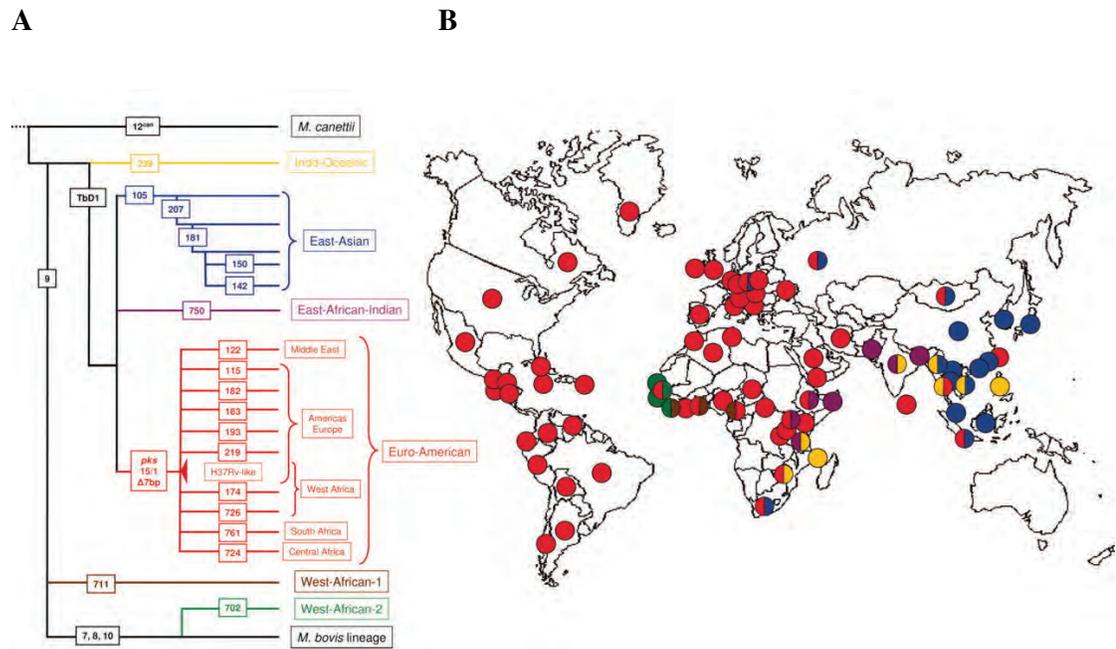


Figura 9: Estructura filogenética de la población global de *Mycobacterium tuberculosis* y distribución geográfica. A). Filogenia global de *M. tuberculosis* definida por el polimorfismo de grandes secuencias de DNA. **B).** Distribución geográfica de las seis mayores líneas genéticas de *M. tuberculosis*: ● East-Asian, ● East-African-Indian, ● Indo-oceanic, ● West-African-1, ● West-African-2 y ● Euro-american. Figura tomada y modificada de [57].

1.6 Secuencia del genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.

El posible escenario evolutivo que se ha descrito en la sección anterior, ha sido propuesto con la información aportada por muchos trabajos de epidemiología molecular, así como con los datos generados con la secuenciación de genomas completos de algunos miembros del complejo *M. tuberculosis* [19, 21, 28, 29, 53, 59, 122].

Por otro lado, con la secuenciación de estos genomas se encontró un par de familias de genes redundantes, que ocupan porcentajes importantes en relación con el número de genes y con relación a la longitud de las secuencias codificantes dedicadas a estos (Figura 10) [19, 21, 28, 29, 53]. Estas familias han sido denominadas PE y PPE, por la presencia del consenso Prolina-Glutámico y Prolina-Prolina-Glutámico en la posición 8 y 9; y 8, 9 y 10, respectivamente. Ambas familias se encuentran sobre-representadas en los genomas de micobacterias patógenas integrantes del complejo *M. tuberculosis* (~99 genes PE y ~69 genes PPE), con excepción de *Mycobacterium marinum* en el que se ha detectado el mayor número de estos genes (~175 genes PE y ~106 genes PPE) [19, 21, 28, 29, 53, 90, 128, 129].

Dentro la familia PE, una de la subfamilia con mayor número de miembros (~63 genes) y la cual hasta ahora sólo se ha encontrado en los genomas de micobacterias patógenas es la PE_PGRS, que se describe con más detalle en la siguiente sección.

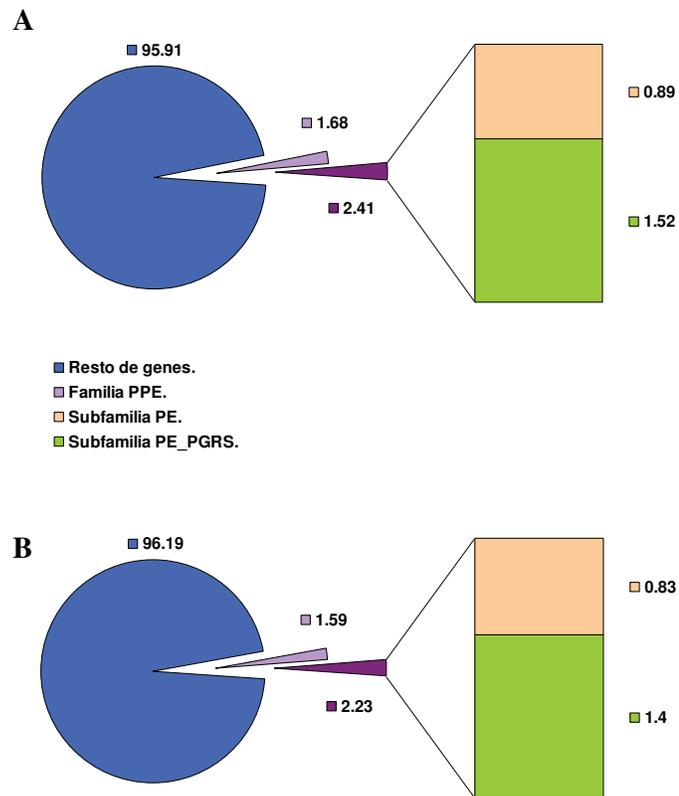


Figura 10: Familias PPE y PE en los genomas secuenciados de *M. tuberculosis*. Porcentaje que representan en los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (A) y CDC1551 (B) el número de genes que codifican para las proteínas PE (PE y PE de secuencia única) y PE_PGRS (Barras). También se indica el porcentaje de los genes de la familia PPE y la familia PE con respecto al total de número de genes anotados (Secciones del círculo) [21, 28, 29, 53].

1.7 Subfamilias multigénicas PE y PE_PGRS.

En el genoma secuenciado correspondiente a la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv ~99 genes integran la familia PE; como se comentó en la sección anterior se han denominado de ésta manera por la presencia en las proteínas codificadas del consenso Prolina-Glutámico (PE) en la posición 8 y 9. Entre éstas proteínas existe alta identidad en una región de alrededor de 110 aminoácidos de su extremo amino, extremo al que se ha denominado dominio PE, el cual puede carecer o tener adicionado un extremo carboxilo con secuencias peptídicas no relacionadas. Estas proteínas son identificadas como PE y PE de secuencia única, respectivamente. El resto, ~63 proteínas poseen adicionado al dominio PE un péptido de longitud variable con gran cantidad de Glicina y Alanina, codificado por secuencias repetidas polimórficas ricas en Guanina-Citosina (PGRS del Inglés Polymorphic GC-rich Repetitive Sequence) ésta subfamilia es llamada PE_PGRS (Figura 11) [1, 16, 17, 21, 28, 53].

Algunas sondas de DNA dirigidas hacia estas regiones repetidas polimórficas ricas en Guanina-Citosina se han venido utilizando aún antes de conocerse que formaban parte de marcos abiertos de lectura; junto con otras técnicas en la epidemiología molecular, como marcadores genéticos de aislados clínicos de *M. tuberculosis* [16, 17, 33, 116, 145].

Esta subfamilia de genes representa aproximadamente el 1.52% del número total de marcos abiertos de lectura anotados en *M. tuberculosis* H37Rv y el 1.40% en *M. tuberculosis* CDC1551; adicional a la redundancia, los genes *pe_pgrs* no muestran una organización o localización en regiones específicas del cromosoma, por el contrario se localizan dispersos a lo largo de él [1, 16, 17, 21, 28, 53].

Es en los genes de las PE_PGRS en donde se ha detectado mayor cantidad de diferencias al comparar los genomas de las cepas H37Rv y CDC1551 de *M.*

tuberculosis, la mayoría de estos cambios consisten en inserciones y deleciones los cuales son los eventos característicos de la dinámica del cromosoma de este patógeno en el cual no se han demostrado otros fenómenos que contribuyan de forma significativa al polimorfismo del genoma, como el polimorfismo de un solo nucleótido el cual es escaso en *M. tuberculosis* y en su mayoría localizados en genes que confieren resistencia a fármacos [5]. Se ha sugerido que el polimorfismo genético presente en las PE_PGRS podría generar una variación antigénica y ser empleada ésta por el patógeno como un mecanismo de evasión de la respuesta del sistema inmune [7, 103, 104].

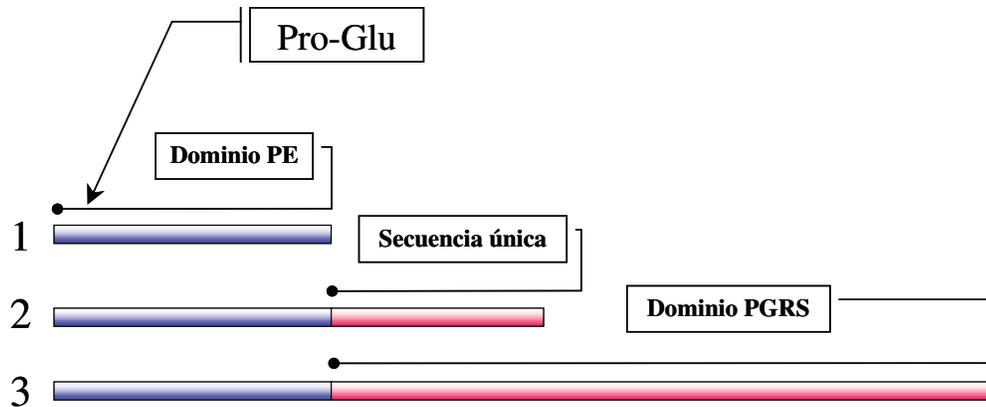


Figura 11: Esquema de las proteínas de la familia PE. 1). Esquema de las proteínas PE, se indica la posición del consenso PE (Pro-Glu) presente en la mayoría de estas proteínas. 2). Adicional al dominio PE (~110 aminoácidos) pueden tener una secuencia en el extremo carboxilo no relacionado (PE's de secuencia única). 3). O como en el caso de las PE_PGRS's, tener una región en el carboxilo de tamaño variable codificado por regiones polimórficas ricas en Guanina-Citocina (Dominio PGRS).

1.8 Expresión y función de las PE_PGRS.

A las proteínas PE_PGRS se les atribuye una posible función estructural, la cual no ha sido posible demostrar de forma contundente. Hasta el momento solo se ha podido identificar una de éstas proteínas en *M. bovis* BCG mediante espectrometría de masas. La expresión de ésta proteína fue inducida en respuesta a AMPc exógeno en ambientes con alto y bajo contenido de oxígeno; sin embargo, su nivel de expresión no correlacionó con el del mensajero lo cual podría explicarse por una regulación post-transcripcional, o puede ser que la vida media del mensajero sea reducida y que por defectos de la metodología empleada para la extracción del RNA total no se logró la detección del nivel real del mensajero [47, 60, 74, 99]. Adicionalmente, en *M. tuberculosis* H37Rv se han identificado recientemente la Wag22 en el filtrado de cultivo, de bacterias crecidas durante 3 semanas en medio Sauton y la PE_PGRS56 en la fracción de membranas de bacterias cultivadas por 2 semanas en medio GAS [97, 100].

Mediante varias herramientas moleculares se ha mostrado que casi todo los genes miembros de las PE_PGRS como se resume en la Tabla II, se expresan en respuesta a una gran cantidad de estímulos, así como durante las fases de crecimiento *in vitro* y en modelos de infección de macrófagos; la presencia de anticuerpos en pacientes sugiere su expresión *in vivo* durante la infección [123]. Sin duda, una de las herramientas que posé una gran sofisticación y que pretende realizar un análisis global de los niveles de expresión del genoma de un organismo son los microarreglos de DNA; pero su aplicación a los genes de las PE_PGRS resulta limitada muy a pesar de un diseño enfocado a reducir la hibridación cruzada de los mensajeros a detectar. Por lo que los resultados mostrados posteriores a un análisis sujeto a cierta subjetividad se deben tomar con las reservas pertinentes, sobre todo cuando se pretende equiparar los

resultados obtenidos con microarreglos basados en productos de PCR de una longitud mayor a los basados en oligonucleótidos de 70 unidades, estos últimos con mayor poder de discriminación [58, 73, 80, 137].

Otro análisis de aplicación global al genoma de *M. tuberculosis* fue realizado por Lamichhane *et al.* [83]. En este trabajo se intentó encontrar los genes esenciales de este patógeno y se observó que entre las familias que agrupaban algunos genes que no pueden ser mutados sin afectar la viabilidad *in vitro* del bacilo están algunos miembros de la subfamilia de las PE_PGRS; sin embargo, es importante señalar que en estos experimentos se empleó el elemento transponible Himar1 para la generación de las mutantes, el cual requiere la secuencia TA para insertarse lo cual puede generar resultados sesgados. El hecho de que no se hayan encontrado algunos genes *pe_pgrs* mutados, no necesariamente significa que sean esenciales, si no que el elemento transponible fue incapaz de insertarse en genes con una gran riqueza de GC, como lo son los que codifican para las PE_PGRS. Aunado a lo anterior, es contradictorio que al no mutarse *in vitro* los *pe_pgrs* se resalte la importancia de que estos genes deban conservarse cuando son los mismos que más variabilidad exhiben entre los aislados clínicos de *M. tuberculosis* [83, 116].

Interesantemente las mutantes en algunos genes homólogos de *M. marinum* a PE_PGRS de *M. tuberculosis* mostraron un efecto nocivo en la supervivencia del bacilo y el desarrollo de lesiones granulomatosas [110]. Así mismo la mutación del gen de la PE_PGRS de *M. bovis* BCG homóloga a la PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv redujo la capacidad de la bacteria de interactuar con sus mismas células bacterianas en el cultivo *in vitro* y las del hospedero durante el proceso de fagocitosis [18]. Por otro lado, la sobre-expresión de la misma PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* generó cambios drásticos en la morfología de la bacteria y la arquitectura de las

colonias [40]. Estas observaciones sugieren que la expresión de los genes *pe_pgrs* parece ser importante en la vida del bacilo, su presencia puede ser prescindible y no esencial como se ha sugerido [83].

Otra característica importante de algunas PE_PGRS, es su capacidad de interactuar con fibronectina, interacción que induce a pensar en la posible participación de estas proteínas en fenómenos de adherencia e invasión [50]. Es posible que la expresión de estas proteínas permita a la bacteria una mayor capacidad de interacción con el hospedero durante el proceso temprano de invasión y posterior diseminación; sin embargo, esto no es una razón que puede explicar la redundancia de ésta familia, así como la inducción de su expresión en respuesta a estímulos variados y diferente al compararse entre cepas [54]. Estas proteínas son reconocidas por el sistema inmune del hospedero, el cual responde de forma diferente ante los dominios PE y PGRS. El dominio PGRS por su fuerte identidad y similitud con la proteína EBNA-1 moduladora de la presentación de antígenos a través del complejo mayor de histocompatibilidad tipo I del virus de Eipsten-Barr sugieren una explicación para la generación de la repuesta diferencial hacia los dominios de las PE_PGRS, aunque aún se carece de mayores evidencias experimentales sólidas que justifiquen lo anterior [17, 24, 28, 39, 81, 124].

Tabla II: Datos publicados que refieren la expresión de los genes *pe_pgrs*.

		Referencia:*													
		137			115	137	137	54 137	137	137	137	137	137		120 134 137
Condición:	Técnica: PE_PGRS:	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
Macrófagos activados IFN γ	Microarreglo											A			
Macrófagos no activados.	GFP/SacB														A
DETA/NO 0.5 mM 40 min.	Microarreglo										A				
H ₂ O ₂ 10 mM 40 min.	Microarreglo														A
Hipoxia 0.20% 2 h.	Microarreglo							A			A				A
Ácido palmítico 50mM 4 h.	Microarreglo							A	A						A
Medio 7H9 pH 7.0/4.5 4 h.	RIVET														A
NRP** 20 d.	Microarreglo						R					A			A
Fase estacionaria	Microarreglo														
Log media 14 d.	RT PCR							E							
Cultivo de 1 semana	RT PCR														
Hierro Alto/Bajo	Microarreglo				A										
FeCl ₃ 2mM/50mM	Microarreglo basado en PCR				R										
FeCl ₃ 50mM/2mM	Microarreglo basado en PCR														
SDS*** 0.05% 1 h.	Microarreglo	A									A				
Diamida 5mM 1 h.	Microarreglo														
CCCP**** 0.5mM 1 h.	Microarreglo														
45 °C 30 min.	Microarreglo				A					A					

Continuación:

137	137	137	7	7	7	137	137	7	7	7	7	137	137		137	137		137	137	7	137	7
15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	wag22	31	32	33	34	35	
		A			A												A					
A										R	R										R	
A										R	R											
A							A	A					A									
	R					A		A		A				A								
											R	R		R			R					
				R							R	R			R		R					
			E	E	E				E	E	E	E									E	E
											R											
						A										A		A				

Continuación:

	137	7	137	137	137	137	137	137	137	137	115	137		137		137	137	137	137	137		
36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58
		A	A														A			A		
	A					A	A										A		A			
			A	A	A									A				A	A			
	R			R	R	R	R										R	R				R
	R								R			R						R				
		E																				
												A										
									A													
										A												
																	A					

2 Antecedentes.

“Los dogmas del pasado apacible son inadecuados para el tormentoso presente. La ocasión está llena de dificultades y debemos superarlos. Puesto que nuestro caso es nuevo, también debemos pensar de nuevo y actuar de nuevo. Debemos desencantarnos.”

Abraham Lincoln citado en [9].

Mediante un sistema de contra-selección con el gen *sacB* y la inducción de la expresión de la GFP, en 1999, Triccas *et al.* encontraron un fragmento de un 1.3 kb que correspondía al *Rv0834c* (PE_PGRS14), el cual fue capaz de mediar el incremento de la expresión del gen de la GFP 3.14 veces en *M. bovis* BCG que residía dentro de los macrófagos después de 6 días de haber sido infectados [134]. Posteriormente, en el año 2000 Ramakrishnan *et al.* lograron identificar dos fragmentos de gDNA de *M. marinum* capaces de mediar la expresión del gen reportero *gfp* en macrófagos murinos J774 y en los granulomas presentes en el hígado y bazo de ranas. Estas secuencias identificadas mostraron corresponder a las regiones promotoras de genes que poseen homología con alguno de los genes de las PE_PGRS. Estos son los dos únicos reportes que presentan la funcionalidad de las secuencias promotoras de los genes *pe_pgrs*. Sin embargo, hasta ahora no se ha caracterizado a detalle los elementos de las secuencias promotoras identificadas en estos genes [110].

Por otro lado, Rodrigue *et al.* en el año 2007, con un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina, muestra la identificación de las cajas reconocidas por el factor sigma H en la secuencia 5' corriente arriba de la PE_PGRS32 [113]. Aunque la secuencia que se muestra como la caja -35 es muy diferente a la encontrada en otros promotores ya descritos que son reconocidos por el factor sigma H. Song *et al.* mostraron que es sumamente importante que la secuencia de la caja -35 se encuentre totalmente conservada para que sea funcional *in vitro* [126]. Por lo que al carecerse en este caso de

datos de la funcionalidad de ésta secuencia y que además se pueda inducir un incremento en la expresión mediada por ésta secuencia promotora en respuesta a estrés oxidativo y térmico; no es posible definir con certeza que la transcripción de la PE_PGRS32 pueda ser mediada por el factor sigma H.

3 Justificación.

“Si bien todo lo determinado es predecible, no todo lo predecible está determinado.”

Risieri Frondizi, El problema de la libertad. pp 192, en [55].

Si bien es cierto que de forma indirecta se ha demostrado la expresión de la mayoría de los genes que codifican para las PE_PGRS, poco es lo que se conoce con relación a la funcionalidad de sus secuencias promotoras. Sólo algunos trabajos muestran que las secuencias promotoras de estos genes son capaces de regular la expresión de las proteínas para las que codifican. Tanto Ramakrishnan, *et al.* como Saviola *et al.* aunque describen que las secuencias promotoras de algunos de estos genes son funcionales y con capacidad para regular la inducción de la expresión en respuesta a varios estímulos, no realizan una caracterización con más detalle de estos promotores [110, 120].

Por lo tanto, en este trabajo se pretende identificar y caracterizar la región promotora de unas de las PE_PGRS's de las que más información se posee, la PE_PGRS33. Lo cual proveerá de una visión más amplia de la participación de esta proteína en la biología de *Mycobacterium tuberculosis*.

4 Hipótesis.

“Una idea que no es peligrosa no merece llamarse idea.”

Oscar Wilde, **The critic as artist** (1890) en **The portable Oscar Wilde**, editores R. Alditons y S. Weintraub, Viking, Nueva York, 1976, citado en [9].

La secuencia corriente arriba del gen *Rv1818c* que codifica para la PE_PGRS33, miembro de la familia PE_PGRS de *Mycobacterium tuberculosis* funciona como secuencia promotora.

5 Objetivos.

5.1 General.

Caracterizar la secuencia corriente arriba del gen *Rv1818c* como secuencia promotora y su funcionalidad bajo condiciones de cultivo *in vitro*.

5.2 Específicos.

Identificar y caracterizar el sitio en la secuencia corriente arriba del gen *Rv1818c* que funciona como promotor.

Evidenciar la expresión del gen *Rv1818c* y la temporalidad de la misma en cultivos *in vitro*.

6 Análisis de la transcripción de la PE_PGRS33.

6.1 Introducción.

“Lo que sucede primero no es necesariamente el principio.”

Henning Mankell, *Sidetraked*, Harvill Press, Londres, 2000, citado en [9].

El gen *Rv1818c* de *M. tuberculosis* H37Rv que codifica para la PE_PGRS33 se localiza corriente abajo y en la misma orientación que el gen *Rv1819c*, el cual ha sido anotado como una proteína transportadora tipo ABC [21, 28, 53]. La localización del gen *Rv1818c* junto con los datos previos de la localización en operones de algunos miembros de la subfamilia PE junto a genes que codifican para proteínas miembros de la familia PPE, abren la posibilidad de que el gen de la PE_PGRS33 esté formando una unidad transcripcional con el gen *Rv1819c* [112, 130, 131]. Para identificar si ambos genes se transcriben en un mRNA bicistronico se realizó un análisis de este transcrito por medio de un RT-PCR.

6.2 Material y Métodos.

6.2.1 Diseño de oligonucleótidos y extracción de RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv.

Para establecer si el transcrito de la PE_PGRS33 es independiente de él del gen *Rv1819c* se diseñaron oligonucleótidos para la síntesis del cDNA y para la amplificación de dos productos de diferente longitud, uno que intente detectar si el mRNA de la PE_PGRS33 y el de la *Rv1819c* se encuentran unidos, como se indica en la figura 12A y en la tabla III.

El oligonucleótido PERreverse se utilizó para realizar la síntesis del cDNA del RNA total extraído de 10 ml de un cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (Banco de cepas del

laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia) crecido en 50 ml de medio Middlebrook 7H9-ADC-Tween (Ver anexo 6.2.1a) en un matraz de 250 ml, en agitación constante a 200 rpm durante 10 días a 37°C. Los 10 ml tomados del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv se inactivaron inmediatamente al ser adicionados y mezclados con 40 ml de la solución GTC (4 M Guanidinium thiocyanate; 25 mM Trisodium citrate, pH 7.0; 0.5% Sodium N-lauryl sarcosine; 100 mM 2-mercaptoethanol) (Ver anexo 6.2.1b) e incubado a temperatura ambiente por 10 min. Una vez transcurrido este tiempo, la suspensión bacteriana se centrifugó a 3,000 x g por 15 min a 4°C, la pastilla bacteriana obtenida se resuspendió en 1 ml del reactivo Trizol (Invitrogen®) y se transfirió a un vial estéril de 2 ml de capacidad con tapa de rosca al que previamente se la habían adicionado aproximadamente 200 µl de perlas de vidrio con un tamaño de ± 106 µm (Sigma). La suspensión bacteriana se trató por 2 tiempos de 20 s cada uno ellos en un homogeneizador de tejidos (Fast Prep FP120 tissue homogenizer®, Savant Instruments), a una velocidad de 6.5 m/s. Al homogeneizado obtenido se le adicionaron 200 µl de Cloroformo frío (4°C), se mezcló en vortex por 30-40 s y se incubó a temperatura ambiente por 10-15 min.

Posterior a este tiempo de incubación, el homogeneizado bacteriano se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C, se retiró cuidadosamente el sobrenadante incoloro (~ 550 µl) después de la centrifugación y se colocó en un tubo eppendorf estéril de 1.5 ml de capacidad. Para precipitar el RNA total, al sobrenadante colectado se le adicionaron 500 µl de Isopropanol frío (-20°C), se mezcló invirtiendo repetidamente el tubo y se incubó a temperatura ambiente por 10 min. Posteriormente para colectar el RNA total precipitado se centrifugó por a 12,000 x g por 15 min a 4°C, se decantó cuidadosamente el sobrenadante y la pastilla obtenida se lavó dos veces con 1 ml de Etanol al 70 % frío (-20°C).

La pastilla del RNA obtenido se secó a temperatura ambiente y resuspendida en 50 μl de agua MQ tratada con DEPC (Ver anexo 6.2.1c).

De la pastilla resuspendida después de incubarla por 10 min a 65°C se tomó 2.5 μl y se sometió a electroforesis en gel de agarosa-Formaldehído (Ver anexo 6.2.1d) para evaluar su integridad. El RNA total así obtenido se cuantificó por espectrofotometría, y se tomó 1 μg para síntesis del cDNA.

6.2.2 Síntesis del cDNA, amplificación por PCR y visualización de los productos de la PCR en gel de agarosa-TAE.

Para la síntesis del cDNA se realizó en un volumen final de 20 μl una mezcla de los siguientes componentes:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		8 μl
RNA total	200 ng/ μl	5 μl
dNTP's	10 mM de cada uno.	1 μl
Oligonucleótido PERverse	100 pM	0.5 μl
Volumen final		14.5 μl

Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 min para desnaturalizar el RNA total, inmediatamente después de este tratamiento la muestra fue trasladada al hielo por 2-3 min.

A la mezcla anterior se le adicionó:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Buffer de reacción	5X	4 μl
DTT	100 mM	1 μl
Transcriptasa reversa*	200 U/ μl	0.5 μl
Volumen final		20 μl

* M-MVL DNA polimerasa dependiente de RNA (SuperScript III, Invitrogen).

Los reactivos se mezclaron en vortex, se centrifugaron para colectar el volumen total de la reacción e incubados por 30 min a 55°C para la síntesis del cDNA, después de este tiempo, la actividad de la transcriptasa reversa fue inactivada por 15 min a 70°C.

Para la amplificación de los productos de PCR, se tomaron 5 µl de la reacción de síntesis del cDNA junto con los siguientes reactivos:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		16.125 µl
Buffer de reacción	10X	2.5 µl
dNTP's	10 mM de cada uno	0.125 µl
Oligonucleótido RV1818FS o RV1818F10	100 pM	0.5 µl
Oligonucleótido RV1818R	100 pM	0.5 µl
Reacción de síntesis del cDNA		5 µl
<i>Taq</i> DNA polimerasa*		0.25 µl
Volumen final		25 µl

* (5 U/µl, Roche)

Para los controles positivos en lugar del cDNA se utilizó 100 ng de gDNA de *M. tuberculosis* H37Rv (Banco de muestras del laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia) y para los negativos 125 ng RNA total.

La amplificación se realizó por 40 ciclos en un termociclador Mastercycler® ep gradient (Eppendorf), bajo la siguiente rampa de temperatura:

Pasos	Desnaturalización inicial:	Amplificación:			Extensión final:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:	
Temperatura	94°C	94°C	61°C	72°C	72°C
Tiempo	3 min	40 s	25 s	50 s	5 min

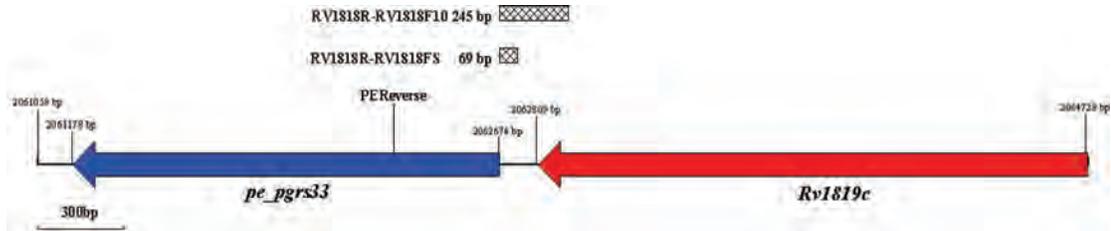
Para visualizar los productos de PCR obtenidos se tomaron 4 µl del volumen de reacción de la PCR de cada una de las amplificaciones y fueron resueltos en una electroforesis en gel de agarosa-TAE buffer (40 mM Tris-Acetato, 1 mM EDTA, pH 8.0) al 1.5 % teñido con Bromuro de etidio (0.33 mg/ml, adicionado al gel) (Figura 12B).

Tabla III: Oligonucleótidos empleados en el análisis de transcripción del mRNA de la PE_PGRS33.

Oligonucleótido:	Secuencia (5'→3'):	Uso*:
PERreverse	TAGGATCCCTAGTTGGCTCCGTTACCGAT	Síntesis del cDNA
RV1818R	TATGTGATATCTGGCACCTCGTCAACAC	PCR
RV1818FS	TATGCGGCCGCTGGGGAGTGACCAGGC	PCR (69 bp)
RV1818F10	TAGGATCCGTCAGCCATCGCCCCG	PCR (245 bp)

* El tamaño esperado de los productos se indica entre paréntesis.

A



B

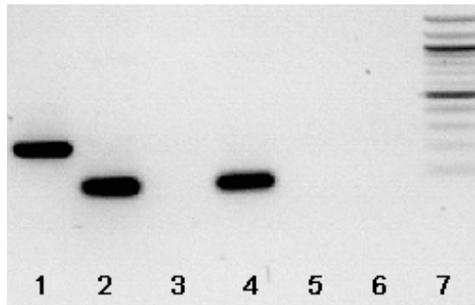


Figura 12: Región genómica de la PE_PGRS33 y de la Rv1819c y gel de agarosa-TAE con los productos de la PCR del análisis de transcripción. A) Diagrama de la región genómica donde se localiza la secuencia codificante de la PE_PGRS33 y de la Rv1819c; se indica el sitio donde híbrida el oligonucleótido PEReverse empleado en la síntesis del cDNA para el análisis de transcripción, los oligonucleótidos empleados en la PCR, el tamaño de los posibles productos ha amplificar y la región que abarcan estos. **B)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE de los productos de la PCR: Carril 1 y 2, productos de 245 y 69 bp amplificados por PCR a partir de gDNA de *M. tuberculosis* H37Rv; Carril 3 y 4, reacciones de PCR a partir del cDNA sintetizado con el RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv, sólo se logra visualizar el producto de 69 bp; Carril 5 y 6, reacciones de PCR a partir de RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv, no hay generación de amplificandos; Carril 7, marcador de peso molecular Quick-Load™ 100 bp DNA Ladder (New England BioLabs).

6.3 Resultados.

Como se muestra en la figura 12B, se logró amplificar en los controles positivos (gDNA) los productos de PCR esperados (69 y 245 bp respectivamente) con la mezcla de los iniciadores: RV1818R/RV1818S y RV1818R/RV1818F10. Cuando se empleó en la amplificación de la muestra de RNA total, no se observó en ninguno de los casos la presencia de amplificados.

Finalmente al utilizar cDNA sintetizado con el iniciador PEReverse, únicamente se logró amplificar en la PCR el producto de menor tamaño, lo cual indica que si estaba presente el mRNA de la PE_PGRS33; pero este es de tipo monocistrónico ya que al intentar obtener un producto de PCR con un iniciador que híbrida 89 bp corriente arriba del codón de paro anotado del gen *Rv1819c* este no fue posible de observar.

Este resultado, en donde se demuestra que la transcripción de la PE_PGRS33 se realiza forma independiente del gen *Rv1819c* hace pensar que la transcripción de la PE_PGRS33 es mediada por una secuencia promotora propia.

7 Evaluación de la funcionalidad de la secuencia promotora de la PE_PGRS33.

7.1 Introducción.

Para establecer la funcionalidad de la secuencia corriente arriba de la PE_PGRS33 como secuencia promotora, se clonaron varias longitudes de dicha región en el vector pFPV27 [136] corriente arriba y en orientación al ORF del gen reportero de la proteína fluorescente verde (*gfp*). Las fusiones transcripcionales obtenidas, corroboradas por secuenciación automática se emplearon para transformar por electroporación *M. smegmatis* mc² 155 (Banco de cepas del laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia), junto con el vector sin inserto como control negativo y una construcción con el promotor de la proteína de choque térmico de 60 kDa como control positivo (Banco de plasmidos del laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia).

7.2 Material y métodos.

7.2.1 Construcción de las fusiones transcripcionales.

Como se muestra en la figura 13A se diseñaron una serie oligonucleótidos para la amplificación de secuencias de 245, 196, 150, 69 bp de la región corriente arriba del gen *pe_pgrs33* a partir del codón de inicio de la traducción. La secuencia y los sitios de restricción incluidos en los oligonucleótidos se muestran en la tabla IV, estos se diseñaron de tal manera que los productos de la PCR al ser clonados en el vector pFPV27 (Figura 13C) quedarán en orientación al ORF de la GFP. Adicional a estas secuencias, el fragmento de 150 bp se amplificó con los sitios de restricción adicionales de manera invertida, para clonarlo en orientación contraria al ORF de la GFP.

Todos los fragmentos se amplificaron con la DNA polimerasa de alta fidelidad *Pfx* (Invitrogen), en una reacción de 25 µl que contenía, 1X del Buffer 10X de reacción, 1X

del Enhancer 30X, 1 mM de MgSO₄, 0.08 mM de cada uno de los dNTP's, 0.8 pM de cada uno de los oligonucleótidos y 50 ng de gDNA de *M. tuberculosis* H37Rv (Banco de muestras del laboratorio de la Dra. Clara I. Espitia).

Las reacciones fueron amplificadas en un termociclador Mastercycler[®] ep gradient (Eppendorf), con la siguiente rampa de temperatura:

Pasos	Desnaturalización inicial:	Amplificación:			Extensión final:
		Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:	
Temperatura	94°C	94°C	63°C	68°C	68°C
Tiempo	3 min	1 min	25 s	40 s	5 min

Los productos amplificados (Figura 13B), se purificaron de la reacción de PCR (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) y capturados en el vector pCR4[®] Blunt-TOPO[®] (Invitrogen) siguiendo las instrucciones de los fabricantes (Anexo 7.2.1a). Las reacciones de ligación fueron utilizadas para transformar la cepa de *E. coli* TOP10 previamente preparada para transformación por Calcio (Anexo 7.2.1b), las colonias seleccionadas en placas de medio LB con 100 µg/ml de Car (Invitrogen) más X-gal (40 µl de una solución al 2% en Dimethylformamide, dispersada en la superficie de la placa) se amplificaron en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de Car durante toda la noche a 37°C en agitación constante. A estos cultivos se les extrajo el plásmido (GeneJet[™] Plasmid Miniprep kit, Fermentas) y cada una de estas extracciones se les realizó un mapa de restricción con la enzima de restricción *EcoRI* (Fermentas) para verificar la ligación del inserto correspondiente.

Cada uno de los fragmentos de PCR capturados en el vector pCR4[®] Blunt-TOPO[®], se liberaron con las correspondientes enzimas de restricción (Fermentas) para las cuales le fueron adicionados los sitios de restricción con los oligonucleótidos (Tabla IV) y

ligados al vector pFPV27 previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. Tanto los insertos como el vector se purificaron de un gel de agarosa-TAE (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante y se mezclaron en una reacción de ligación de 10 μ l con 2 unidades de T4 DNA ligasa (Roche).

Después de incubar las reacciones de ligación durante toda la noche a 16°C, se utilizaron para transformar la cepa de *E. coli* TOP10 competente por Calcio (Anexo 7.2.1b), la selección de las transformantes se realizó en medio LB con 50 μ g de Kn/ml (Invitrogen). Las colonias seleccionadas fueron amplificadas en 5 ml de medio LB con 50 μ g/ml de Kn durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Los plasmidos extraídos de estos cultivos se les realizó un mapa de restricción con las enzimas de restricción correspondientes para liberar cada uno de los fragmentos ligados (Ver tabla **IV**). Adicionalmente los plasmidos que incluían los fragmentos de correspondientes fueron sometidos a secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México.

7.2.2 Evaluación de las fusiones transcripcionales en *M. smegmatis* mc² 155.

Las construcciones obtenidas: pCA18-245, pCA18-196, pCA18-150, pCA18-69 y pCA18-150Inv, junto con el plasmido pFPV27 y pFPV27-Pshp60 se emplearon para transformar la cepa de *M. smegmatis* mc² 155 previamente preparada para electrocompetencia (Anexo 7.2.2a).

Las colonias de *M. smegmatis* mc² 155 recuperadas después de 3 días de incubación a 37°C en placas de medio Middlebrook 7H11 adicionadas con 10% de OADC (Ver anexo 7.2.2b) y 25 µg/ml de Kn, de cada uno de los plásmidos empleados para electroporar se sembraron en 5 ml de medio Middlebrook 7H9 con 10 % de enriquecimiento ADC, 0.5 g/l de Tween 80 y 25 µg/ml de Kn e incubadas por 48 h a 37°C en agitación constante. Estos cultivo se emplearon para inocular matraces de 125 ml de capacidad con 50 ml de medio Middlebrook 7H9-ADC-Tween-Kn, diluyendo 1:100 este precultivo. Una vez inoculados se realizó una lectura de la densidad óptica a 600 nm, esta primera lectura fue considerada el tiempo cero; cada 12 horas de incubación a 37°C en agitación constante se tomó una alícuota del cultivo para realizarle la misma lectura. Los datos de las lecturas tomadas hasta las 84 h de cultivo se graficaron y permitieron identificar las fases de crecimiento, ver figura 14.

Para la evaluación de la expresión de la GFP en cada una de las diferentes fusiones transcripcionales se tomaron alícuotas (1-2 ml) de cultivos de la fase logarítmica (28 h) y de la fase estacionaria (48 h). Adicional a estas condiciones de cultivo, se realizaron cultivos con depleción de nutrientes y oxígeno. Para la depleción de nutrientes se tomaron 10 ml de cada uno de los cultivos en fase logarítmica (28 h), se colectó la pastilla bacteriana por centrifugación a 3,000 x g, por 15 min a temperatura ambiente. Se retiró el medio de cultivo y las bacterias fueron lavadas dos veces con PBS, pH 7.4

(10 mM de Fosfatos, pH 7.4 y 150 mM de NaCl). Las bacterias así tratadas fueron resuspendidas en el mismo volumen inicial de PBS, pH 7.4, e incubadas en agitación constante a 37°C por 12 h [12].

Por otro lado, para la depleción paulatina de oxígeno, se realizó la técnica descrita por Wayne y Hayes [139] con algunas modificaciones. A frascos con tapón de goma estéril, de 25 ml capacidad se le adicionó un volumen de 16.66 ml de cada uno de los cultivos en fase logarítmica (28 h), esto permite una relación de cultivo/aire 2:1. Como indicador de la eliminación gradual de oxígeno se le adicionó Azul de metileno a una concentración de 1.5 µg/ml antes de sellar el frasco con el tapón de goma. El cultivo se mantuvo disperso por la acción de una pequeña bala magnética, sin disturbar la interfase cultivo-aire a una temperatura de 37°C por 12 h.

A cada una de las muestras de cada uno de los cultivos en fase logarítmica, estacionaria, depleción de nutrientes y oxígeno les fue colectada la pastilla bacteriana por centrifugación a 6,000 x g por 10 min a temperatura ambiente. Las muestras se lavaron 2 veces en PBS, pH 7.4, con excepción de las muestras de depleción de nutrientes; y resuspendidas en 100 a 150 µl del mismo buffer. Las bacterias se sonicaron por 30-35 s a una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 95 Watts (Virsonic). Para colectar la fase soluble las muestras fueron centrifugadas a 12,000 x g por 10 min a temperatura ambiente. Se colecté el sobrenadante y este fue cuantificado por la técnica de Lowry en micro placa de titulación (Anexo 7.2.2c).

La concentración de cada uno de los sobrenadantes fue ajustada a 1 µg/µl de proteína, 8 µl de cada uno de estos extracto se sometieron a electroforesis en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida al 12% (Anexo 7.2.2d), se electrotransfirieron a membranas PVDF (Immobilon™-P, Millipore) las cuales fueron teñidas con azul de Comassie para corroborar la transferencia (Figura 15A). Para hacer la inmunodetección

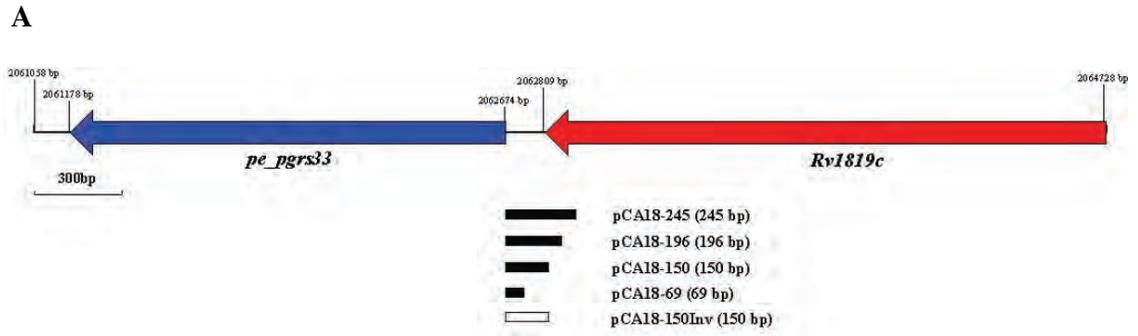
de la GFP, las membranas fueron desteñidas completamente e incubadas por 20 min con la solución de PBS-T-BSA (PBS, pH 7.4 con 0.05% de Tween 20 y 3% de BSA) en agitación constante a temperatura ambiente. Después de esta incubación les fue adicionado el anticuerpo murino anti-GFP (Zymed) a una dilución final de 1:2,000 e incubados en las condiciones antes descritas por 2 h. Después de retirar esta solución, se realizaron 3 lavados de 5 min cada uno con PBS-T frío (PBS, pH 7.4 con 0.05% de Tween 20). Posterior a los lavados las membranas fueron incubadas por 1 h en las condiciones descritas con el anticuerpo caprino anti-ratón marcado con HRP (Zymed) diluido en la solución PBS-T-BSA 1:1,000. Después de tres lavados con PBS-T frío se realizó la detección de la reactividad de los anticuerpos con 3 mg/ml de 3, 3-diaminobenzidine (Sigma) y 30% peróxido de hidrógeno (Merck) diluido 1:1,000 en PBS-T (Figura **15B**). Una vez secas cada una de las membranas fueron escaneadas (HP-Scanjet 4670, Hewlett-Packard) y la intensidad de las bandas fueron detectadas y cuantificadas con el software libre ImajeJ (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>). Los resultados de tres cultivos diferentes en cada una de las condiciones de cada una de las cepas de *M. smegmatis* mc² 155 transformadas con las diferentes fusiones transcripcionales se normalizaron con relación a la expresión de la GFP en el control positivo en las mismas condiciones de cultivo (pFPV27-Phsp60).

Los valores de las expresiones relativas de las diferentes fusiones transcripcionales fueron comparadas con un análisis de varianza, seguida de la prueba *post hoc* de Bonferroni (Figuras **15C** y **16**).

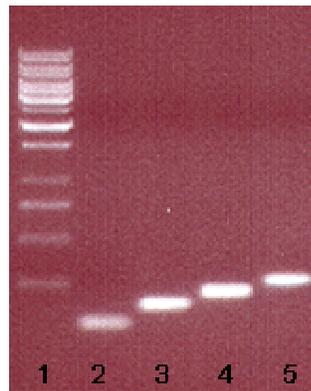
Tabla IV: Oligonucleótidos empleados en la amplificación por PCR de secuencias de diferente longitud de la región corriente arriba de la secuencia codificante de la PE_PGSR33 a partir de gDNA de *M. tuberculosis* H37Rv.

Oligonucleótido:	Secuencia (5'→3')*:	Enzima de restricción:
RV1818R	TATGT <u>GATATC</u> TGGCACCTCGTCAACAC	<i>EcoRV</i>
RV1818FS	TAT <u>GCGGCCGC</u> TGGGGAGTGACCAGGC	<i>NotI</i>
RV1818F	TAT <u>GCGGCCGC</u> CGAAGTGTAAGCC	<i>NotI</i>
RV1818F05	T <u>AGGATCC</u> TACTCGGTGGCGGCCAAT	<i>BamHI</i>
RV1818F10	T <u>AGGATCC</u> GTCAGCCATCGCCCCG	<i>BamHI</i>
RV1818RI	ATA <u>GCGGCCGC</u> TGGCACCTCGTCAAC	<i>NotI</i>
RV1818FI	TATGT <u>GATATC</u> GAAAGTGTAAGCCGGG	<i>EcoRV</i>

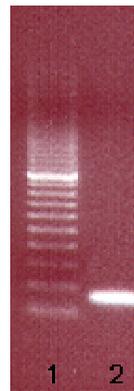
* La secuencia reconocida por la enzima de restricción se resalta en negritas y subrayado.



B



C



D

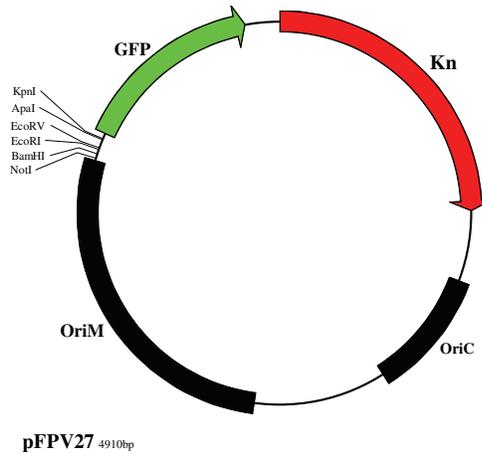
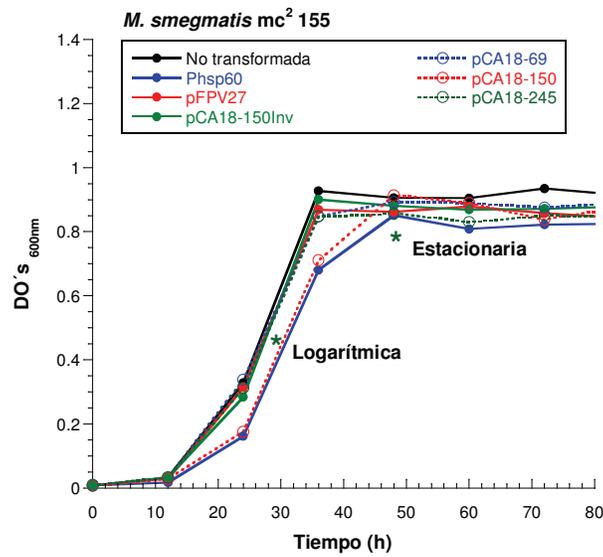


Figura 13: Región genómica de la PE_PGRS33 y de la Rv1819c y gel de agarosa-TAE con los productos de la PCR clonados en el vector pFPV27. A) Región genómica donde se localiza la secuencia codificante de la PE_PGRS33 y el gen *Rv1819c*, se muestra la ubicación de las secuencias corriente arriba de la PE_PGR33 amplificadas por PCR. **B)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE de los productos de PCR de la región intergénica corriente arriba de la PE_PGRS33. Carril 1, marcador de peso molecular GeneRuler™ 1kb DNA Ladder (Fermentas); Carril 2, 69 bp; Carril 3, 150 bp; Carril 4, 196 bp y Carril 5, 245 bp. **C)** Electroforesis en gel de agarosa-TAE del producto de PCR de la región intergénica corriente arriba de la PE_PGRS33. Carril 1, marcador de peso molecular 100 bp DNA Step Ladder (Promega) y Carril 2, 150 bp con los sitios de restricción de producto de PCR del carril 3 del gel anterior. **D)** Vector pFPV27 que contiene en ORF que codifica para la proteína fluorescente verde sin secuencia promotora [136].

A



B

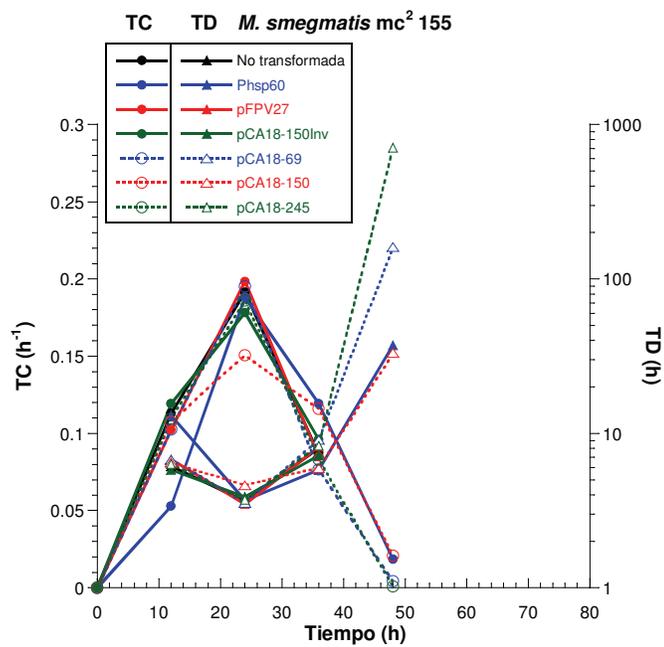


Figura 14: Cinética de crecimiento de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. A) Gráfica de las lecturas de las densidades ópticas a 600 nm tomadas cada 12 h de un cultivo de *M. smegmatis* mc² 155 sin transformar (—●—) y transformado con los plásmidos: pFPV27-Phsp60 (—●—), pFPV27 (—●—), pCA18-150Inv (—●—), pCA18-69 (—○—), pCA18-150 (—○—) y pCA18-245 (—○—), en medio de cultivo Middlebrook 7H9-ADC-Tween con 25 µg/ml de Kn cuando corresponda. Los cultivos se iniciaron con la inoculación de 50 ml medio nuevo con una dilución de 1:100 de un precultivo de una colonia en 5 ml del mismo medio incubado durante 72 h a 37°C con agitación constante. Se indica con un asterisco los tiempos de cultivo considerados como fase logarítmica (28 h) y estacionaria (48 h) de crecimiento. B) Gráfica de los datos de tasa de crecimiento específico (TC) y tiempo de duplicación (TD) calculados para cada uno de los valores de densidad óptica de la curva de crecimiento.

Nota: En estas gráficas no se muestra la cinética de crecimiento de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con pCA18-196.

Tasa de crecimiento:

$$TC = \ln(DO_1/DO_2)/(T_1-T_2).$$

Donde:

Ln = Logaritmo natural.

DO = Densidad óptica a 600 nm.

T = Tiempo en horas.

Tiempo de duplicación:

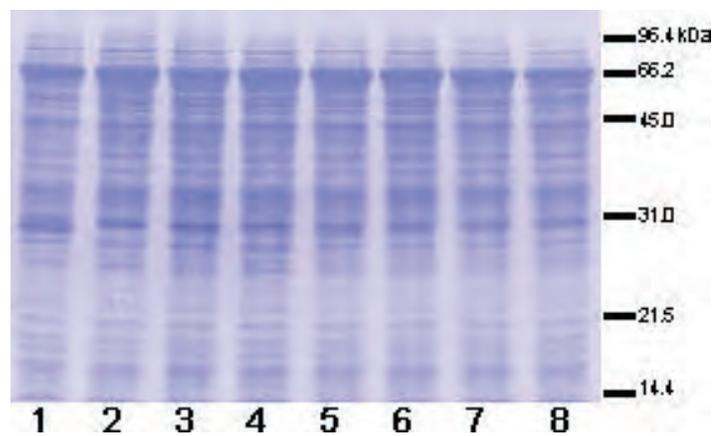
$$TD = \ln 2/TC$$

Donde:

Ln2 = Logaritmo natural de 2.

TC = Tasa de crecimiento específico.

A



B



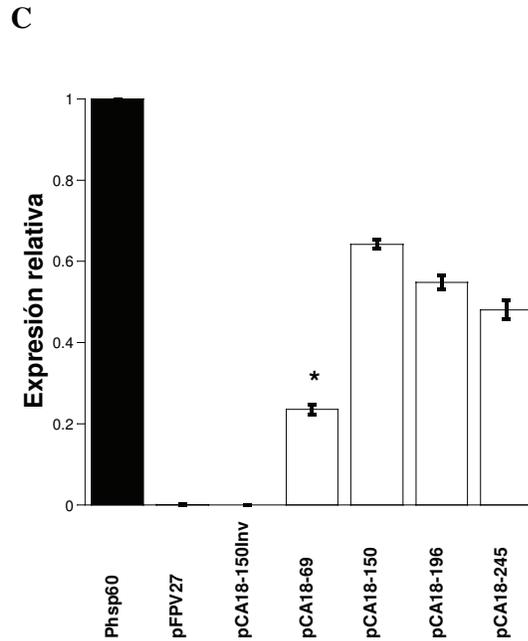
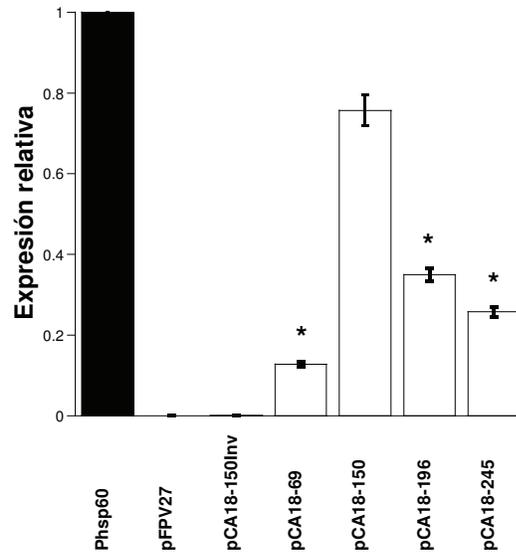
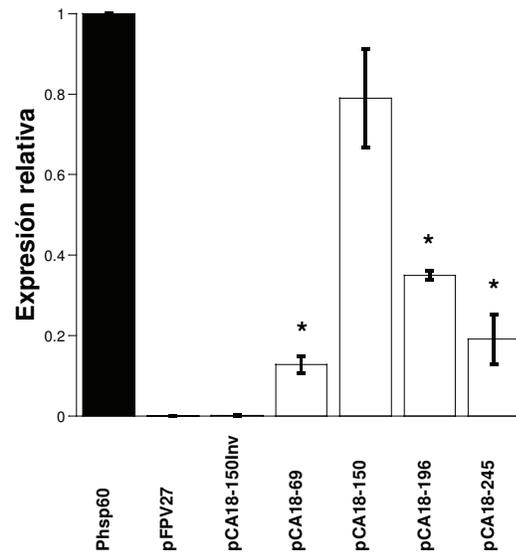


Figura 15: Expresión de la GFP en cultivos en fase logarítmica de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. A) Membrana de PVDF teñida con azul de Coomassie con las proteínas solubles de cultivos en fase logarítmica de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con los plasmidos: pFPV27-Phsp60 (1), pFPV27 (2), pCA18-150Inv (3), pCA18-69 (4), pCA18-150 (5), pCA18-196 (6), pCA18-245 (7) y sin transformar (8). Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars Low range (BioRad). B) Inmunodetección de la GFP en los mismos extractos. C) Cuantificación de la expresión de la GFP en los extractos solubles de tres cultivos independientes de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. La expresión está normalizada con respecto a la expresión de la GFP del plasmido pFPV27-Phsp60. *Diferencia estadísticamente significativa, (Análisis de varianza, $p < 0.05$, Bonferroni post-test).

A



B



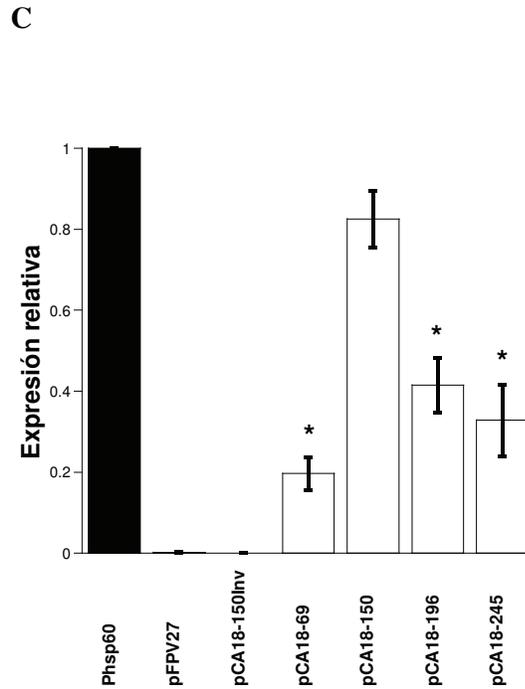


Figura 16: Expresión de la GFP en cultivos en fase estacionaria, depletados de nutrientes y oxígeno de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales. Cuantificación de la expresión de la GFP en los extractos solubles de tres cultivos independientes de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con: pFPV27-Phsp60, pFPV27, pCA18-150Inv, pCA18-69, pCA18-150, pCA18-196 y pCA18-245. Los extractos fueron preparados de cultivos en fase estacionaria (A), condiciones de depleción de nutrientes (B) y oxígeno (C). La expresión está normalizada con respecto a la expresión de la GFP del plasmido pFPV27-Phsp60 en las mismas condiciones de cultivo. *Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la expresión de la GFP en la fusión transcripcional pCA18-150, (Análisis de varianza, $p < 0.05$, Bonferroni post-test).

7.3 Resultados.

Mediante la detección de la GFP en los extractos solubles de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las diferentes fusiones transcripcionales en fase logarítmica (28 h), se observó que los fragmentos (150, 196 y 245 bp) de la secuencia corriente arriba de la secuencia codificante de la PE_PGRS33 son capaces de mediar la transcripción del ORF de la GFP de manera similar, figura **15**. Cuando el fragmento de 150 bp fue colocado en orientación invertida, éste resulto incapaz de mediar dicha transcripción al igual que cuando el vector carece de inserto. El fragmento de menor tamaño clonado también tiene la capacidad de mediar la transcripción de la GFP, sin embargo la expresión detectada fue significativamente menor, figura **15**.

Al comparar los niveles de expresión cuantificados en la evaluación de la funcionalidad de las fusiones transcripcionales en los cultivos en fase estacionaria se observó una reducción de la expresión de la GFP en las construcciones que incluyen longitudes mayores a los 150 bp, ver figura **16A**. Ésta misma reducción fue evidente cuando los cultivos fueron sometidos a una limitación de nutrientes o una reducción gradual de oxígeno, figura **16B** y **C**. Por otro lado, se observó poco cambio en la expresión de la GFP en la construcción pCA18-150 en estas tres últimas condiciones de cultivo.

Estos resultados hacen pensar que la PE_PGRS33 puede estar sujeta a un mecanismo de regulación que reprime la expresión de la misma en fase estacionaria y en condiciones pobres en nutrientes y oxígeno. Adicionalmente, es posible que en las construcciones pCA18-196 y pCA18-245 se esté adicionando al fragmento de 150 bp (pCA18-150) o complementando la secuencia operadora que es reconocida por el represor expresado durante la depleción de nutrientes y oxígeno, y en fase estacionaria.

8 Regulación de la PE_PGRS33.

8.1 Introducción.

Los resultados obtenidos al evaluar las fusiones transcripcionales (pCA18-196 y pCA18-245) en *M. smegmatis* mc² 155 bajo condiciones de cultivo limitadas en nutrientes y oxígeno así como en fase estacionaria presentan un comportamiento similar a lo mostrado por Dheenadhayalan *et al.* al medir la cantidad de mRNA de la PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* Erdman [42]. Por otro lado, lo publicado por Raman *et al.* muestra que al mutar el factor sigma D en *M. tuberculosis* H37Rv, cuya expresión se aumenta en el periodo inicial de la fase estacionaria; uno de los genes que aumenta la expresión en la mutante con respecto a la silvestre es el gen de la PE_PGRS33, lo que sugiere que al estar presente el factor sigma D se expresa un represor que bloquea la expresión de ésta PE_PGRS en fase estacionaria, donde la cantidad de nutrientes se reduce y la disponibilidad de oxígeno es menor a la requerida por la masa bacteriana, condiciones donde se induce la expresión del factor sigma D [20, 111].

Por lo anterior se planteo un experimento para medir la modificación en la cantidad de mRNA de la GFP expresada en la cepa de *M. smegmatis* mc² 155 transformada con la fusión transcripcional pCA18-245 en las condiciones de cultivo donde mostró una reducción la expresión de la GFP, así como la expresión de la PE_PGRS33 en una cepa de *M. tuberculosis* mutante en el factor sigma D y compararla con la expresión de la cepa silvestre en las mismas condiciones de cultivo.

8.2 Material y Métodos.

8.2.1 Diseño de oligonucleótidos para el ensayo de RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) y extracción de RNA total de las cepas de *M. smegmatis* mc² 155 y *M. tuberculosis* CDC 1551.

En primer lugar se diseñaron oligonucleótidos para detectar los mensajeros de la GFP de las fusiones transcripcionales pFPV27-Phsp60 y pCA18-245 evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155. Así como oligonucleótidos para detectar el mensajero del gen *rpoB* (*Msmeg1367*) de *M. smegmatis* mc² 155, ver tabla V. La cuantificación del mRNA de la GFP se realizó de muestras de RNA total extraído de las cepas antes mencionadas cultivadas en fase logarítmica y estacionaria, así como en condiciones carentes de nutrientes y oxígeno, siguiendo los procedimientos ya descritos en las secciones [7.2.2](#) y [6.2.1](#) para el cultivo y extracción de RNA total, respectivamente.

Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos para medir el mRNA de la PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* CDC1551 y su mutante en el factor sigma D, cepas amablemente donadas por el Dr. William Bishai del Center for Tuberculosis Research Dept. of Medicine, Div. of Infectious Diseases Johns Hopkins School of Medicine, descritas por Calamita *et al.* [20]. De igual manera se realizó un diseño de oligonucleótidos para detectar el mensajero del gen *rpoB* (*Rv0667*), incluidos en la tabla V. Ambas cepas fueron cultivadas en medio 7H9-ADC-Tween por 3 semanas a 37°C en agitación constante. La extracción del RNA total de estos cultivos se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección [6.2.1](#).

8.2.2 Ensayo qRT-PCR.

Para la síntesis del cDNA, se tomaron 250 ng de RNA total de cada una de las muestras de las cepas de *M. smegmatis* mc² 155 y *M. tuberculosis* CDC1551 y se mezclaron en un volumen final de 20 µl con los siguientes componentes:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		X µl
RNA total	Variable	cbp 250 ng
dNTP's	10 mM de cada uno	1 µl
Oligonucleótido antisentido*	100 pM	0.5 µl
Volumen final		14.5 µl

* Cada reacción de síntesis del cDNA incluyó por separado los oligonucleótidos: RV1818RTR, RPOBRTR, rpoBMsmR y GFP27R.

Esta mezcla se calentó a 65°C por 5 min para desnaturalizar el RNA total, inmediatamente después de este tratamiento la muestra fue trasladada al hielo por 2-3 min.

A la mezcla anterior se le adicionó:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Buffer de reacción	5X	4 µl
DTT	100 mM	1 µl
Transcriptasa reversa*	200 U/µl	0.5 µl
Volumen final		20 µl

* M-MVL DNA polimerasa dependiente de RNA (SuperScript II, Invitrogen).

Los reactivos se mezclaron en vortex, centrifugados para coleccionar el volumen total de la reacción e incubados por 30 min a 42°C para la síntesis del cDNA, después de este tiempo, la actividad de la transcriptasa reversa fue inactivada por 15 min a 70°C. Las muestras de cDNA se conservaron congeladas hasta su uso a -20°C.

Para cada una de los genes se realizó una curva de disociación; para ello una matriz de concentración de cada par de los oligonucleótidos respectivos fue utilizada para evaluar en la amplificación de cada uno de los cDNA de los genes en ambas cepas de micobacterias la temperatura de disociación de los productos de PCR. La matriz de concentración es la siguiente:

Concentración (nM)		Oligonucleótido sentido		
		900	300	50
Oligonucleótido antisentido	900	900/900	900/300	900/50
	300	300/900	300/300	300/50
	50	50/900	50/300	50/50

La reacción de amplificación se realizó en un volumen total de 25 µl, en los cuales se mezclaron los siguientes reactivos:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		5.6 µl
Oligonucleótido sentido	Variable**	0.5 µl
Oligonucleótido antisentido	Variable**	0.5 µl
Reacción de síntesis de cDNA	Diluida 1:100	5 µl
SYBR Green	5X***	0.9 µl
Master mix*		12.5 µl
Volumen final		25 µl

* AmpliTaq Gold® PCR Master Mix (Applied Biosystem).

** Concentración de acuerdo a cada una de las combinaciones de la matriz de concentración.

*** Cambrex Bio Science Rockland, Inc.

Después de haber establecido las concentraciones adecuadas de la mezcla de los oligonucleótidos, en donde se detecta un solo pico en la curva de disociación, para cada uno de los genes de ambas cepas, se realizó un análisis de la eficiencia de amplificación. Para ello se utilizaron 4 a 5 diluciones de cada una de las reacciones de síntesis de cDNA de los genes respectivos, estas diluciones fueron adicionadas a la mezcla de amplificación. Con las eficiencias establecidas cercanas al valor de 2 y muy similares entre los genes de la cepa respectiva, se procedió a la cuantificación de cada uno de los mensajeros. Los análisis de disociación y las eficiencias de amplificación fueron calculadas con el software incluido en el termociclador LigthCycler[®] 480 (Roche Applied Science) del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Nacional Autónoma de México.

Con el mismo equipo se determinó el valor del ciclo umbral (C_T , del inglés Threshold cycle) para cada una de las muestras. Y para cada una de ellas se calculó la expresión relativa mediante el método $\Delta\Delta C_T$, los valores de expresión se muestran en cada una de las gráficas como unidades de expresión relativa [4, 89, 92, 109].

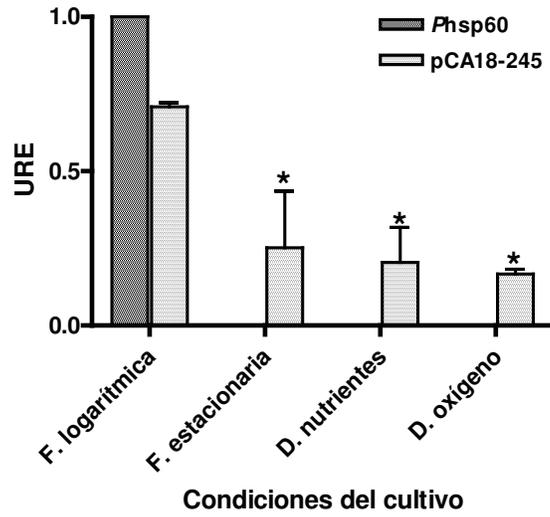
Tabla V: Oligonucleótidos empleados en el RT-PCR cuantitativo (qRT-PCR) del mRNA de la GFP de las fusiones transcripcionales y del mRNA de la PE_PGRS33.

Oligonucleótido*:	Secuencia (5'→3'):	Uso**:
RV1818RTF	ATGTCATTTGTGGTCACGA	qRT-PCR (54 bp)
RV1818RTR	CCAAATCGGTCGCCACC	qRT-PCR
RPOBRTF	CAGACGGTGTTCATGGGTGA	qRT-PCR (48 bp)
RPOBRTR	ACGTGCCCTTCTCGGTC	qRT-PCR
rpoBMsmF	CGAACGCTATCACCAATAACTCCG	qRT-PCR (117 bp)
rpoBMsmR	ACTCGAAGGAATCCGTCTGAAC	qRT-PCR
GFP27F	GATGGAAGCGTTCAACTAGCAGAC	qRT-PCR (94 bp)
GFP27R	GTGTGGACAGGTAATGGTTGTC	qRT-PCR

* Los oligonucleótidos fueron diseñados con el software en línea PrimerQuestSM (<http://www.idtdna.com/Scitools/Applications/Primerquest/>).

** Tamaño del amplicon indicado entre paréntesis.

A



B

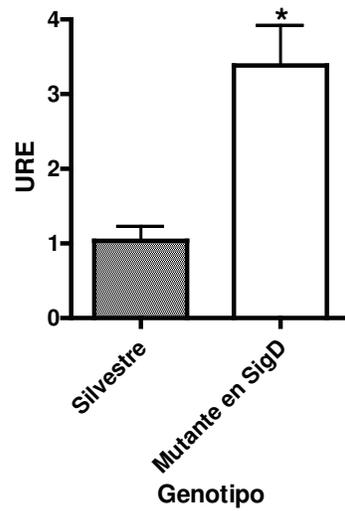


Figura 17: Expresión de la GFP en la fusión transcripcional pCA18-245 evaluada en *M. smegmatis* mc² 155 y expresión de la PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* CDC1551 y su mutante en *sigD*. A) Expresión relativa de la GFP en la fusión transcripcional pCA18-245 evaluada en cultivos de *M. smegmatis* mc² 155 en fase logarítmica, estacionaria, en depleción de nutrientes y oxígeno, calculada con el método $\Delta\Delta C_T$ en tres cultivos independientes. La cantidad del RNA total en las muestras fue normalizada con el mRNA del *rpoB* y la expresión en URE's (Unidades de Expresión Relativa; URE, del inglés Units of Relative Expression) se muestra con relación a la expresión de la GFP en las bacterias transformada con pFPV27-Phsp60 y cultivadas bajo las mismas condiciones. * Diferencia estadísticamente significativa con respecto a la expresión en fase logarítmica, (Análisis de varianza, $p < 0.05$, Bonferroni post-test). B) Expresión de la PE_PGRS33 en la mutante de *sigD* con respecto a *M. tuberculosis* CDC1551 silvestre a las 3 semanas de cultivo, calculada con el método $\Delta\Delta C_T$ en dos cultivos independientes. La cantidad del RNA total en las muestras fue normalizada con el mRNA del *rpoB* y la expresión se muestra con relación a la expresión de la PE_PGRS33 en las bacterias silvestres. * Diferencia estadísticamente significativa (*t*-test, $p < 0.05$).

8.3 Resultados.

Al comparar la expresión de la fusión transcripcional pFPV27-Phsp60 con la pCA18-245, ésta última muestra una expresión menor ($29 \pm 1\%$ menos expresión de la pCA18-245 con respecto a la pFPV27-Phsp60) en cultivos en fase logarítmica de *M. smegmatis* mc² 155. Cuando estos cultivos llegan a la fase estacionaria se muestra una reducción de la expresión de la GFP en la fusión transcripcional pCA18-245 ($73 \pm 16.5\%$ menos expresión) con respecto a la pFPV27-Phsp60 en la misma condición de cultivo, lo que corresponde una reducción de la expresión en promedio del 62% de la GFP de la pCA18-245 de cultivos en fase logarítmica al pasar a fase estacionaria, figura 17A.

Cuando se comparan los valores de expresión relativa de la GFP en la pCA18-245 al ser sometidos los cultivos de fase logarítmica a depleción de nutrientes y oxígeno, se observa una reducción en promedio del 71% y 76.7% en la cantidad del mensajero del gen reportero *gfp* respectivamente, figura 17A.

Por otro lado en *M. tuberculosis* CDC1551, cuando se compara la expresión de la PE_PGRS33 en cultivos de 3 semanas en la cepa que expresan el factor sigma D con respecto a la cepa mutante isogénica en el citado factor sigma, se observa una expresión 2.4 veces más grande en la mutante con relación a silvestre, es decir, cuando se encuentra el factor sigma D, la expresión de la PE_PGRS33 se reduce en un 70.6% en estas condiciones de cultivo (Fase estacionaria), figura 17B. Porcentaje de reducción de la expresión muy semejante a lo observado en la fusión transcripcional pCA18-245 evaluada en *M. smegmatis* mc² 155.

9 Identificación de los elementos de la secuencia promotora de la PE_PGRS33.

9.1 Introducción.

Con los resultados anteriores se demostró que la expresión de la PE_PGRS33 es modificada en respuesta a las condiciones de cultivos evaluadas, la regulación de esta expresión puede ser consecuencia de elementos en *cis* y en *trans* que afecten el nivel de transcripción del promotor. Algunos elementos en *cis* que pueden modificar la expresión de un gen son la presencia de más de un sitio diferente para el reconocimiento por su respectivo factor sigma (elementos en *trans*), en dicho caso los sitios de los inicios de la transcripción tienen posiciones diferentes. Para evaluar esta posibilidad en el promotor de la PE_PGRS33 se planteo realizar lo siguiente. En primer término para establecer la presencia de los elementos (cajas -10 y -35) que reconoce el factor sigma que media la transcripción de la PE_PGRS33 se debe conocer el extremo 5' del mRNA, adicionalmente la identificación del inicio de la transcripción permitirá establecer si existe un solo inicio aún cuando haya expresión diferencial de la PE_PGRS33 en respuesta a las condiciones ambientales a las que es sometida la micobacteria. Para identificar el inicio de la transcripción en algunas fusiones transcripcionales evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 así como en el mRNA de la PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv se realizó un ensayo de amplificación rápida del extremo 5' del cDNA (5'-RACE).

9.2 Material y métodos.

9.2.1 Ensayo de 5'-RACE.

Para la amplificación rápida del extremo 5' del cDNA del mRNA de las fusiones transcripcionales pCA18-150 y pCA18-245 ($P_{PE_PGRS33-gfp}$) y el mRNA de la

PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv se requirió en principio la síntesis del cDNA específico de una muestra de RNA total extraído en las condiciones de cultivo y con los métodos ya descritos (Ver secciones 6.2.1 y 7.2.2), con ligeras modificaciones.

Para la síntesis del cDNA de las fusiones transcripcionales se empleó un oligonucleótido diseñado para que se alineara después de 240 bp a partir del codón de inicio de la traducción del mRNA de la GFP (Ver tabla **VI**) y para el mRNA de la PE_PGRS33 se utilizó el oligonucleótido PERreverse (Ver tabla **III**). La reacción de síntesis del cDNA se realizó con los reactivos incluidos en el kit 5'3'RACE® (Roche) en un volumen final de 20 µl de una mezcla de:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		cbp 20 µl
Buffer de reacción	5X	4 µl
dNTP's	10 mM de cada uno	2 µl
Oligonucleótido GFPCDNA		
o PERreverse	12.5 pM	1 µl
RNA total	Variable	cbp 2.5 µg
Neo1/Rev		1 µl
RNA control		1 µl
Transcriptasa reversa		1 µl
Volumen final		20 µl

Los reactivos se mezclaron en vortex y se centrifugaron para colectar el volumen de la reacción. Para el inicio de la síntesis del cDNA las reacciones se incubaron por 60 min a 55°C, la reacción se paró por la inactivación de la enzima a 85°C por 5 min. Después de lo anterior la reacción se enfrió en hielo y se centrifugó para colectar el volumen total.

Posterior a la síntesis del cDNA, este se purificó (40 µl como volumen de elusión) (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen) y por medio de la enzima deoxinucleótido transferasa terminal se le adicionó un homopolímero de adeninas en el extremo 5' del cDNA, en una reacción de un volumen final de 25 µl, que incluyó:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
cDNA purificado		19 µl
Buffer de reacción	10X	2.5 µl
dATP	2 mM	2.5 µl
Volumen de la mezcla		24 µl

Esta mezcla inicial se incubó por 3 min a 94°C, se colocó a enfriar en hielo por 5 min y se le adicionó 1 µl (80 U/µl) de la enzima deoxinucleótido transferasa terminal incluida en el kit 5´/3´RACE® (Roche).

La reacción se incubó por 30 min a 37°C, la actividad de la enzima se eliminó por calentamiento a 70°C por 10 min.

De cada una de las reacciones se tomaron 4 µl para las amplificaciones por PCR del producto del cDNA del control (293 bp) y de los cDNA´s de los mRNA de la GFP de las fusiones transcripcionales y el mRNA de la PE_PGRS33, la reacción de amplificación contenía:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		38.25 µl
Buffer de reacción	10X	5 µl
dNTP´s	10 mM de cada uno	0.25 µl
Oligonucleótido Oligo d(T)-anchor	100 pM	1 µl
Oligonucleótido RV1818R o NEOR2	100 pM	1 µl
cDNA		4 µl
Taq DNA polimerasa*		0.5 µl
Volumen final		50 µl

* Incluida en el kit 5´/3´RACE® (Roche).

La amplificación se realizó por 40 ciclos en un termociclador Mastercycler® ep gradient (Eppendorf), con la siguiente rampa de temperatura:

Pasos	Amplificación:				Extensión final:
	Desnaturalización inicial:	Desnaturalización:	Alineamiento:	Extensión:	
Temperatura	94°C	94°C	60°C	72°C	72°C
Tiempo	2 min	30 s	25 s	30 s	5 min

Los productos de la PCR de los cDNA's de las fusiones transcripcionales y del mRNA de la PE_PGRS33 junto con el control incluido en el kit (5'3'RACE®, Roche) fueron visualizados en una electroforesis en gel de agarosa-TAE al 1.5% teñidos con Bromuro de etidio (0.33 mg/ml) (Ver figura 18A).

En algunos casos las reacciones fueron reamplificadas con la siguiente mezcla de reactivos y la misma rampa de temperatura:

Reactivo:	Concentración:	Volumen:
Agua tratada con DEPC		38.25 µl
Buffer de reacción	10X	5 µl
dNTP's	10 mM de cada uno.	0.25 µl
Oligonucleótido PCR-anchor	100 pM	1 µl
Oligonucleótido RV1818R	100 pM	1 µl
cDNA		4 µl
Taq DNA polimerasa		0.5 µl
Volumen final		50 µl

9.2.2 Secuenciación de los productos de PCR obtenidos en el ensayo de 5'-RACE.

Los productos de PCR de los distintos cDNA fueron purificados (QIAquick PCR Purification kit, Qiagen), digeridos con la enzima de restricción *Sall* (Fermentas) y ligados al vector pUC18 [105] previamente digerido (*EcoRV-Sall*, Fermentas) y purificado de un gel de agarosa-TAE (QIAquick Gel Extraction kit, Qiagen). Las reacciones de ligación se emplearon para transformar la cepa de *E. coli* TOP10 por choque de calor (Ver anexo 7.2.1b), las colonias seleccionadas durante toda la noche a

37°C, en placas de medio LB con 100 µg/ml de Car y X-gal se amplificaron en 5 ml de medio LB con 100 µg/ml de Car durante toda la noche a 37°C con agitación constante.

A los cultivos expandidos les fue extraído el plásmido y a estos últimos se les realizó un mapa de restricción para liberar (*SmaI-SallI*, Fermentas) el fragmento ligado. Las construcciones que incluyeran el posible fragmento de interés fueron sometidas a secuenciación automática en la Unidad de Síntesis y Secuenciación del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, con los oligonucleótidos universales m13 (m13/pUC -40 FOR: GTTTTCCCAGTCACGTTGTA y m13/pUC REV: TTGTGAGCGGATAACAATTTTC).

De las secuencias obtenidas (2-4 clonas secuenciadas por reacción de cDNA), se alinearon y con la identificación del homopolímero de adeninas adicionado por la desoxinucleótido transferasa terminal en el extremo 5' de los mRNA's se pudo localizar el nucleótido inicial (Ver figura **18B**). El consenso de estas secuencias se alineó a la secuencia corriente arriba del codón de inicio de la traducción de la PE_PGRS33 a fin de identificar y comparar las cajas -10 y -35 del promotor del gen de la PE_PGRS33 con las cajas ya descritas en otros promotores de *M. tuberculosis*.

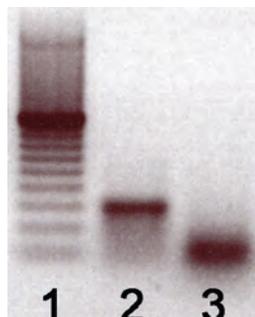
Tabla VI: Oligonucleótidos empleados en el ensayo de amplificación rápida del extremo 5' del cDNA (5'-RACE) del mRNA de la PE_PGRS33.

Oligonucleótido*:	Secuencia (5'→3')**:	Uso:
PEReverse	TAGGATCCCTAGTTGGCTCCGTTACCGAT	Síntesis de cDNA
GFPCDNA	CATGGCACTCTTGAAAAAGTCATGC	Síntesis de cDNA
Oligo d(T)-anchor	GACCACGCGTATCGAT <u>GTCGAC</u> TTTTTTTTTTTTTTTTTV	PCR
PCR anchor	GACCACGCGTATCGAT <u>GTCGAC</u>	PCR
RV1818R	TATGTGATATCTGGCACCTCGTCAACAC	PCR

* Los oligonucleótidos Oligo d(T)-anchor y PCR anchor son parte del kit 5'/3'RACE® (Roche).

** En las secuencias de los oligonucleótidos Oligo d(T)-anchor y PCR anchor se muestran en negritas y subrayadas la secuencia correspondiente al sitio de reconocimiento de la enzima de restricción *Sall*.

A



B

```

1.- 5´RACE 245 : TcTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
2.- 5´RACE 150 : TTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
3.- 5´RACE 245E : TTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
4.- 5´RACE 245N : TTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
5.- 5´RACE 245O : TTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
6.- 5´RACE Mtb : TTTTTTTTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64

Consenso      : TtTTTTTTtTTGTCGATCTCTGGGGAGTGACCAGGCGATCGGTAGCGGCCCCGCGCCGGGGCCAC : 64
    
```

Figura 18: Ensayo de amplificación rápida del extremo 5´ del cDNA con RNA total de *M. smegmatis* mc² 155 y *M. tuberculosis*. A) Ejemplo de las electroforesis en gel de agarosa-TAE de los productos de PCR obtenidos en el ensayo 5´-RACE: Carril 1, marcador de peso molecular 100 bp DNA Step Ladder (Promega); Carril 2, producto de PCR del control incluido en el kit 5´/3´RACE® (Roche), con un tamaño esperado de 293 bp y Carril 3, producto de PCR del cDNA sintetizado con RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv en el ensayo de 5´-RACE. B) Alineamiento de las secuencias consenso obtenidas de los diferentes plasmidos secuenciados en los que se clonó el producto de PCR de los ensayos de 5´-RACE realizado con muestras de RNA total de cultivos en fase logarítmica de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las fusiones transcripcionales pCA18-245 y pCA18-150 (1 y 2), en fase estacionaria (3), depleción de nutrientes (4) y oxígeno (5) sólo con la pCA18-245 y con RNA total de *M. tuberculosis* H37Rv extraído de un cultivo en fase logarítmica (6). Se muestra el consenso final que en todas las secuencias obtenidas se conserva el mismo sitio de inicio de la transcripción (Negritas).

9.3 Resultados.

Con la secuencia de los productos de PCR obtenidos de los cDNA de las fusiones transcripcionales pCA18-150 y pCA18-246 evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 en fase logarítmica se encontró que ambas fusiones producen una mRNA con un único sitio de inicio de transcripción (Figura **18B**, líneas 1 y 2). Al comparar el consenso de estas secuencias con las obtenidas del mRNA de la PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv, se encontró que tanto en el mRNA de las fusiones como el mRNA de la PE_PGRS33 poseen el mismo sitio de inicio de la transcripción (Figura **18B**, línea 6).

Para establecer si este mismo inicio de transcripción se conservaba aún cuando la expresión del PE_PGRS33 se reducía en condiciones limitadas de oxígeno y nutrientes, así como en fase estacionaria se realizó un 5'-RACE a muestras de RNA total extraído de cultivos de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con la fusión transcripcional pCA18-246 sometido a las condiciones antes descritas. Los resultados en este ensayo muestran que en las tres condiciones los mensajeros de la GPF conservan su mismo inicio de transcripción, igual al encontrado en cultivos en fase logarítmica (Figura **18B**, líneas 3, 4 y 5).

Con estos resultados se muestra que el inicio de la transcripción de las fusiones transcripcionales evaluadas en las diferentes condiciones de cultivo de *M. smegmatis* mc² 155 conservan su único sitio de inicio de la transcripción y que es el mismo que se observa en el mRNA de la PE_PGRS33 de *M. tuberculosis* H37Rv. Con los datos anteriores fue posible localizar las cajas -10 y -35 del promotor de la PE_PGRS33 al alinear la secuencia corriente arriba del codón de inicio de la traducción de la PE_PGRS33 con el consenso de las secuencias obtenidas en los ensayos de 5'-RACE y secuencias de promotores ya descritos (Figura **19**) [63, 65, 66]. Se encontró que las cajas del promotor de la PE_PGRS33 concuerdan con promotores reconocidos por el

factor sigma A, y de acuerdo a la clasificación propuesta por Smith *et al.* es del tipo B, puesto que la caja -35 no posee un consenso bien definido [63, 65, 66].

10 Ensayo de transcripción *in vitro*.

10.1 Introducción.

Los resultados de los ensayos de 5'-RACE mostraron un solo inicio de la transcripción del mRNA de la PE_PGRS33 mediado probablemente por el factor sigma A, factor sigma principal de las micobacterias [64, 114, 144]. Para establecer con certeza si el factor sigma A es capaz de reconocer esta secuencia promotora y mediar la transcripción, se montó una modificación del ensayo de transcripción *in vitro* con el core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv y el factor sigma A, ensayo previamente descrito por Jacques *et al.* [78].

10.2 Material y métodos.

10.2.1 Producción de las proteínas del core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv.

La producción del core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv se realizó con los plásmidos amablemente donados por el Dr. Sébastien Rodrigue del Centre de Recherche sur les mécanismes du fonctionnement cellulaire, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canadá [78]. Los plásmidos con las secuencias codificantes para las subunidades α (pSR52), β (pJF09) y β' (pJF10) de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv se expandieron en la cepa de manipulación TOP10 en medio LB adicionado con los antibióticos respectivos (Figura 20 y Tabla VII). A cada uno de los plásmidos se les realizó un análisis de restricción para corroborar su identidad con las enzimas de restricción anotadas en la tabla VII junto con los fragmentos esperados para cada caso.

Estos mismos plásmidos se emplearon para transformar las cepas de expresión BL21 (DE3) pLysS (pSR52) y Rosetta (DE3) (pJF09 y pJF10), previamente preparadas para

competencia química por Calcio (Ver anexo 7.2.1b). De las placas de Petri se tomaron dos colonias seleccionadas en medio LB adicionado con el antibiótico respectivo (Tabla VII) durante toda la noche a 37°C para ser expandidas en 5 ml de medio LB con el antibiótico correspondiente durante toda la noche a 37°C en agitación constante. Estos cultivos se diluyeron 1:100 en 50 ml de medio LB con el antibiótico indicado, los cultivos se incubaron por 10 h a 37°C en agitación constante. A cada uno de los cultivos se les realizó una lectura de la densidad óptica al inicio de la incubación y a cada hora durante todo el periodo de cultivo, los datos de las lecturas para cada una de las tres cepas se graficaron (Figura 21).

Con la cinética de crecimiento ya establecida se decidió realizar la inducción de la expresión de las proteínas recombinantes correspondientes a las subunidades de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv con una concentración final de 250 µM de IPTG (Research Organics) para un volumen de cultivo de 400 ml (BL21 (DE3) pLysS:pSR52) o 200 ml (Rosetta (DE3):pJF09 y Rosetta (DE3):pJF10) con un tiempo de crecimiento de 4 h para las cepas BL21 (DE3) pLysS:pSR52 y Rosetta (DE3)pJF10 y de 5 h para la cepa Rosetta (DE3):pJF09 después de haber sido inoculados con una dilución de 1:100 de un precultivo de toda la noche (Como se indica en la figura 21A).

Después de un tiempo de inducción de 5 h para las tres cepas, la masa bacteriana fue cosechada por centrifugación a 6,000 x g por 15 min a 4°C. A la pastilla bacteriana obtenida se le retiró lo más posible el medio de cultivo y esta fue pesada (Peso húmedo) y congelada (-80°C) hasta su procesamiento.

10.2.2 Purificación de la subunidad α del core de la RNA polimerasa.

La pastilla bacteriana almacenada (1.16 g de peso húmedo) de la cepa BL21 (DE3) pLysS:pSR52 se descongeló, posteriormente se resuspendió en 8 ml de buffer de lisis (50 mM Tris-HCl pH 8.0, 1 mM EDTA y 50 mM NaCl) y se le adicionó Lisozima (Roche) a una concentración final de 300 μ g/ml, la suspensión bacteriana se incubó en agitación constante por 30 min a 16°C.

Después de la incubación se le adicionó el detergente Tritón X-100 (Sigma) hasta tener una concentración final de 1%, posteriormente la suspensión bacteriana se sonicó por 2 min (2 ciclos de 1 min de sonicado por 2 min de descanso) a una frecuencia de 20 kHz y una potencia de 95 Watts (Virsonic), manteniendo el tubo en hielo para evitar el calentamiento excesivo.

El sonicado se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4 °C, el sobrenadante obtenido se retiró y se colocó en un tubo nuevo (La pastilla de la porción insoluble fue tratada como sí correspondiera a cuerpos de inclusión, ver anexo 10.2.2a). La subunidad α se precipitó del sobrenadante con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ hasta alcanzar una concentración del 60% (peso/volumen), adicionándolo de manera paulatina en agitación constante y manteniendo fría la solución en hielo. Después de permanecer por 30 min en agitación y en hielo, la solución se centrifugó a 12,000 x g por 15 min a 4°C. Con la centrifugación se formaron dos precipitados; uno en la superficie de la solución (Precipitado 1) y otro colectado en la pared del tubo (Precitado 2), ambos fueron colectados por separado y resuspendidos en el buffer A con Urea (20 mM Tris-HCl, pH 7.9, 500 mM NaCl, 5 mM Imidazol y 8 mM Urea). Alícuotas de estos sobrenadantes juntos con los de las anteriores fracciones se separaron en una electroforesis en gel de poli-acrilamida al 12% y electrotransferidas a membranas PVDF (Figura 22A). Una vez identificada la fracción

donde se localizó la mayor proporción de la proteína recombinante, esta se utilizó para purificar por afinidad a metales la subunidad α recombinante de acuerdo al protocolo del anexo 10.2.2b.

Las alícuotas de las fracciones colectadas del proceso de purificación se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Figura 22B). Las fracciones donde se encontró la proteína recombinante se mezclaron, una pequeña muestra se dializó contra agua y se cuantificó por el método de Lowry (Ver anexo 7.2.2c).

La proteína purificada se mantuvo en refrigeración (4°C) hasta su uso.

10.2.3 Procesamiento de los cuerpos de inclusión de las subunidades β y β' del core de la RNA polimerasa.

Las pastillas de las bacterias inducidas para la expresión de las subunidades β y β' del core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv se resuspendieron en el buffer de lisis: 4 ml (Rosetta DE3:pJF09; 0.53 g de peso húmedo) y 4 ml (Rosetta DE3:pJF10; 0.58 g de peso húmedo). Las suspensiones bacterianas se procesaron para la obtención de los cuerpos de inclusión de acuerdo al protocolo del anexo 10.2.2a. Los cuerpos de inclusión obtenidos se solubilizaron en el buffer B con Urea (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 10 mM MgCl₂, 10 mM ZnCl₂, 1 mM EDTA, 10 mM DTT, 8 M Urea y 10% Glicerol).

Cada una de las fracciones obtenidas se resolvieron en SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Figura 23A). Alícuotas de cada uno de los cuerpos de inclusión solubilizados se dializaron contra agua y se cuantificaron por el método de Lowry (Ver anexo 7.2.2c). Las fracciones con las proteínas recombinantes se almacenaron en refrigeración (4°C) hasta su uso.

10.2.4 Plegamiento y purificación del core de la RNA polimerasa.

Para el plegamiento de las subunidades α , β y β' del core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv y la formación del complejo ($2\alpha\beta\beta'$), una mezcla suponiendo una relación molar (2:1:1) de cada una de las subunidades (20, 10 y 10 nmoles de cada una, esto es: 804.6 μg , de la subunidad α ; 1,294.5 μg , de la subunidad β y 1468.7 μg , de la subunidad β') se dializó en un volumen de 10 ml contra los buffers C con concentraciones decrecientes de Urea, de acuerdo al siguiente protocolo:

Buffers de diálisis*:	Volumen:	Tiempo:
Buffer C4	150 ml	6-8 h
Buffer C2	150 ml	6-8 h
Buffer C1	150 ml	6-8 h
Buffer C0.5	150 ml	6-8 h
Buffer C0.25	150 ml	6-8 h
Buffer C0.125	150 ml	6-8 h
Buffer C	150 ml	6-8 h
Buffer C	150 ml	6-8 h

* Para composición de los buffers ver anexo 10.2.4a.

El complejo formado se purificó por afinidad a metales con el protocolo descrito en el anexo 10.2.4b. Cada una de las fracciones obtenidas se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Figura 23B), la fracción con el complejo (3 ml) se dializó contra el buffer Buffer C para retirar el Imidazol y una pequeña muestra contra agua para su cuantificación por Lowry (anexo 7.2.2c), el core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv se almacenó en alícuotas de 500 μl a -80°C hasta su uso.

10.2.5 Producción de los factores sigma A y D de la holoenzima RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv.

Junto con los plásmidos de expresión para las subunidades del core de la RNA polimerasa fueron también donados por el Dr. Sébastien Rodrigue los plásmidos de expresión con las secuencias codificantes para los factores sigma A y D (Figura 24).

Estos plásmidos también se expandieron en la cepa de manipulación TOP10, se les realizó un mapa de restricción para establecer su identidad con las enzimas de restricción indicadas en la tabla VIII junto con el tamaño de los fragmentos esperados.

Los plásmidos se emplearon para transformar la cepa de expresión BL21 (DE3) pLysS. A ambas cepas (BL21 (DE3) pLysS:pSR01 y BL21 (DE3) pLysS:pSR28) se les realizó una cinética de crecimiento como se describe en la sección 10.2.1.

Una vez establecida la cinética de crecimiento (Figura 25), 100 ml de cultivo con un periodo de 3 h y media de crecimiento de cada una de las cepas fueron inducidos durante 5 h con una concentración final de 250 μ M de IPTG.

Las bacterias inducidas para la expresión de las proteínas recombinantes se cosecharon por centrifugación a 6,000 x g por 15 min a 4°C. A las pastillas bacterianas se les determinó el peso húmedo después de haber drenado completamente el medio de cultivo y se almacenaron en congelación (-80°C) hasta su procesamiento.

10.2.6 Purificación de los factores sigma A y D recombinantes de *M. tuberculosis*.

Para su procesamiento las pastillas de las bacterias inducidas para la expresión de las proteínas recombinantes se descongelaron (0.265 g de la BL21 (DE3) pLysS:pSR01 y 0.29 g de la BL21 (DE3) pLysS:pSR28) y se resuspendieron en 4 ml de bufer de lisis, una vez resuspendidas se procesaron para la obtención de los cuerpos de inclusión de

las proteínas recombinantes de acuerdo al protocolo descrito en el anexo 10.2.2a. Los cuerpos de inclusión se solubilizaron en el buffer C con Urea (50 mM Tris-HCl, pH 7.9, 200 mM KCl, 10 mM ZnSO₄, 1 mM EDTA, 5 mM 2-Mercaptoethanol, 8 M Urea y 20% Glicerol). Cada una de las fracciones obtenidas se resolvieron mediante SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Figura 26).

Los cuerpos de inclusión de cada una de las proteínas recombinantes ya solubilizados en el buffer C con 8 M de Urea se sometieron a purificación por afinidad a metales de acuerdo al protocolo descrito en el anexo 10.2.6. Las distintas fracciones obtenidas en el proceso de purificación se resolvieron por SDS-PAGE y se transfirieron a membranas PVDF (Figura 27).

Las fracciones que contenían cada uno de los factores sigma purificados se mezclaron respectivamente, una pequeña muestra se dializó contra agua y se cuantificó por el método de Lowry (anexo 7.2.2c). Las proteínas recombinantes purificadas se almacenaron hasta su plegado a 4°C.

10.2.7 Plegado y almacenado de los factores sigma A y D de la holoenzima RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis*.

Aproximadamente 40 nmol de cada uno de los factores sigma (2,539 µg del factor sigma A y 1,145 µg del factor sigma D, purificados) se sometieron a diálisis en un volumen de 10 ml, contra el mismo buffer C con cantidades decrecientes de Urea y sin Imidazol, de acuerdo al siguiente protocolo:

Buffers de diálisis*:	Volumen:	Tiempo:
Buffer C4	150 ml	6-8 h
Buffer C2	150 ml	6-8 h
Buffer C1	150 ml	6-8 h
Buffer C0.5	150 ml	6-8 h
Buffer C0.25	150 ml	6-8 h
Buffer C0.125	150 ml	6-8 h
Buffer C	150 ml	6-8 h
Buffer C	150 ml	6-8 h

* Para composición de los buffers ver anexo 10.2.4a.

Una vez plegados los factores sigma, se concentraron por microfiltración (1/5 del volumen inicial en unidades de filtración Amicon Ultra-15 Ultracel 5k, Millipore), y finalmente se almacenaron a -80°C hasta su uso en el ensayo de transcripción *in vitro* junto con el core RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv.

10.2.8 Ensayo de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv.

Para el ensayo de transcripción *in vitro* se mezclaron junto con el producto de PCR de 245 bp purificado de un gel de agarosa-TAE (Ver figura 13B, carril 5) (QIAquick Gel extraction kit, Qiagen) en un volumen de 36 µl los siguientes reactivos:

Componente:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	45 mM
MgCl ₂	5 mM
KCl	75 mM
DTT	10 mM
BSA	250 µg/ml
Core de la RNA polimerasa	22.5 pmoles
Factor sigma	3 pmoles
Glicerol	13%
Volumen total	36 µl

La mezcla anterior se incubó por 30 min a 37°C, para el inicio de la reacción de síntesis del mRNA *in vitro* se le adicionó a la mezcla anterior 4 µl de una solución 0.15 mM de cada uno de los rNTP's (Ambion). La reacción se dejó incubando por 30 min a 37°C.

Después de la incubación, a la reacción se le adicionó 2 µl de una solución con 100 mg/ml de Glicógeno. De ésta solución se extrajo el posible RNA generado *in vitro* con 250 µl del reactivo de Trizol® (Invitrogen), siguiendo lo descrito en la sección 6.2.1 para la extracción del RNA, adecuando los volúmenes de trabajo.

Para establecer la generación de un transcrito *in vitro*, se realizó la síntesis de un cDNA con el iniciador RV1818R (Para la secuencia del oligonucleótido ver tabla IV) marcado con Biotina y purificado de un gel desnaturante de poli-acrilamida (Ver anexo 10.2.8a). Para la síntesis de este cDNA se mezclaron los siguientes reactivos, junto con un volumen de 12 µl en el que se resuspendió la extracción del mRNA generado en la reacción de transcripción *in vitro*:

Componente:	Concentración:	Volumen adicionado:
Oligonucleótido RV1818RB	2 pmoles	1 µl
dNTP's	10 mM c/u	1 µl
Volumen total		14 µl

La mezcla se calentó a 65°C por 5 minutos y se incubó en hielo por 2-5 minutos. Se colectó el volumen total de la mezcla por centrifugación y se le adicionó:

Componente:	Concentración:	Volumen adicionado:
Buffer de reacción	5X	4 µl
DTT	0.1 M	1 µl
Transcriptasa reversa *	200 U/ml	1 µl

* M-MVL DNA polimerasa dependiente de RNA (SuperScript II, Invitrogen).

Los reactivos adicionados se mezclaron con la micropipeta y se incubó la reacción a 55°C durante 30 min, la actividad enzimática se inactivó por calentamiento de la reacción durante 15 minutos a 70°C.

Finalmente, a la reacción se le adicionó buffer de carga 2X (95% Formamida, 0.025% Xylene cyanol, 0.025% Azul de bromofenol, 18 mM EDTA y 0.025% SDS) para la electroforesis y se calentó por 2 minutos a 94°C, la muestra se colocó en hielo por 5 min y se cargó en un gel desnaturalizante de poli-acrilamida al 10% (Ver anexo 10.2.8b).

Después de la electroforesis en buffer TBE 1X, el cDNA se electrotransfirió a una membrana de Nylon (Hybond-N+, Amersham Pharmacia Biotech) en buffer TBE 0.5X a 200 mA por 30 min. Una vez transferido el cDNA se fijó a la membrana de Nylon por exposición a luz Ultra violeta en un transiluminador por 5 min.

Para la detección del cDNA marcado con Biotina en la superficie de la membrana se empleó los reactivos del kit de detección BrightStar™ BioDetect™ (Ambion) siguiendo los pasos descritos en el anexo 10.2.8c.

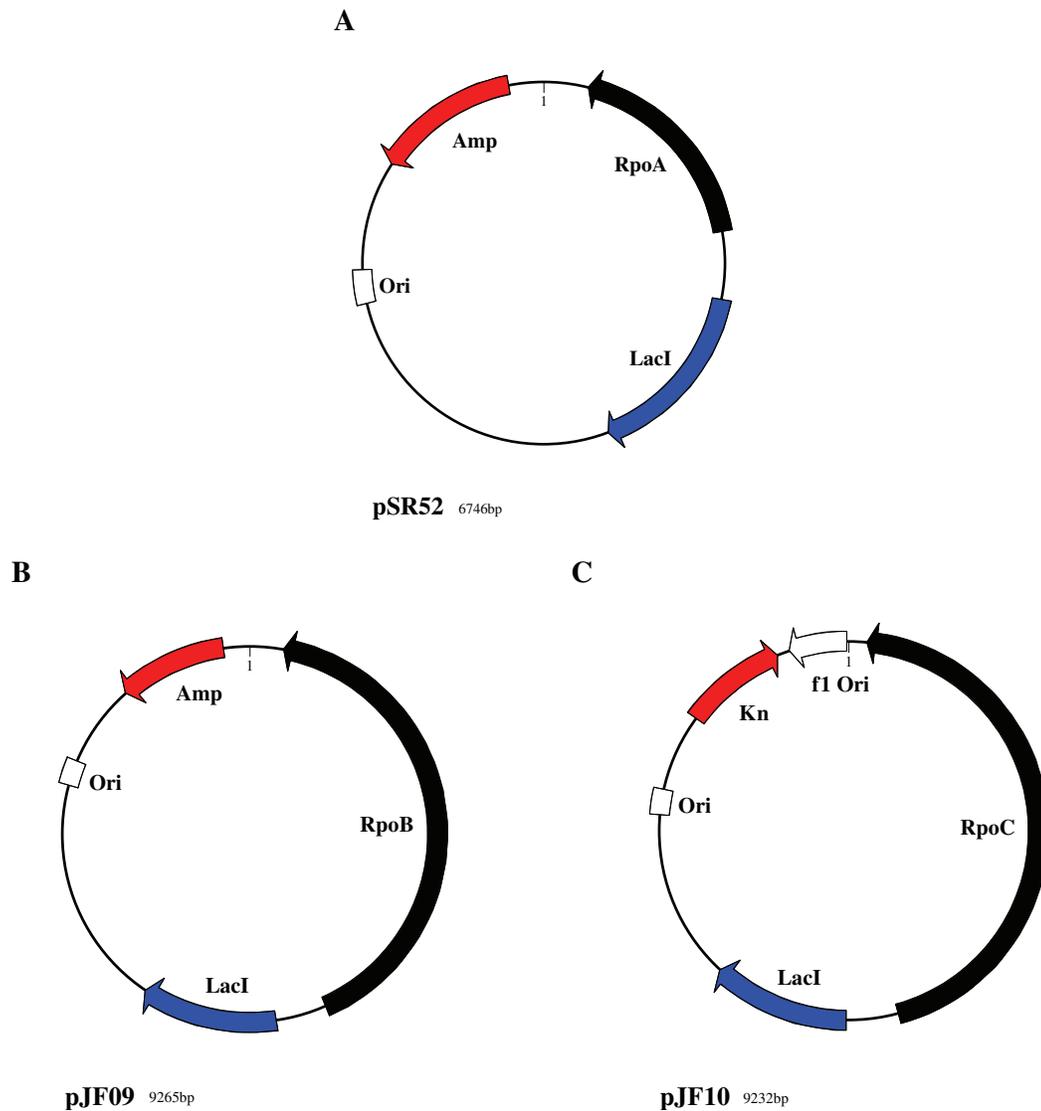
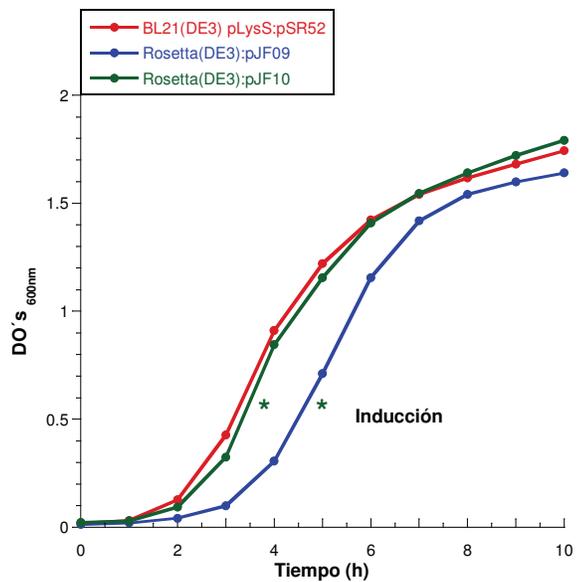


Figura 20: Vectores de expresión procariontes que contienen las secuencias codificantes de los genes *rpoA*, *rpoB* y *rpoC* de *M. tuberculosis* H37Rv. A) Vector de expresión pSR52 (Subunidad α) derivado del vector pET16b que contiene la secuencia codificante del gen *rpoA*. B) Vector de expresión pJF09 (Subunidad β) derivado del vector pET16b que contiene la secuencia codificante del gen *rpoB*. C). Vector de expresión pJF10 (Subunidad β') derivado del vector pET30a que contiene la secuencia codificante del gen *rpoC*.

Tabla VII: Características de los vectores para la expresión de las proteínas recombinantes que integran el core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv.

Vector:	Gen (Subunidad):	Marcador de selección:	Enzimas de restricción:
pSR52	<i>rpoA</i> (α)	Ampicilina	<i>EcoRI</i> 5565, 768, 413 bp
pJF09	<i>rpoB</i> (β)	Ampicilina	<i>XhoI</i> 6909, 2256 bp
pJF10	<i>rpoC</i> (β')	Kanamicina	<i>XhoI</i> 5691, 2712, 829 bp

A



B

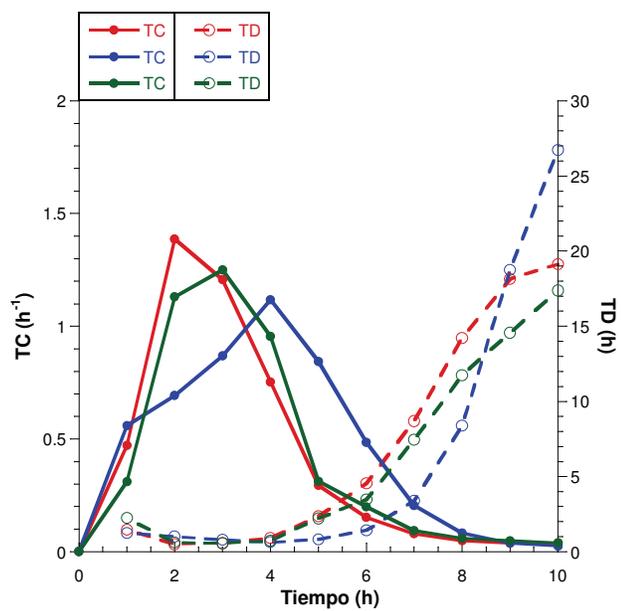


Figura 21: Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS:pSR52, Rosetta (DE3):pJF09 y Rosetta (DE3):pJF10. **A)** Gráfica de las lecturas de las densidades ópticas a 600 nm tomadas cada hora de los cultivos de las cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS:pSR52 (—●—), Rosetta (DE3):pJF09 (—●—) y Rosetta (DE3):pJF10 (—●—) en medio de cultivo LB con los antibióticos respectivos (Ver tabla VII). Los cultivos se iniciaron con la inoculación de 50 ml medio nuevo con una dilución de 1:100 de un precultivo de una colonia en 5 ml del mismo medio incubado durante toda la noche a 37°C con agitación constante. Se indica con un asterisco los tiempos de cultivo considerados para la inducción de la expresión de la proteína respectiva (BL21 (DE3) pLysS:pSR52 y Rosetta (DE3):pJF09 4 h de cultivo, y Rosetta (DE3):pJF09 5 h de cultivo). **B)** Gráfica de los datos de tasa de crecimiento específico (TC) y tiempo de duplicación (TD) calculados para cada una de las lecturas de densidad óptica de la curva de crecimiento.

Tasa de crecimiento:

$$TC = \frac{\ln(DO_1/DO_2)}{(T_1-T_2)}.$$

Donde:

Ln = Logaritmo natural.

DO = Densidad óptica a 600 nm.

T = Tiempo en horas.

Tiempo de duplicación:

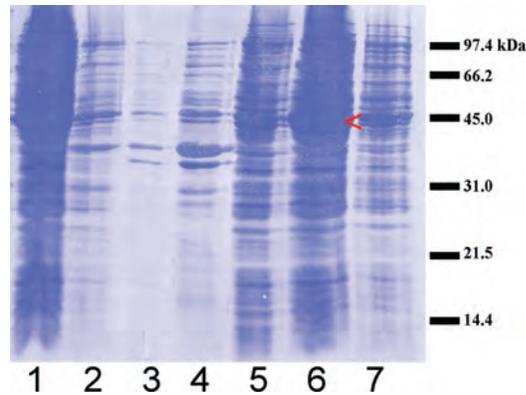
$$TD = \frac{\ln 2}{TC}$$

Donde:

Ln2 = Logaritmo natural de 2.

TC = Tasa de crecimiento específico.

A



B

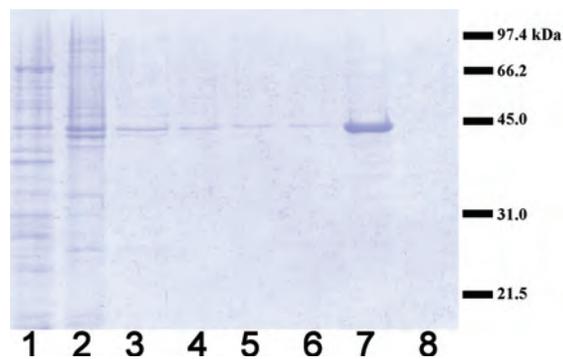
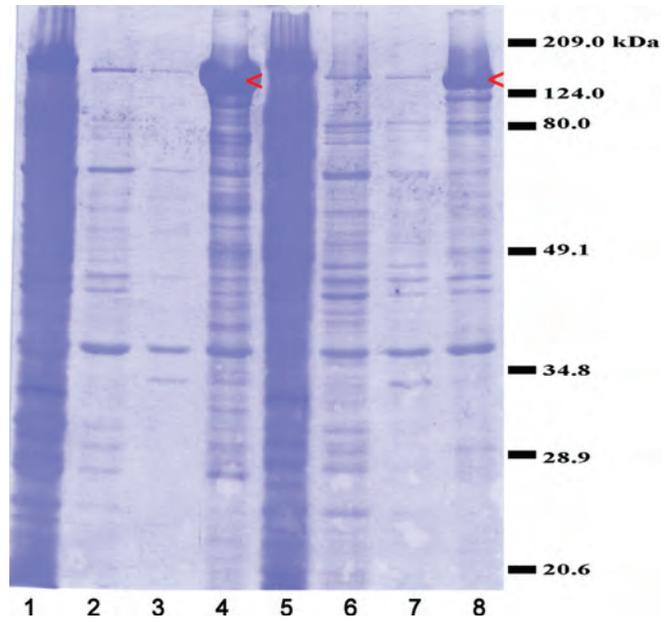


Figura 22: Fraccionamiento de las células bacterianas inducidas y purificación por afinidad a metales de la subunidad α de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv. A) Fraccionamiento del cultivo inducido para la expresión de la subunidad α : Carril 1, sonicado total; Carril 2 y 3, lavados de la fracción insoluble; Carril 4, fracción insoluble; Carril 5 y 6, fracciones 1 y 2 precipitadas con 60% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ de la fracción soluble del sonicado (Se indica con una flecha la proteína) y Carril 7, fracción soluble después del proceso de precipitación. **B)** Fracciones obtenidas en el proceso de purificación por afinidad a metales: Carril 1, proteínas no pegadas; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, lavados 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; Carril 6, proteína eluida y Carril 8, fracción del lavado de la columna. Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars Low range (BioRad).

A



B

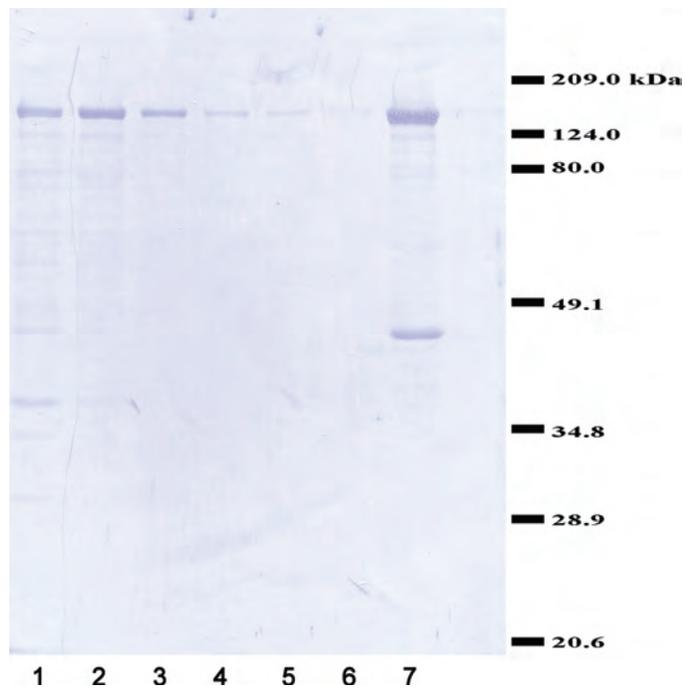
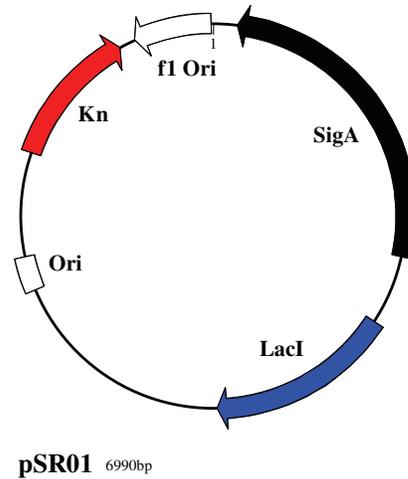


Figura 23: Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de las subunidades β y β' y purificación del core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv. A) Ruptura de las células bacterianas inducida para la expresión subunidades β y β' de la RNA polimerasa y recuperación de los cuerpos de inclusión: Carril 1, fracción soluble; Carril 2 y 3, lavados 1 y 2 de los cuerpos de inclusión; Carril 4, cuerpos de inclusión recuperados de la subunidad β ; Carril 5, fracción soluble; Carril 6 y 7, lavados 1 y 2 de los cuerpos de inclusión y Carril 8, cuerpos de inclusión recuperados de la subunidad β' . B) Fracciones obtenidas en el proceso de purificación por afinidad a metales después del proceso plegado de la mezcla de las subunidades α , β y β' que integran el core de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis*: Carril 1, proteínas no pegadas; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, lavados 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; Carril 6, proteínas eluidas. Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars Broad range (BioRad).

A



B

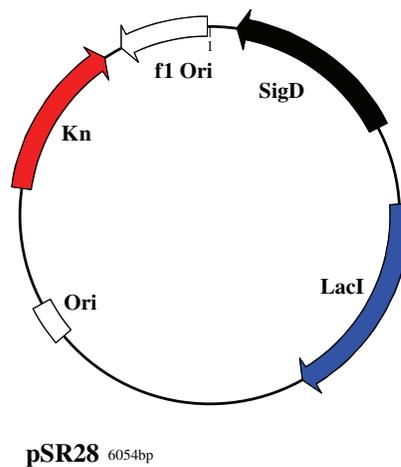
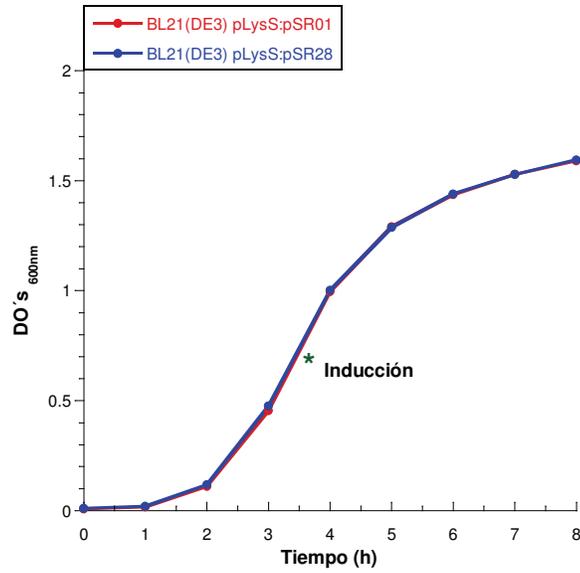


Figura 24: Vectores de expresión procariontes que contienen las secuencias codificantes de los genes *sigA* y *sigD* de *M. tuberculosis* H37Rv. **A)** Vector de expresión pSR01 derivado del vector pET30a que contiene la secuencia codificante del gen *sigA*. **B)** Vector de expresión pSR28 derivado del vector pET30a que contiene la secuencia codificante del gen *sigD*.

Tabla VIII: Características de los vectores para la expresión de los factores sigma A y D recombinantes que integran la holoenzima de la RNA polimerasa de *M. tuberculosis* H37Rv.

Vector:	Gen (Factor sigma):	Marcador de selección:	Enzimas de restricción:
pJF10	<i>sigA</i> (SigA)	Kanamicina	<i>XhoI</i> 5835, 1155 bp
pSR28	<i>sigD</i> (SigD)	Kanamicina	<i>SmaI</i> 4189, 1869 bp

A



B

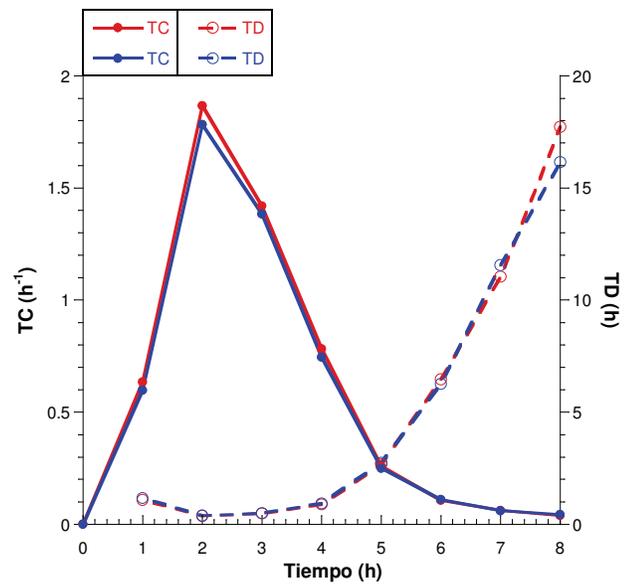


Figura 25: Cinética de crecimiento de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS:pSR01 y BL21 (DE3) pLysS:pSR28. **A)** Gráfica de las lecturas de las densidades ópticas a 600 nm tomadas cada hora de los cultivos de las cepas de expresión de *E. coli* BL21 (DE3) pLysS:pSR01 (—●—) y BL21 (DE3) pLysS:pSR28 (—●—) en medio de cultivo LB con 50 µg/ml de Kn (Ver tabla **VIII**). Los cultivos se iniciaron con la inoculación de 50 ml medio nuevo con una dilución de 1:100 de un precultivo de una colonia en 5 ml del mismo medio incubado durante toda la noche a 37°C con agitación constante. Se indica con un asterisco el tiempo en el que se adicionó (3.5 h) el inductor en cada uno de los cultivos para la inducción de la expresión de la proteína respectiva. **B)** Gráfica de los datos de tasa de crecimiento específico (TC) y tiempo de duplicación (TD) calculados para cada una de las lecturas de densidad óptica de la curva de crecimiento.

Tasa de crecimiento:

$$TC = \ln(DO_1/DO_2)/(T_1-T_2).$$

Donde:

Ln = Logaritmo natural.

DO = Densidad óptica a 600 nm.

T = Tiempo en horas.

Tiempo de duplicación:

$$TD = \ln 2/TC$$

Donde:

Ln2 = Logaritmo natural de 2.

TC = Tasa de crecimiento específico.

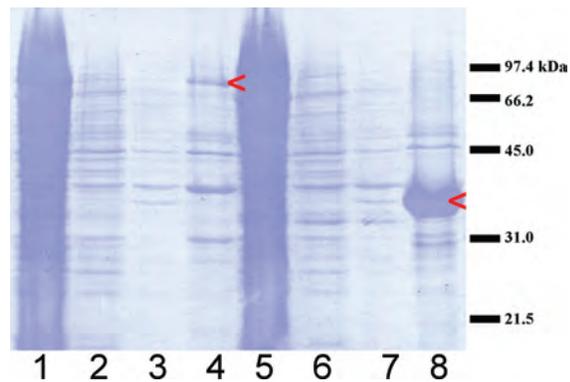
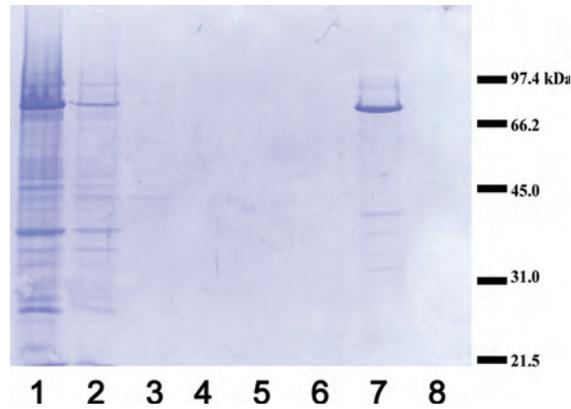


Figura 26: Fraccionamiento de las células inducidas para la expresión de los factores sigma A y D de *M. tuberculosis* H37Rv. Ruptura de las células bacterianas inducidas para la expresión de los factores sigma A y D, y recuperación de los cuerpos de inclusión: Carril 1, fracción soluble; Carril 2 y 3, lavados 1 y 2 de los cuerpos de inclusión; Carril 4, cuerpos de inclusión recuperados del factor sigma A; Carril 5, fracción soluble; Carril 6 y 7, lavados 1 y 2 de los cuerpos de inclusión y Carril 8, cuerpos de inclusión recuperados del factor sigma D. Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars Low range (BioRad).

A



B

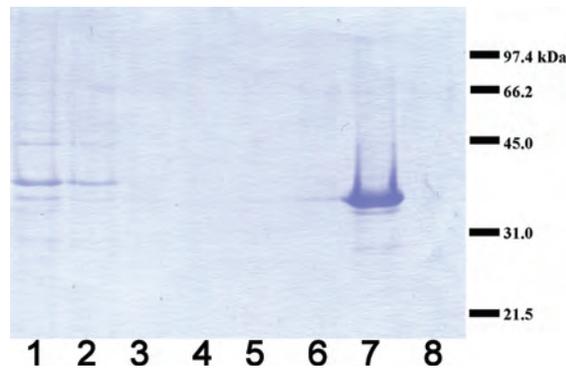


Figura 27: Purificación de los factores sigma A y D de *M. tuberculosis* H37Rv por afinidad a metales. A) Fracciones obtenidas en el proceso de purificación del factor sigma A de *M. tuberculosis* por afinidad a metales: Carril 1, proteínas no pegadas; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, lavados 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; Carril 6, proteína eluida y Carril 8, fracción del lavado de la columna. B) Fracciones obtenidas en el proceso de purificación del factor sigma D por afinidad a metales: Carril 1, proteínas no pegadas; Carril 2, 3, 4, 5 y 6, lavados 1, 2, 3, 4 y 5 respectivamente; Carril 6, proteína eluida y Carril 8, fracción del lavado de la columna. Marcador de peso molecular SDS-PAGE Standars Low range (BioRad).

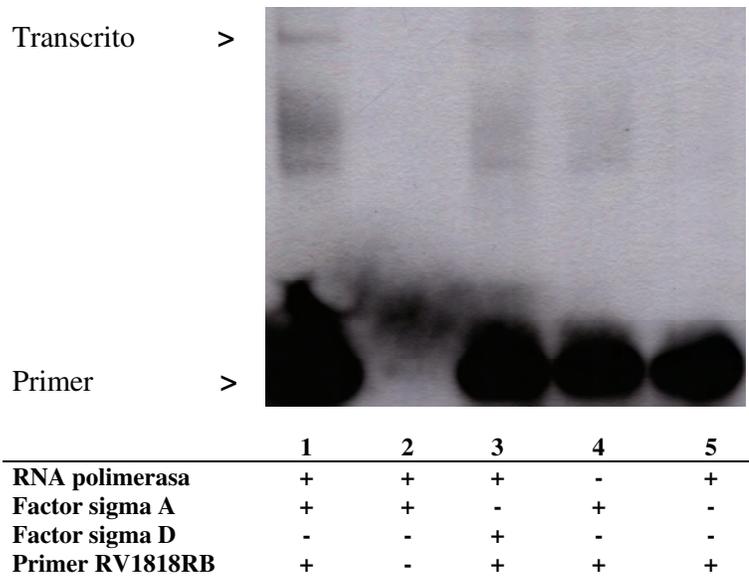


Figura 28: Ensayo de transcripción *in vitro* con la RNA polimerasa recombinante de *M tuberculosis H37Rv*. En el Carril 1 se muestra la generación de un transcrito marcado con Biotina cuando en la reacción se incluyó el core de la RNA polimerasa y el factor sigma A, el Carril 2 el mismo ensayo sin la adición del oligonucleótido en la reacción de síntesis del cDNA, el Carril 3 en el ensayo se sustituyó el factor sigma A por el factor sigma D, el carril 4 no se adicionó el core de la RNA polimerasa y en el Carril 5 no se adicionó ninguno de los factores sigma.

10.3 Resultados.

En el ensayo se logró detectar la formación de un transcrito *in vitro* únicamente en la reacción donde se incluyó junto con el core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv el factor sigma A recombinante de la misma bacteria (Figura 28). Cuando en el ensayo para la síntesis del cDNA no se incluyó el oligonucleótido marcado con Biotina no se detecta el transcrito formado en la reacción. Cuando en la reacción de transcripción se sustituye el factor sigma A por el factor sigma D sólo se detecta un pequeño barrido de fondo, pero no una banda definida. Finalmente cuando en la mezcla de reacción se omite el factor sigma A o el core de la RNA polimerasa no se detecta la formación del transcrito. Estos resultados confirman el reconocimiento de la secuencia promotora de la PE_PGRS33 por el factor sigma A, el cual es capaz de generar un transcrito *in vitro*.

11 Localización de otras posibles secuencias promotoras en las secuencias corriente arriba de otros genes *pe_pgrs* de *M. tuberculosis* H37Rv.

11.1 Introducción.

Como se ha demostrado a nivel de mRNA, la mayoría de los genes *pe_pgrs* se encuentran expresados y esta expresión puede ser modificada en respuesta a diversas condiciones ambientales a la que ha sido sometido *M. tuberculosis* en los ensayos de transcriptómica (Ver tabla II). Con los resultados experimentales hasta ahora aquí descritos se sugiere que la expresión de la PE_PGRS33 está mediada por el factor sigma A, factor sigma principal de las micobacterias [63, 64, 114, 144] y que la reducción de la expresión de la GFP en las fusiones transcripcionales evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 bajo ambientes pobres en oxígeno y nutrientes, así como en fase estacionaria cuando se clonan secuencias promotoras mayores a 150 bp puede hacer que se complemente o adicione una región operadora que es reconocida por un represor expresado cuando está presente el factor sigma D, factor sigma que es expresado en fases iniciales de la fase estacionaria y en condiciones pobres de nutrientes [12, 20]. Por otro lado, estos datos hacen pensar que existe la posibilidad que en los otros genes *pe_pgrs* se modifique su expresión al incluir junto con el promotor activado por el factor sigma A secuencias operadoras o secuencias que recluten activadores transcripcionales inducidos en respuesta a las condiciones ambientales.

Por lo anteriormente comentado se realizó un análisis de las secuencias intergénicas a fin de localizar alguna secuencia con cierta homología a los elementos del promotor de la PE_PGRS33.

11.2 Material y métodos.

Se realizó un análisis de la región de cada una de las secuencias corriente arriba de cada uno de los ORF's anotados como PE_PGRS's en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv [21, 28], así como la orientación de los ORF's corriente arriba.

Trescientos bp de la secuencia corriente arriba del codón de inicio de la traducción anotado en los ORF's de las PE_PGRS's fue obtenido de la base de datos Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/TuberculoList>). Las secuencias corriente arriba de las PE_PGRS13, 36, 37, 49, 56 y 61 no se consideraron en el análisis puesto que sus regiones corriente arriba se traslapan con el ORF vecino, que en la mayoría de los casos es otro PE_PGRS; excepto en el caso de la PE_PGRS36 el cual es la PE21 y en la PE_PGRS37 es un gen diferente a un *pe_pgrs*. Una inspección detallada del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv y otros miembros del complejo *M. tuberculosis* [19, 21, 28, 53, 59] mostró que el ortólogo del *pe_pgrs13* se encuentra anotado como un solo gen junto con el *pe_pgrs12* en *M. bovis* BCG Pasteur, mientras que en *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* AF2122/97 están separados. En *M. tuberculosis* el *pe_pgrs36* y el *pe21* están anotados como dos genes, pero en *M. bovis* AF2122/97 y *M. bovis* BCG Pasteur como sólo uno. El *pe_pgrs49* y *pe_pgrs50* forman un solo gen en *M. bovis* BCG Pasteur y de manera similar en *M. bovis* AF2122/97 son un sólo gen los *pe_pgrs55* y *pe_pgrs56* anotados en *M. tuberculosis* H37Rv. Finalmente, los *pe_pgrs60* y *pe_pgrs61* están anotados como dos genes en los genomas secuenciados de las micobacterias miembros del complejo *M. tuberculosis* y el *pe_pgrs37* es considerado un pseudogen. En las regiones corriente arriba seleccionadas (300 bp) de las PE_PGRS se realizó una búsqueda de la presencia de secuencias con homología a los elementos del promotor identificado de la PE_PGRS33.

En las secuencias donde se encontró un consenso con la primera, segunda y última posición conservadas de la posible caja -10 con respecto a este mismo elemento (**TACGCT**) del promotor de la PE_PGRS33 fueron alineadas en compañía de 20 bp corriente abajo y 44 bp corriente arriba de esta secuencia (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>). Adicionalmente, un consenso del alineamiento de estas secuencias fue obtenido con el software Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

Región 5' corriente arriba

Gen	Tamaño de la región (bp)	Gen	Secuencias alineadas
Rv0108c	278	PE_PGRS1	---AGCCGAATCCCCGCAATTGGCGCA---ACGTGCCCGGAAGCCGCGCT TACATT TGGCTCCTAGCAGCTTGCCC-----28-ATG
<i>mgo</i>	207	PE_PGRS48	---AAGACAATTACCCCGAAGCCACACA---ATGTGCGTCCCTGGCCGCCAT TAGAAT CCGCACTATCCGCCAGTCC-----21-ATG
PE_PGRS20	362	Rv1069c	---GGAAAGATTTGTCGAAACACTC-TGC--ATTTCCGTTCCGGGC-GTGCT TAGACT CGCGCCATCAGTTGACTCC-----42-ATG
Rv3651	754	PE_PGRS60	---CGAGGACTTTTGGGAAACCACGC--ACATGCTTCCCGGATAGCGAT TAAGCT GCGCTCCAGCAGATTGTCCG-----53-ATG
PE_PGRS25	255	Rv1397c	-----ACGTTTCTATAACATTACCAATGATGGCTATATCACCTGCGCT TATGCT -GCACGATCACGACAAGTCG-----30-ATG
tRNA ^{Phe}	665	PE_PGRS12	----TAGGGCAACCCTCGTATTCCCGG--ATGTTGGCGGCCCGACGGGAT TACTACT GCTTCTGCTGATTCTCTCC-----64-ATG
PE_PGRS46	29	Rv2635	---TACGCGCCGGCGCCAAATGGCCTC---CGCGTCTGCGAGGCGGGAT TAGGAT TTGTTGCTGCCAGTGTCTCG-----46-ATG
PE_PGRS9	399	<u>PE_PGRS10</u>	---CCTGCGAAACGTGTGGAAGCGCTGC-ATGCGGTGCC-GGATCG-CGAT TATCGT TGATTTCT-GCAATTAATTCC-----62-ATG
<i>fadD17</i>	171	PE_PGRS53	---GGAATAATCGGGTAGAACCGCCGA-ATGAGCTGCCCGGATCG-CGAT TACGAT CCATTCTAGCAATTGCACC-----51-ATG
Rv0123	309	PE_PGRS2	---GCGACAATTTTGGCGAAAAGGCCGT-GTGCGGTGCC-GGGTCG-CGCT TACGTT CAGATTACCTAACAATGTC-----56-ATG
Rv1086	177	PE_PGRS21	---GATCTGCCCAGGTGAAACCCTGTG-TTTGGGATCCTGGATAG-CGAT TACCAT CGACTGATCCATGCGGGACA-----29-ATG
<i>celA2b</i>	415	PE_PGRS22	---ATTCTGTCCATGGGAAACCGGGTT-GATGGTGGCGCGTCAG-CGAT TACGAT CTGTGCACCCCTGACGACATG-----29-ATG
PE_PGRS58	111	Rv3591c	---CGAAAAGCCTGGCCATAACCGGTTT-TGTCG-GCCCGTGATCG-CGCT TACGAT CGGGCCGTCAGGCCGCGCCG-----15-ATG
PE_PGRS29	242	<i>ctpD</i>	---GGGTGCGTTACCCCGAAAACCGGTGA-AGCGGCCGCTG-GATCG-CGAT TAAGAT TACGTCGGTCGCTAGCTCTTC-----16-ATG
PE_PGRS33	135	Rv1819c	---GGGACGAGCTTCCCAAATCGGCGT-GGCCGCTTCCGTGATCG-CGAT TACGCT GAAATCC G TCGATCTCTGGGG-----61-ATG
PE_PGRS34	163	Rv1841c	---CTGATCAGTTGGCCGAAACCGCCGA-CGTGG-TGGCGGGA-CGTCAAT TACGCT GTAACCGCTGGGACTGCGCA-----23-ATG
Rv3387	190	PE_PGRS52	---GGGGCCCTGCGCGCAACACCAGA-CGTGA-TGCCGTGATCGCGGAT TACCCT TCGACCCATTGAAGGGAGAA-----5-ATG
Wag22	576	Rv1760	---GTATGAGTCG-GGCTGGAACACCGG-TTGGGTGCGCTGCCCGC-CCAT TACGCT GATTG-GCACCGATTACCCG-----62-ATG
Rv2740	232	PE_PGRS47	---TGCGAAGTGTGGCGCAACCGCAA-ATGCATCGCTCGGCCG-CTAT TACGAT CCCCATGCACAGTCTTGAGG-----56-ATG

Región 5' corriente arriba *

Continuación

Gen	Tamaño de la región (bp)	Gen	Secuencias alineadas
PE_PGRS53	291	<u>PE_PGRS54</u>	----GGTGCGGT- <u>ACTGAAA</u> CGTAGACGTGTTGGGCGGTGACGAA TAA-GAT CCTGGCCTAACTACTGCGTC-----43-ATG
Rv3510c	360	PE_PGRS55	-----TGGTACTCACGAGAAAGCTTGGACGTATTGGGCGGTGCTGAAT TATGAT CCCACACAACATGCATCAAT-----45-ATG
<i>fadD18</i>	46	PE_PGRS57	----TGGGCGATT-ACCAGAAAGCCGGCACATATTAGATGAGTGGCAAC TAA-GGT TCTCACTTAAAGATGCCGCC-----47-ATG
PE_PGRS7	322	Rv579	---GATAGTTCGTTCCGCTAAAGTTTG--GGTTTTGCCCTTTTGACGAT TAGCGT CAAC-AAGGGATCGTTGGAGT----101-ATG
Rv1767	181	PE_PGRS31	---TGGTAGGTCACGCG- <u>GAA</u> TGCGGG--GCGTGTGGCGCGATGGCGAT TAGCCT TTGCCGAGGGTTCAATGGTG-----41-ATG
PE_PGRS39	499	tRNA ^{Asn}	---CAGTAGG-CATGCCTGAAATGCTGGG--ATGTTCTCGTGCATCGCGAT TAGGAT TCGCGGTGACAACCGCGGTC-----50-ATG
<i>spoU</i>	367	PE_PGRS51	----AATGAATCTGCCGCAAACCCACG--CCCGTTGGCCATATTGCGCT TAGCAT CCGGGTGTTGTGATCTCGCA-----33-ATG
PE_PGRS4	291	<i>ppe3</i>	----GGAGATATTTGGGAAATACCAAA--TCCCTTCCCGGGCCGGAGT TATTCT GTAGCCCGCCGATTTTGCT-----56-ATG
Rv2395	724	PE_PGRS41	----GGCGGTGATCTGGGAAAGCCTGGA--TGTCGTTCCCGGAGTCGCT TATAGT CAACTGCGCCGATGGGTCAA-----62-ATG
Rv1982	412	PE_PGRS35	----GCGGTAGTACTGAAAATCCGAGATGTCAAAGGCAGCGTCT-GGAT TAGCCT GTATGCGCGCAGGGATGGTG-----19-ATG
Rv0531	147	PE_PGRS6	-----TGGCTGATCGTGGCGATTCCCTCGGCCGCGATTGGCGGCTCC TAACGT TGGCTGCACCGGGTGTGGGT-----16-ATG
PE_PGRS14	468	<i>lpqQ</i>	---TTGACGAGTGTCAACTTCGTCTCCCGTAGGCGCTATATGCGCG TATCGT TAACGATGGGCGACAGTCAGA-----27-ATG
Rv3811	154	PE_PGRS62	-----CATTCTGGCTGCGGAAATCGCCGGCGCATAGACACCCTGTGCCAT TAGGCT CCATTGCCGGGCTGATCAC-----34-ATG
PE_PGRS63	119	Rv3898c	----TTGGGAATTCGCGCAAACCTGGCAC--GTGACTACTCGGCGTGGGCA TAACT CCGGCTACTCGGCGATCGGT-----46-ATG
PE_PGRS24	152	<i>glgB</i>	-----CACACTGCACTCCGAGATTGATCAGAAAGGCTAAGCGATAGCGCT TACCCT GTGCTAACTCGAGCTGGATA-----28-ATG
PE_PGRS30	194	<i>argC</i>	-----TCCGCGAAAACGTGCGTTTTCCCTCACATGACATAAGACCAAC TAGGCT GAAATTTCCCGTACACATGT-33-ATG
<u>PE_PGRS19</u>	333	PE_PGRS20	---CCAGACAATGGCGGAAACCGCCCGAGTTGCGGTGTGCGCTAGT TAACAT CGCAACTACATATCAGCAA-----16-ATG
PE_PGRS32	181	Rv1804c	----GCGTGAATCTGGTGAATGCACCC-CATAGCGGGTCCGAAAAC TAGCCT TGGCGTCCGTTCCAAAATTT-----47-ATG
PE_PGRS38	210	<i>pbpB</i>	----AAGCTCTTTAAGGAAAGTGCGA-CATCCTGTTTTAGATTGTTAT TAGGAT CGAAAGCCCTGCCGACGGTG-----50-ATG

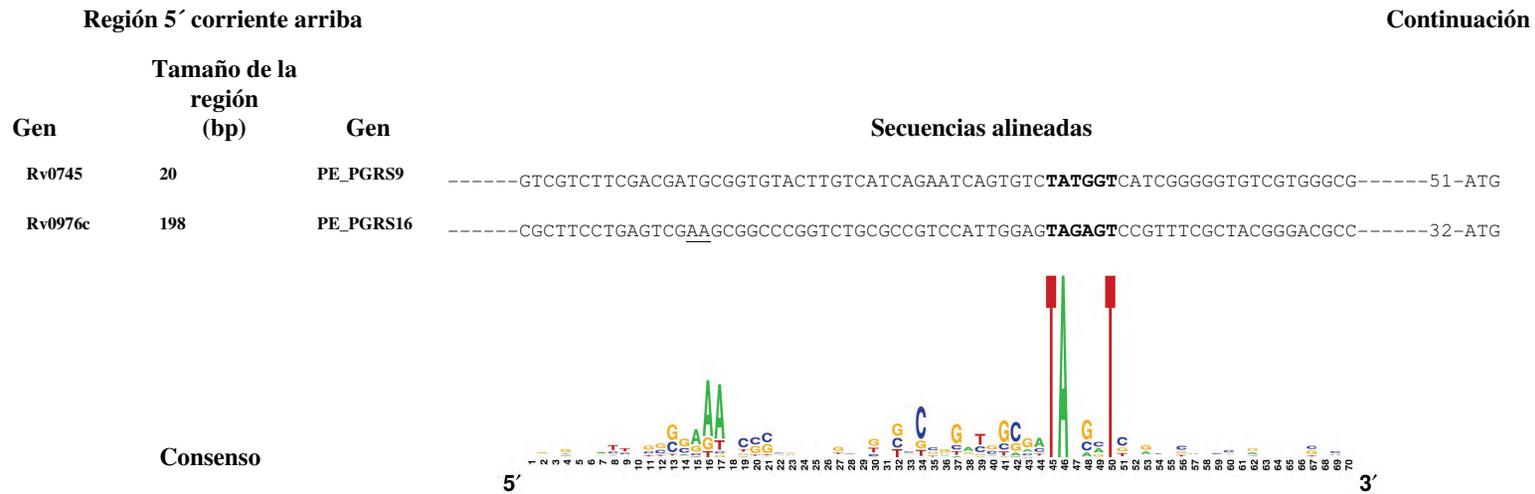


Figura 29: Alineamiento de las secuencias intergénicas 5' corriente arriba los genes *pe_pgrs* de *M. tuberculosis* H37Rv. Alineamiento de las secuencias 5' de los genes *pe_pgrs* que contienen un hexamero (En negritas) con homología con la caja -10 del promotor de la PE_PGRS33. En el alineamiento sólo se incluyeron las secuencias que muestran conservado la primera, segunda y última posición del hexamero (TA---T). En la mayoría de las secuencias se localizó una región rica en adeninas (Subrayadas) ubicada en la región aledaña a la posible localización de la caja -35. La secuencia promotora de la PE_PGRS33 está incluida en el alineamiento, en negritas e itálicas se muestra el nucleótido +1 del mRNA. La secuencia consenso fue obtenida con el software libre Weblogo (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>).

* El nombre del gen subrayado corresponde a la secuencia 5' corriente arriba alineada.

11.3 Resultados.

La longitud de las secuencias intergénicas corriente arriba de los ORF's de las PE_PGRS's anotados en el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv varia de 20 a 754 bp, con un promedio de 283.5 bp. Un análisis de una región corriente arriba (300 bp) del codón de inicio anotado de las PE_PGRS's permitió identificar en 39 de estas secuencias la presencia de una posible caja -10, con la primera, segunda y última posición conservada (**TACGCT**) con relación al mismo elemento del promotor de la PE_PGRS33, como se muestra en el alineamiento de 70 bp de cada una de éstas secuencias (Figura 29). Adicional al hexamero -10 mostrado en éstas 39 secuencias cuando se obtuvo un consenso de las mismas se encontró una pequeña región rica en adeninas localizada ± 28 nt corriente arriba del -10 en la mayoría de las secuencias alineadas (Ver figura 29).

12 Discusión.

“Seamos, pues, diligentes en investigar, pero muy mesurados en definir.”

James Balmes, Consideraciones generales sobre el modo de conocer la naturaleza, propiedad y relaciones de los seres. pp 99. en [6].

“Percibir con claridad, exactitud y viveza; juzgar con verdad; discurrir con rigor y solidez: he aquí tres dotes de un pensador;...”

James Balmes, La buena percepción. pp 107. en [6].

Para el entendimiento de la relación entre *M. tuberculosis* y su hospedero durante el proceso patogénico es esencial conocer como se regula la expresión de los genes que contribuyen en la virulencia de este microorganismo. Uno de los miembros de la subfamilia PE_PGRS parte de la familia multigénica PE, la PE_PGRS33 ha sido asociada con procesos de invasión, se le ha definido como un importante antígeno por su capacidad de inducir una fuerte respuesta inmune mediada por linfocitos T. Por otro lado, es capaz de inducir muerte celular por apoptosis y necrosis en células eucariontes [11, 39, 41, 50]. Adicionalmente, algunos estudios han relacionado el amplio polimorfismo presente en este gen con las distintas manifestaciones de tuberculosis pulmonar [132].

Si bien es cierto que muchos efectos biológicos le han sido atribuidos a la PE_PGRS33, es nulo el conocimiento que se tiene acerca de la secuencia que media la expresión de este gen. En este trabajo, en primer lugar se encontró que el mensajero transcrito del *pe_pgrs33* es monocistónico, a pesar que el ORF de la PE_PGRS33 se encuentra en la misma orientación corriente abajo del *Rv1819c*, este resultado contrasta con lo descrito para algunos miembros de la subfamilia PE que se encuentran incluidos en operones con genes miembros de la familia PPE. La cotranscripción de ambos genes se ha

demostrado permite la interacción de los productos de la traducción de los mensajeros respectivos, dicha interacción contribuye a la estabilidad de éstas proteínas [112, 131].

Al analizar la funcionalidad de la secuencia 5' corriente arriba del ORF de la PE_PGRS33 se encontró que un fragmento de 150 bp es capaz de mediar la transcripción de la GFP en la fusión transcripcional evaluada en *M. smegmatis* mc² 155; por otro lado, cuando a ésta secuencia se le adiciona 46 o 95 bp se observa una reducción en la expresión de la GFP cuando los cultivos de *M. smegmatis* mc² 155 transformado con las fusiones transcripcionales respectivas (pCA18-196 y pCA18-245) están en fase estacionaria o cuando se les somete a una reducción de oxígeno y nutrientes. Ésta observación sugiere que cuando se le suman secuencias a los 150 bp de la región promotora de la PE_PGRS33 se puede completar o adicionar una secuencia operadora la cual puede ser reconocida por una proteína represora; lo cual concuerda con la reducción observada del mRNA de la PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* Erman, cuando esta bacteria reside dentro de los macrófagos o es expuesta a ambientes pobres de nutrientes y oxígeno [42].

Algo importante a señalar es la expresión basal observada en la fusión transcripcional con 69 bp de la región promotora (pCA18-69), una posible explicación es la adición de un RBS que hace más eficiente la traducción del mRNA de la GFP expresado en cantidades basales como ha sido observado con el vector pFPV27 carente de inserto [71].

Por otro lado, en ensayos con el empleo de microarreglos se encontró que algunos genes *pe_pgrs* se encontraban sobre-expresados en una cepa mutante de *M. tuberculosis* H37Rv en el factor sigma D con respecto a la silvestre, uno de estos genes *pe_pgrs* fue el *pe_pgrs33* [111]. Esta observación fue confirmada en este trabajo, con el empleo de un ensayo de qRT-PCR con RNA total de cultivos de *M. tuberculosis* CDC1551 y su

mutante isogénica en el factor sigma D. A las 3 semanas de cultivo en medio Middlebrook 7H9-ADC-Tween se encontró una reducción del 70.6% en la cantidad del mRNA de la PE_PGRS33 en la cepa silvestre con respecto a la mutante en el factor sigma D, este porcentaje de reducción cuando está el factor sigma D es semejante al encontrado al medir la cantidad del mRNA de la GFP presente en *M. smegmatis* mc² 155 transformado con la fusión transcripcional pC18-245 cuando los cultivos en fase logarítmica se les disminuyen los nutrientes (71% de reducción en la cantidad de mRNA) y el oxígeno (76.7%) o se les permite llegar a la fase estacionaria (62%).

El factor sigma D se ha demostrado en algunos estudios que incrementa su expresión en la fase estacionaria de crecimiento, así como en condiciones pobres en nutrientes, sin embargo, su expresión se encuentra disminuida en ambientes pobres en oxígeno [12, 20, 138]. La represión de la expresión del gen *pe_pgrs33* en fase estacionaria y en condiciones pobres de nutrientes puede ser explicado por el incremento en la expresión de factor sigma D, el cual puede mediar directa o indirectamente la expresión de una proteína represora; la reducción de la expresión del *pe_pgrs33* en condiciones limitantes de oxígeno no puede ser explicada satisfactoriamente puesto que en este ambiente la expresión el factor sigma D decrece considerablemente [138].

La identificación del inicio de transcripción en las dos fusiones transcripcionales del promotor del *pe_pgrs33* (pCA18-150 y pCA18-245) evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 así como en el mRNA de la PE_PGRS33 en *M. tuberculosis* H37Rv muestran que el sitio de inicio de la transcripción es el mismo en ambas especies de micobacterias. La especificidad en el reconocimiento por parte de la maquinaria de transcripción del promotor del *pe_pgrs33* parece estar conservada en estas especies como ha sido señalado por Bashyam *et al.* para otros promotores descritos [10].

Al comparar la secuencia 5' corriente arriba del sitio de inicio de transcrito de la PE_PGRS33 con otras secuencias de promotores ya descritos se encontró un hexamero conservado (Caja -10) localizado 7 nucleótidos corriente arriba del inicio de transcripción identificado. Al igual que como ya se ha descrito para otros promotores de micobacterias, no se logró identificar una secuencia con homología a la caja -35 corriente arriba de la caja -10 en la secuencia promotora del *pe_pgrs33* [10, 63]. Bashyam *et al.* señala que la heterogeneidad de las cajas -35 de los promotores de micobacterianos puede ser explicado por el alto número de factores sigmas presente en los genomas del género *Mycobacterium* con diferente o especificidades traslapadas para la caja -35 [10]. Por otro lado, la maquinaria de transcripción micobacteriana puede soportar variaciones importantes en la secuencia de la caja -35 en los promotores, incluso estos pueden carecer de dicha secuencia. Esto tiene influencia en la frecuencia con la que la maquinaria de transcripción reconoce la secuencia promotora y media la transcripción del gen, por tanto en la fuerza del promotor.

Con las características descritas de la secuencia promotora del *pe_pgrs33* se le puede considerar un promotor del tipo B y puede ser reconocido por el factor sigma A [63]. Esta hipótesis fue confirmada en un ensayo de transcripción *in vitro* montado con algunas modificaciones del ensayo desarrollado por Jacques *et al.* [78]. El factor sigma A es considerado el factor sigma principal y por tanto esencial en las micobacterias, su expresión se considera constante a lo largo de toda la cinética de crecimiento y no es modificada por cambios en las condiciones del cultivo [76]. Esta poca variación en la expresión del factor sigma A reafirma la idea que explica la reducción de la expresión de la PE_PGRS33 cuando en las fusiones transcripcionales evaluadas en *M. smegmatis* mc² 155 aumentan de tamaño es por la adición de una secuencia operadora que es

reconocida por una proteína represora, así como se demostró cuando el factor sigma D está presente en *M. tuberculosis* CDC1551.

Lo aquí descrito es uno de los poco reportes de la caracterización del promotor de un gen *pe_pgrs*; esto permitió además hacer una búsqueda en las regiones 5' corriente arriba de otros miembros de la subfamilia PE_PGRS la presencia de posibles secuencias con homología con los elementos del promotor del *pe_pgrs33*. En este análisis se encontró una secuencia con homología a la caja -10 en 39 de estas secuencias; adicionalmente en una de ellas, en la región 5' corriente arriba del ORF de la PE_PGRS32 la secuencia con homología con la caja -10 se sobrelapa con los tres últimos nucleótidos con el sitio de unión para el factor sigma H previamente identificado por Rodrigue *et al.* mediante un ensayo de inmunoprecipitación de cromatina [113].

Por otra parte, adicional a las posibles cajas -10 identificadas en las secuencias intergénicas corriente arriba de los ORF's no se logró identificar una posible secuencia con clara homología a las cajas -35 de promotores ya descritos, sin embargo una secuencia rica en Adeninas está presente en la mayoría de estas secuencias, localizada en una región aledaña a la que ocuparía la caja -35. Es importante señalar que esta secuencia de 2 a 4 Adeninas cercana a la caja -35 también se encuentra en los promotores tipo B reconocidos por el factor sigma A de los operones ribosomales de las micobacterias [66]. Sin embargo, en este hallazgo es necesario realizar trabajo experimental para definir la funcionalidad de esta secuencia rica en Adeninas y la posible significancia biológica.

13 Conclusiones y perspectivas.

“La ciencia no puede resolver el misterio final de la Naturaleza. Y esto se debe a que, el último análisis, nosotros mismos somos parte del misterio que estamos tratando de resolver.”

Max Planck en K. Wilber, **Quantum questions: Mystical writings of the world's great physicists**, New science library, Boston, 1985, pp 153. citado en [9].

“Quien está fuera del sistema lo percibe de modo diferente de como se percibe el sistema a sí mismo.”

Douglas R. Hofstadter, El cálculo proposicional. pp 219. en [75].

La PE_PGRS33 es transcrita bajo su propio promotor por el factor sigma A, éste promotor corresponde a los denominados tipo B; dicha secuencia promotora incluye una región operadora que recluta una proteína represora que reduce la expresión en condiciones limitadas de nutrientes u oxígeno, así como en la fase estacionaria de crecimiento. Por otro lado, la presencia del factor sigma D inducido en la fase estacionaria y en ambientes pobres de nutrientes reduce la expresión la PE_PGRS33, el factor sigma D puede estar induciendo la transcripción de la proteína represora directa o indirectamente.

Por comparación se encontró en otras 39 secuencias intergénicas corriente arriba de los *pe_pgrs* la presencia de secuencias con homología a la caja -10 descrita en la región promotora del *pe_pgrs33*, y una secuencia conservada en la mayoría de ellas rica en Adeninas en la región aledaña a la posible localización de la caja -35.

Para un mejor entendimiento de la regulación a la que está sometida la expresión de la PE_PGRS33 se hace necesario realizar la identificación de la proteína represora que reconoce la región operadora y que está presente cuando es inducido el factor sigma D en condiciones pobres de nutrientes y en fase estacionaria. Finalmente para explicar la

reducción de la expresión de la PE_PGRS33 será importante evaluar si tiene algún impacto la mutación en alguno de los genes del sistema de dos componentes que censa los niveles de oxígeno en la expresión de este gen. Lo cual será indicativo de que la expresión de la PE_PGRS33 está bajo el control de dos distintos regulones.

14 Bibliografía.

“Si a causa de la debilidad de nuestras luces estamos precisados a valernos de las ajenas, no las recibamos tampoco con innoble sumisión, no abdicemos el derecho de examinar las cosas por nosotros mismos, no consintamos que nuestro entusiasmo por ningún hombre llegue a tal punto que, sin advertirlo, le reconozcamos como oráculo infalible.”

James Balmes, La invención. pp 170. en [6].

- [1] Adindla S y Guruprasad L. 2003 Sequence analysis corresponding to the PPE and PE proteins in *Mycobacterium tuberculosis* and other genomes. J Biosci. 28(2):169-179.
- [2] Alcalá-Valdes L. La tuberculosis pulmonar. Epidemiología, diagnóstico y terapéutica. Editorial Interamericana, S.A. México DF, México. 1970.
- [3] Ambion. BrightStar™ BioDetect™ Kit Instruction Manual. Version 0105. Ambion.
- [4] Applied BioSystems., ABI Prism 7700 Sequence detection system. Relative quantification of gene expression. Applied BioSystem. 2001; User bulletin #2.
- [5] Baker L, Brown T, Maiden MC y Drobniewski F. 2004 Silent nucleotide polymorphisms and phylogeny for *Mycobacterium tuberculosis*. Emerg Infect Dis. 10(9):1568-1576.
- [6] Balmes J. El criterio. Editorial Católica, S.A. Madrid, España. 1974.
- [7] Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC y Cole ST. 2002 Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? Mol Microbiol. 44(1):9-19.
- [8] Barnes DS. 2000 Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. Microbes Infect. 2(4):431-440.
- [9] Barrow JD. Las constantes de la naturaleza. Editorial Crítica, S.L. Barcelona, España. 2006.

- [10] Bashyam MD, Kaushal D, Dasgupta SK y Tyagi AK. 1996 A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: Identification of novel features in promoter elements. *J Bacteriol.* 178(16):4847-4853.
- [11] Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, Talarico S, Kundu M y Basu J. 2007 Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor-alpha. *J Biol Chem.* 282(2):1039-1050.
- [12] Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA y Duncan K. 2002 Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. *Mol Microbiol.* 43(3):717-731.
- [13] Bishop PJ y Neumann G. 1970 The history of the Ziehl-Neelsen stain. *Tuberc Lond.* 51:196-206.
- [14] Black FL. 1975 Infectious diseases in primitive societies. *Science.* 187(4176):515-518.
- [15] Bold TD y Ernst JD. 2009 Who benefits from granulomas, mycobacteria or host? *Cell* 136(1):17-19.
- [16] Brennan JM, Gey van Pittius NC y Espitia C. The PE and PPE multigene families of mycobacteria, pp.513-525. En Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN y Jacobs, Jr. WR. (eds) *Tuberculosis and tubercle bacillus.* ASM Press, Washington, D.C. USA. 2005.
- [17] Brennan MJ y Delogu G. 2002 The PE multigene family: a 'molecular mantra' for mycobacteria. *Trends Microbiol.* 10(5):246-249.
- [18] Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M y Jacobs WR Jr. 2001 Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. *Infect Immun.* 69(12):7326-7333.
- [19] Brosch R, Gordon SV, Garnier T, Eiglmeier K, Frigui W, Valenti P, Dos Santos S, Duthoy S, Lacroix C, Garcia-Pelayo C, Inwald JK, Golby P, Garcia JN, Hewinson RG, Behr MA, Quail MA, Churcher C, Barrell BG, Parkhill J y

- Cole ST. 2007 Genome plasticity of BCG and impact on vaccine efficacy. Proc Natl Acad Sci U S A. 104(13):5596-5601.
- [20] Calamita H, Ko C, Tyagi S, Yoshimatsu T, Morrison NE y Bishai WR. 2005 The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. Cell Microbiol. 7(2):233-244.
- [21] Camus JC, Pryor MJ, Médigue C y Cole ST. 2002 Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiol. 148:2967-2973.
- [22] Castellanos-Joya M, García Avilés MA y Téllez Medina HA. 2008 La tuberculosis en México, primera de dos partes. Epidemiología, Sistema nacional de vigilancia nacional epidemiológica, Secretaría de salud. 13(25):1-3.
- [23] Castellanos-Joya M, García Avilés MA y Téllez Medina HA. 2008 La tuberculosis en México, segunda y última parte. Epidemiología, Sistema nacional de vigilancia nacional epidemiológica, Secretaría de salud. 14(25):1-4.
- [24] Chaitra MG, Hariharaputran S, Chandra NR, Shaila MS y Nayak R. 2005 Defining putative T cell epitopes from PE and PPE families of proteins of *Mycobacterium tuberculosis* with vaccine potential. Vaccine. 23(10):1265-1272.
- [25] Clark GA, Kelley MA, Grange JM y Hill MC. 1987 The evolution of Mycobacterial disease in the human populations. A reevaluation. Curr Anthropol. 28(1):45-62.
- [26] Cockburn TA. 1964 The evolution and eradication of infectious diseases. Perspect Biol Med. 7:498-499.
- [27] Cockburn TA. 1971 Infections diseases in ancient populations. Curr Anthropol. 12(1):45-62.
- [28] Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, Gordon SV, Eiglmeier K, Gas S, Barry CE 3rd, Tekaia F, Badcock K, Basham D, Brown

- D, Chillingworth T, Connor R, Davies R, Devlin K, Feltwell T, Gentles S, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Krogh A, McLean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Osborne J, Quail MA, Rajandream MA, Rogers J, Rutter S, Seeger K, Skelton J, Squares R, Squares S, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S y Barrell BG. 1998 Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 933(11):537-544.
- [29] Cole ST. 1999 Learning from the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *FEBS Lett.* 452(1-2):7-10.
- [30] Comité Nacional de Lucha contra la Tuberculosis, México. <http://www.tbsealsmexico.org/comite/cruzlorena.htm>.
- [31] Crubézy E, Legal L, Fabas G, Dabernat H y Ludes B. 2006 Pathogeny of archaic mycobacteria at the emergence of urban life in Egypt (3400 BC). *Infect Genet Evol.* 6(1):13-21.
- [32] Cutler P. *Methods in molecular biology. Protein purifications protocols*, vol 244. Humana Press Inc, Totowa , NJ, USA. 2004.
- [33] Daley CL. 2005 Molecular epidemiology: a tool for understanding control of tuberculosis transmission. *Clin Chest Med.* 26(2):217-231.
- [34] Daniel TM. 2000 The origins and precolonial epidemiology of tuberculosis in the Americas: can we figure them out? *Int J Tuberc Lung Dis.* 4(5):395-400.
- [35] Daniel TM. 2004 The impact of tuberculosis on civilization. *Infect Dis Clin N Am.* 18(1):157-165.
- [36] Daniel TM. 2006 The history of tuberculosis. Historical review *Respir Med.* 100(11):1862-1870.
- [37] Daniel VS y Daniel TM. 1999 Old testament biblical references to tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 29(69):1557-1558.
- [38] Davis JM y Ramakrishnan L. 2009 The role of the granuloma in expansion and dissemination of early tuberculosis infection. *Cell.* 136(1):37-49.

- [39] Delogu G y Brennan MJ. 2001 Comparative immune response to PE and PE PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 69(9):5606-5611.
- [40] Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ y Zanetti S. 2004 Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. *Mol Microbiol.* 52(3):725-733.
- [41] Dheenadhayalan V, Delogu G y Brennan MJ. 2006 Expression of the PE_PGRS 33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. *Microbes Infect.* 8(1):262-272.
- [42] Dheenadhayalan V, Delogu G, Sanguinetti M, Fadda G y Brennan MJ. 2006 Variable expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS genes: evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 are inversely regulated *in vivo*. *J Bacteriol.* 188(10):3721-3725.
- [43] Diamond J. 2002 Evolution, consequence and future of plant and animals domestication. *Nature* 418(6898):700-707.
- [44] Donoghue HD, Spigelman M, Greenblatt CL, Lev-Maor G, Bar-Gal GK, Matheson C, Vernon K, Nerlich AG y Zink AR. 2004 Tuberculosis: from prehistory to Robert Koch, as revealed by ancient DNA. *Lancet Infect Dis.* 4(9): 584-592.
- [45] Dubos RJ y Bernard DD. 1946 Factors affecting the growth of the tubercle bacilli in liquid media. *J. Exp. Med.* 83(5):409-423.
- [46] Dubos RJ. 1947 The effect of lipids and serum albumin on bacterial growth. *Exp. Med.* 85(1):9-22.
- [47] Ehrt S, Schnappinger D, Voskuil MI y Schoolnik GK. Genome-wide expression profiling of intracellular bacteria: the interaction of *Mycobacterium tuberculosis* with macrophages, pp.169-180. En Kaufmann SHE y Kabelitz D (edi) *Immunology of infection*. Second edition. Academic Press, Great Britain, U.K.

- [48] Einis V. Tuberculosis. Clínica, profilaxis y tratamiento. Editorial MIR, Moscú, URSS.
- [49] Enfermedades infecciosas del aparato respiratorio. 2009 Epidemiología, Sistema nacional de vigilancia nacional epidemiológica, Secretaría de salud. 01(26):15.
- [50] Espitia C, Lacleste JP, Mondragon-Palomino M, Amador A, Campuzano J, Martens A, Singh M, Cicero R, Zhang Y y Moreno C. 1999 The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? Microbiol. 145 (Pt 12):3487-3495.
- [51] Esquivel E. Quimioterapia de la tuberculosis pulmonar. Librería de Medicina. México DF, México. 1966.
- [52] Farrel RE, Jr. (Edi) RNA methodologies: A laboratory guide for isolation and characterization. Third edition. Elsevier Academic Press. Printed in USA. 2005.
- [53] Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, DeBoy R, Dodson R, Gwinn M, Haft D, Hickey E, Kolonay JF, Nelson WC, Umayam LA, Ermolaeva M, Salzberg SL, Delcher A, Utterback T, Weidman J, Khouri H, Gill J, Mikula A, Bishai W, Jacobs WR Jr, Venter JC y Fraser CM. 2002 Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol. 184(19):5479-5490.
- [54] Flores J y Espitia C. 2003 Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. Gene. 318:75-81.
- [55] Frondizi R. Introducción a los problemas fundamentales del hombre. Breviarios del fondo de cultura económica, 260. Segunda edición. Fondo de cultura económica. México, DF. México. 1992.
- [56] Gagneux S y Small PM. 2007 Global phylogeography of *Mycobacterium tuberculosis* and implications for tuberculosis products development. Lancet Infect Dis. 7(5):328-237.
- [57] Gagneux S, DeRiemer K, Van T, Kato-Maeda M, de Jong BC, Narayanan S, Nicol M, Niemann S, Kremer K, Gutierrez MC, Hilty M, Hopewell PC, y

- Small PM. 2006 Variable host-pathogen compatibility in *Mycobacterium tuberculosis*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103(8):2869-2873.
- [58] Gao Q, Kripke KE, Saldanha AJ, Yan W, Holmes S y Small PM. 2005 Gene expression diversity among *Mycobacterium tuberculosis* clinical isolates. Microbiol. 151 (Pt-1):5-14.
- [59] Garnier T, Eiglmeier K, Camus JC, Medina N, Mansoor H, Pryor M, Duthoy S, Grondin S, Lacroix C, Monsempe C, Simon S, Harris B, Atkin R, Doggett J, Mayes R, Keating L, Wheeler PR, Parkhill J, Barrell BG, Cole ST, Gordon SV y Hewinson RG. 2003 The complete genome sequence of *Mycobacterium bovis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(13):7877-7882.
- [60] Gazdik MA y McDonough KA 2005 Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. J Bacteriol. 187(8):2681-2692.
- [61] Gill WP, Harik NS, Whiddon MR, Liao RP, Mittler y Sherman DR. 2009 A replication clock for *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Med. 15(2):211-214.
- [62] Glatman-Freedman A y Casadevall A. 1998 Serum therapy for tuberculosis revisited: reappraisal of the role of antibody-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis*. Clin Microbiol Rev. 11(3):514-532.
- [63] Gomez M y Smith I. Determinants of mycobacterial gene expression. pp. 111-129 En Hatfull GF y Jacobs WR, Jr. (Edi) Molecular genetics of mycobacteria. ASM press, Washington, D.C., USA. 2000.
- [64] Gomez M, Doukhan L, Nair G y Smith I. 1998 *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. Mol Microbiol. 29(2):617-628.
- [65] Gonzalez-y-Merchand JA, Colston MJ y Cox RA. 1996 The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of promoter elements and of neighboring upstream genes. Microbiology. 142(Pt-3):667-674.

- [66] Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ y Cox RA. 1997 Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. *J Bacteriol.* 179(22):6949-6958.
- [67] Gutierrez MC, Brisse S, Brosch R, Fabre M, Omais B, Marmiesse M, Supply P y Vincent V. 2005 Ancient origin and gene mosaicism of the progenitor of *Mycobacterium tuberculosis*. *PloS Pathogens.* 1:1-7.
- [68] Hanahan D, Jessee J y Bloom FR. 1991 Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol.* 204:63-113
- [69] Hanahan D. 1983 Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *J Mol Biol.* 166(4):557-580.
- [70] Harris RI. 1926 Heliotherapy in surgical tuberculosis. *Am J Public Health (N Y).* 16(7): 687-694.
- [71] Hernandez-Abanto SM, Woolwine SC, Jain SK y Bishai WR. 2006 Tetracycline-inducible gene expression in mycobacteria within an animal host using modified *Streptomyces tcp830* regulatory elements. *Arch Microbiol.* 186(6):459-464.
- [72] Herzog H. 1998 History of tuberculosis. *Respiration.* 65(1):5-15.
- [73] Hinds J, Witney AA y VassJK. Microarrays design for bacterial genomes, pp.67-82. En Wren B y Dorrell N (edi) *Functional microbial genomics.* Academic Press, Great Britain, U.K. 2002.
- [74] Hinton JCD, Hauterfort I, Eriksson S, Thompson A y Rhen M. 2004 Benefits and pitfalls of using microarrays to monitor bacterial gene expression during infection. *Curr Op Microbiol.* 7(3):277-282.
- [75] Hofstadter DR. Gödel, Escher, Bach. Un eterno y grácil bucle. Tusquets editores, S.A. Barcelona, España. 2007.
- [76] Hu Y y Coates ARM. 1999 Transcription of two sigma 70 homologue genes, *sigA* and *sigB*, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* 181(1):469-576.

- [77] Invitrogen. 2004. Zero Blunt[®] TOPO[®] PCR cloning kit for sequencing. User manual. Invitrogen. Version N, 19 July 2004, 25-0277.
- [78] Jacques JF, Rodrigue S, Brzezinski R y Gaudreau L. 2006 A recombinant *Mycobacterium tuberculosis* in vitro transcription system. FEMS Microbiol Lett. 255(1):140-147.
- [79] Kaufmann SHE y Kabelitz D (Edi) Immunology of infection. Second edition. Academic Press, Great Britain, U.K.
- [80] Kirschner D y Marino S. 2005 *Mycobacterium tuberculosis* as viewed through a computer. Trends Microbiol. 13(5): 206-211.
- [81] Koh KW, Lehming N y Seah GT. Degradation-resistant protein domains limit host cell processing and immune detection of mycobacteria. Mol Immunol. 2009 Jan 5. [En prensa] doi:10.1016/j.molimm.2008.11.008.
- [82] Laemmli UK. 1970 Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227(5259):680-685.
- [83] Lamichhane G, Zignol M, Blades NJ, Geiman DE, Dougherty A, Grosset J, Broman KW y Bishai WR. 2003 A postgenomic method for predicting essential genes at subsaturation levels of mutagenesis: application to *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A. 100(12):7213-7218.
- [84] Layne E. 1957 Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. Methods Enzymol. 3(1):447-454.
- [85] Ledermann W. 2003 En los 500 años del descubrimiento: Colones y Pinzones de la microbiología. Rev Chil Infect. Edición de aniversario:18-20.
- [86] Ledermann W. 2003 Franceses y alemanes tras la etiología de la tuberculosis. Rev Chil Infect. Edición de aniversario:43-45.
- [87] Ledermann W. 2003 La tuberculosis antes del descubrimiento de Koch. Rev Chil Infect. Edición de aniversario:46-47.
- [88] Ledermann W. 2003 La tuberculosis después del descubrimiento de Koch. Rev Chil Infect. Edición de aniversario:48-50.

- [89] Leutenegger CM, Mislin CN, Sigrist B, Ehrenguber MU, Hofmann-Lehmann R y Lutz H. 1999 Quantitative real-time PCR for the measurement of feline cytokine mRNA. *Vet Immunol Immunopathol.* 71(3-4):291-305.
- [90] Li L, Bannantine JP, Zhang Q, Amonsin A, May BJ, Alt D, Banerji N, Kanjilal S y Kapur V. 2005 The complete genome sequence of *Mycobacterium avium* subspecies paratuberculosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 102(35):12344-12349.
- [91] Liu H, Prugnolle F, Manica A y Balloux F. 2006 A geographical explicit genetic model of worldwide human-settlement history. *Am J Hum Gen.* 79(2):230-237.
- [92] Livak K y Schitteng TD. 2001 Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ method. *Methods* 25(4):402-408.
- [93] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL y Randall RJ. 1951 Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193(1):265-275.
- [94] Lyon RH, Lichstein HC y Hall WH. 1963 Effect of the Tween 80 on the growth of tubercle bacilli in aerated cultures. *J Bacteriol.* 86(2):280-284.
- [95] Mackowiak PA, Blos VT, Aguilar M y Buikstra JE. 2005 On the origin of American tuberculosis. *Clin Infect Dis.* 41(4):515-518.
- [96] Maher D y Raviglione M. 2005 Global epidemiology of tuberculosis. *Clin Chest Med.* 26(2):167-182.
- [97] Målen H, Berven FS, Fladmark KE y Wiker HG. 2007 Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Proteomics.* 7(10):1702-1718.
- [98] Manchester K. 1984 Tuberculosis and leprosy in antiquity: An interpretation. *Med Hist.* 28(2):162-173.
- [99] Mangan JA, Monahan IM y Bucher PD. Gene expression during host-pathogen interactions: approaches to bacterial mRNA extraction and labeling for microarrays analysis, pp.138-151. En Wren B y Dorrell N (edi) *Functional microbial genomics.* Academic Press, Great Britain, U.K. 2002.

- [100] Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, Bradbury AR y Chen X. 2005 *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. *Mol Biol Cell*. 16(1):396-404.
- [101] McGrath JW. 1988 Social networks of diseases spread in the lower Illinois Valley: A simulation approach. *Am J Phys Anthropol*. 77(4):483-496.
- [102] Mellars P. 2006 Going East: New genetic and archeological perspective on the modern human colonization of Eurasia. *Science* 313(5788):796-800.
- [103] Mostowy S y Behr MA. 2005 The origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Chest Med*. 26(2):207-216.
- [104] Musser JM, Amin A y Ramaswamy S. 2000 Negligible genetic diversity of *Mycobacterium tuberculosis* host immune system proteins targets: evidence of limited selective pressure. *Genetics* 155(1):7-16.
- [105] Norrander J, Kempe T y Messing J. 1983 Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene*. 26(1):101-106.
- [106] Orme IM y Roberts AD. 1999 Animal models of mycobacteria infection. *Current Protocols of Immunology*. Supplement 30:19.5.1-19.5.22.
- [107] Parish T y Stoker NG. Electroporation of mycobacteria. pp. 129-144 En Parish T y Stoker NG (Edi). *Methods in molecular biology. Mycobacteria Protocols*, vol 101. Humana Press Inc, Totowa , NJ, USA. 1998.
- [108] Prugnolle F, Manica A, Charpentier M, Guégan JF, Guernier V y Balluox F. 2005 Pathogen-driven selection and worldwide HLA class I diversity. *Curr Biol*. 15(11):1022-1027.
- [109] Qiagen. Integrative solutions – real-time PCR applications. Critical factors for successful real-time PCR [online], http://www1.qiagen.com/literature/brochures/pcr/QT/1037490_AG_PCR_0206_Int_lr.pdf ; 2006.
- [110] Ramakrishnan L, Federspiel NA y Falkow S. 2000 Granuloma-specific expression of *Mycobacterium* virulence proteins from the glycine-rich PE-PGRS family. *Science*. 288(5470):1436-1439.

- [111] Raman S, Hasra R, Dascher CC y Husson RN. 2004 Transcription regulation by *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD its role in virulence. J Bacteriol. 186(19):6605-6616.
- [112] Riley R, Pellegrini M y Eisenberg D. 2008 Identifying cognate binding pairs among a large set of paralogs: The case of PE/PPE proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. PLoS Comput Biol. 4(9):1-13.
- [113] Rodrigue S, Brodeur J, Jacques PE, Gervais AL, Brzezinski R y Gaudreau. 2007 Identification mycobacterial σ factors binding sites by chromatin immunoprecipitation assay. J Bacteriol. 189(5):1505-1513.
- [114] Rodrigue S, Provvedi R, Jacques PE, Gaudreau L y Manganeli R. 2006 The sigma factors of *Mycobacterium tuberculosis*. FEMS Microbiol Rev. 30(6):926-941
- [115] Rodriguez MG, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK y Smith I. 2002 ideR, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. Infect Immun. 70(7):3371-3381.
- [116] Roring S, Brittain D, Bunschoten AE, Hughes MS, Skuce RA, van Embden JDA y Neill SD. 1998 Spacer oligotyping of *Mycobacterium bovis* isolates compared to typing by restriction fragment length polymorphism using PGRS, DR and IS6110 probes. Vet Microbiol. 61(1-2):111-120.
- [117] Rubin EJ, Akerley BJ, Novik VN, Lampe DJ, Husson RN y Mekalanos JJ. 1999 *In vivo* transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 96(4):1645-1650.
- [118] Sakula A. 1983 BCG: who were Calmette and Guérin? Thorax. 38(11):806-812.
- [119] Sambrook J y Russell DW. Molecular cloning: A laboratory manual. 3th ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Cold Spring Harbor, NY, USA. 2001.
- [120] Saviola B, Woolwine SC y Bishai WR. 2003 Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based in vivo expression technology. Infect Immun. 71(3):1379-1388.

- [121] Scopes RK. Protein purification: Principles and practice. 2ed. Springer-Verlag New York Inc. New York, NY. USA. 1988.
- [122] Seki M, Honda I, Fujita I, Yano I, Yamamoto S y Koyama A. 2009 Whole genome sequence analysis of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin (BCG) Tokyo 172: A comparative study of BCG vaccine substrains. *Vaccine*. 27(11):1710-1716
- [123] Singh KK, Zhang X, Patibandla AS, Chien P Jr y Laal S. 2001 Antigens of *Mycobacterium tuberculosis* expressed during preclinical tuberculosis: serological immunodominance of proteins with repetitive amino acid sequences. *Infect Immun*. 69(6):4185-4191.
- [124] Singh PP, Parra M, Cadieux N y Brennan MJ. 2008 A comparative study of host response to three *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS proteins. *Microbiology*. 154(Pt 11):3469-3479.
- [125] Snapper SB, Melton RE, Mustafa S, Kieser T y Jacobs WR Jr. 1990 Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol Microbiol*. 4(11):1911-1919.
- [126] Song T, Song SE, Raman S, Anaya M y Husson RN. 2008. Critical role of a single position in the -35 element for promoter recognition by *Mycobacterium tuberculosis* SigE and SigH. *J Bacteriol*. 190(6):2227-2230.
- [127] Steinbach MM. Mycobacteria: The tubercle bacilli and tuberculosis. pp 957-1025. En Gay and associates (Edi). Agents of disease and host resistance. Thomas Books, The Collegiate Press of Menasha, Wisconsin, USA. 1935.
- [128] Stinear TP, Seemann T, Harrison PF, Jenkin GA, Davies JK, Johnson PD, Abdallah Z, Arrowsmith C, Chillingworth T, Churcher C, Clarke K, Cronin A, Davis P, Goodhead I, Holroyd N, Jagels K, Lord A, Moule S, Mungall K, Norbertczak H, Quail MA, Rabinowitsch E, Walker D, White B, Whitehead S, Small PL, Brosch R, Ramakrishnan L, Fischbach MA, Parkhill J y Cole ST. 2008 Insights from the complete genome sequence of *Mycobacterium marinum* on the evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. *Genome Res*. 18(5):729-741

- [129] Stinear TP, Seemann T, Pidot S, Frigui W, Reysset G, Garnier T, Meurice G, Simon D, Bouchier C, Ma L, Tichit M, Porter JL, Ryan J, Johnson PD, Davies JK, Jenkin GA, Small PL, Jones LM, Tekaia F, Laval F, Daffé M, Parkhill J y Cole ST. 2007 Reductive evolution and niche adaptation inferred from the genome of *Mycobacterium ulcerans*, the causative agent of Buruli ulcer. *Genome Res.* 17(2):192-200.
- [130] Strong M, Mallick P, Pellegrini M, Thompson MJ, y Eisenberg D. 2003 Inference of protein function and protein linkages in *Mycobacterium tuberculosis* based on prokaryotic genome organization: a combined computational approach *Genome Biol.* 4(9):R59.
- [131] Strong M, Sawaya MR, Wang S, Phillips M, Cascio D y Eisenberg D. 2006 Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103(21):8060-8065.
- [132] Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH y Yang Z. 2007 Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. *Tuberculosis (Edinb).* 87(4):338-346.
- [133] Thambu DS, Umadevi M, Brahmadathan KN y Jacob JT . 2004 Detecting mycobacteremia for diagnosing tuberculosis. *Indian J Med Res.* 119(6):259-266.
- [134] Triccas JA, Berthet FX, Pelicic V y Gicquel B. 1999 Use of fluorescence induction and sucrose counterselection to identify *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed within host cells. *Microbiol* 145(Pt-10):2923-2930.
- [135] Turk JL. 1987 Von Pirquet, allergy and infectious diseases: a review. *J R Soc Med.* 80(1):31-33.
- [136] Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, y Falkow S. 1996. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene.* 173(1):47-52.

- [137] Voskuil MI, Schnappinger D, Rutherford R, Liu Y y Schoolnik GK. 2004 Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. *Tuberculosis*(Edinb). 84(3-4):256-262.
- [138] Voskuil MI, Visconti KC y Schoolnik GK. 2004 *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. *Tuberculosis* (Edinb). 84(3-4):218-227.
- [139] Wayne LG y Hayes L. 1996 An *in vitro* model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two states of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 64(6):2062-2069.
- [140] Wayne LG. Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for research purposes. En Bloom BR (edi). *Tuberculosis pathogenesis, protection and control*. AMS. Washington, DC. USA. 1994.
- [141] Westermeier R. *Electrophoresis in practice*. 2th Edi. VCH A Wiley company. Weinheim, Germany. 1997.
- [142] Wirth T, Hildebrand F, Allix-Béguet C, Wölbeling F, Kubica T, Kremer K, van Soolingen D, Rüsche-Gerdes S, Locht C, Brisse S, Meyer A, Supply P y Niemann S. 2008 Origin, spread and demography of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PloS Pathog*. 4(9):1:10.
- [143] World Health Organization. *Global tuberculosis control: surveillance, planning, financing*. WHO report 2008, Geneva, 2008 (WHO/HTM/TB/2008.393).
- [144] Wu S, Howard ST, Lakely DL, Kipnis A, Samten B, Safi H, Gruppo V, Wizel B, Shams H, Basaraba R, Orme IM y Barnes PF. 2004 The principal sigma factor *sigA* mediates enhanced growth of *Mycobacterium tuberculosis in vivo*. *Mol Microbiol*. 51(6):1551-1562.
- [145] Yang ZH, Ijaz K, Bates JH, Eisenach KD y Cave MD. 2000 Spoligotyping and polymorphic GC-rich repetitive sequence fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis* strains having few copies of IS6110. *J Clin Microbiol*. 38(10):3572-3576.

15 Anexos.

“La superioridad de un remedio se refiere a un sujeto concreto. No hay panaceas generales.”

Risieri Frondidizi, Naturaleza de los valores. pp 558. en [55].

“La decisión y la responsabilidad se hallan siempre en sus propias manos.”

Risieri Frondidizi, Naturaleza de los valores. pp 573. en [55].

15.1 Protocolos.**6.2.1a Preparación de medio de cultivo Middlebrook 7H9-ADC-Tween [45,46, 94, 140].**

1. Para un litro de medio pesar 4.7 g del medio base Middlebrook 7H9 (Difco), resuspenderlo en 900 ml de agua destilada en un matraz perfectamente lavado de 2.5 l de capacidad con tapa de rosca o tapón de gasa y algodón, en este último caso colocar una cubierta de papel aluminio para evitar que se caiga por la presión del medio caliente al esterilizar. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C (15 psi = 1.05 kg/cm²).
2. Una vez retirado del autoclave, permitir que el medio se enfríe a 50-55°C antes de adicionarle de forma aséptica dentro de una campana de flujo laminar o frente a un mechero 100 ml del enriquecimiento BBL Middlebrook ADC (Becton BD). Para mayor certeza de esterilidad de la solución del enriquecimiento es recomendable esterilizarla por filtración (Ø 0.22 µm), en muchos casos los viales comerciales han sufrido derrames del enriquecimiento y se convierten así en una fuente de contaminación. Ésta solución de enriquecimiento debe almacenarse a 4°C protegido de la luz.
3. Una vez adicionado el enriquecimiento adicionar 2.5 ml de una solución de Tween 80 al 20% (Sigma), ya estéril por filtración (Ø 0.22 µm) y almacenado a 4°C en frasco de color ámbar para proteger de la luz.
4. Finalmente, si se requiere adicionar al medio una solución del antibiótico en la cantidad adecuada para alcanzar la concentración requerida.
5. Una vez preparado el medio, incubar por lo menos durante una noche a 37°C para verificar la esterilidad del mismo. El medio así preparado está listo para usarse.

6.2.1b Preparación de solución GTC [52, 79, 99].

Para 100 ml:

1. Pesar 47.28 g de Thiocyanate guanidine (Sigma) y disolverlos en 40 ml de agua destilada durante 10 a 15 min en baño María a 50°C, adicionar 0.5 g de Sodium N-lauryl sarcosine (Sigma), mezclar para disolver.
2. Agregar 10 ml de una solución 250 mM de Trisodium citrate (Sigma), pH 7.0, adicionar 0.5 ml de Tween 80 (Sigma).
3. Aforar a 99.22 ml, se puede filtrar si así se desea ($\emptyset = 0.22 \mu\text{m}$). La solución así preparada es estable por varios días (1-2 semanas) a 4°C y en oscuridad.
4. Previo a su uso, agregar 0.781 ml de 2-mercaptoethanol (BioRad). Después de agregar el 2-mercaptoethanol la solución es estable como máximo durante 2 días.

6.2.1c Tratamiento de agua con DEPC [119].

Adicionar un volumen de Diethylpyrocarbonate* (DEPC, Sigma) correspondiente al 0.1% del volumen de agua MQ a tratar, mezclar perfectamente la solución e incubarla por lo menos 1 h a 37°C, preferentemente durante toda la noche. Esterilizar la solución en el autoclave por 15 min a 121°C (15 psi = 1.05 kg/cm²).

Mantener la solución a temperatura ambiente.

*Impedir que al reactivo sea contaminado con nucleófilos (ejemplos, agua o etanol) ya que esto tiende a descomponer el reactivo a Diethylcarbonato.

6.2.1d Electroforesis en gel de agarosa-Formaldehído [52].

Preparación del gel:

1. Disolver 1.5 g de agarosa en 84.6 ml de agua destilada, enfriar a 50-60°C.
2. Adicionar 10 ml del Buffer MOPS 10X y 5.4 ml de Formaldehído (37%), mezclar y adicionar el volumen adecuado a la cámara de electroforesis.
3. La concentración final de la agarosa es de 1.5% y 0.66 M de Formaldehído.
4. Para el buffer de corrida utilizar Buffer MOPS 1X. Después de la electroforesis, teñir el gel colocando este en una solución de Bromuro de etidio en el Buffer MOPS 1X o agua (1 a 0.5 mg/ml), durante 10 a 20 min, de preferencia en agitación.

Preparación de las muestras de RNA:

Agregar a la muestra de RNA, 3 volúmenes del Buffer de carga para RNA, desnaturalizar la muestra por 5 min a 70°C y colocar la muestra en hielo hasta cargar el gel.

Soluciones a preparar:

Buffer MOPS 10X.

Reactivo:	Concentración:
MOPS*	200 mM
Acetato de sodio	50 mM
EDTA	10 mM

Ajustar el pH a 7.0 y esterilizar en autoclave. Almacenar el buffer a temperatura ambiente protegido de la luz.

* 3-(N-morpholino) propanosulphonic acid.

Buffer de carga para RNA.

Reactivo:	Concentración:
Buffer MOPS	1X
Formamida	50%
Formaldehído (37%)	7%
Glicerol	5%
Azul de bromofenol	0.04%

7.2.1a Captura de productos de PCR en el vector pCR4[®] Blunt-TOPO[®] [77].

Proceso de ligación:

1. Purificar el producto de PCR (De la reacción de PCR o de un gel de agarosa) y concentrar si es necesario.
2. Colocar en un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Reactivo:	Volumen:
Producto de PCR	0.5-5 µl
Solución 1.2 M NaCl, 0.06 M MgCl ₂	1 µl
Agua destilada estéril	cbp 5 µl
Vector	1 µl
Volumen total de la reacción	6 µl

3. Mezclar con la micropipeta y centrifugar para coleccionar.
4. Incubar por 5-30 minutos a 22-23°C.
5. Colocar en hielo hasta iniciar el proceso de transformación. Una alternativa es almacenarlo a -20°C.

Proceso de transformación de la cepa TOP10:

1. Descongelar en hielo uno de los viales de la cepa competente.
2. Adicionar 3 o los 6 µl de la reacción de ligación y mezclarlo cuidadosamente.
3. Incubar la mezcla por 25-30 min en hielo.
4. Dar un choque de calor por 60 s a 42°C, sin agitar.
5. Trasladar inmediatamente al hielo e incubarlo por al menos 1 minuto.
6. Adicionarle 800 µl del medio SOC, previamente calentado a 37°C.
7. Incubar por 1 hora a 37°C en agitación constante.
8. Sembrar 100 a 200 µl, en placas de medio LB con Kn 50 µg/ml y/o Car 100 µg/ml a las que se le agregó X-Gal, sin IPTG.*
9. Incubar a 37°C por 12-14 horas.
10. Seleccionar 4 a 8 colonias blancas, sembrarlas en medio LB con Kn 50 µg/ml y/o Car 100 µg/ml, incubarlas en agitación a 37°C durante toda la noche.
11. Extraer el plasmido y realizarle un mapa de restricción restricción.

* Ésta cepa permite selección blanco/azul sin la presencia de inductor.

7.2.1b Preparación de cepas de *E. coli* competentes por Calcio y transformación por choque térmico [68, 69].

Procedimiento de preparación de las cepas de *E. coli* competentes por Calcio:

1. Sembrar por estría la cepa deseada en una placa de medio LB. Si la cepa tiene un marcador de selección, preparar la placa de LB con el antibiótico correspondiente.
2. Incubar a 37°C por toda la noche.
3. Tomar una colonia con un palillo estéril e inocularlo en 5-10 ml de medio LB, Si la cepa tiene un marcador de selección se le debe colocar el antibiótico correspondiente.
4. Incubar por toda la noche (12-16 h) a 37°C en agitación constante de 200 rpm.
5. Inocular 50 o 100 ml de medio LB con 20 mM de Mg^{2+} , diluyendo 1:50 el cultivo de toda la noche, colocarlo en incubación a 37°C en agitación constante por 2-4 h. Este tiempo dependerá de la cepa, y para determinarlo es necesario realizar una cinética de crecimiento previamente para establecer la fase logarítmica de crecimiento (OD_{600} nm de 0.4 a 0.6); si es posible calcular la tasa de crecimiento específica [$SGR = \ln(OD_1/OD_0)/(t_1-t_0)$] y tomar el cultivo cuando este valor sea lo más alto posible.
6. Una vez transcurrido el tiempo designado, tomar el cultivo e introducirlo en hielo lo más rápidamente posible, girar el matraz en el hielo (cada 5-10 min por 4-5 ocasiones) para favorecer el enfriamiento lo más rápido y homogéneo posible. Y dejar el cultivo en esta condición al menos 1 h, hasta 3-4 h.
7. Centrifugar el cultivo a 4°C para coleccionar la pastilla bacteriana.
8. Desechar el medio de cultivo por decantación y resuspender (1/2 a 1/3 del volumen del cultivo) la pastilla en una solución fría (hielo) de $CaCl_2$ 50 mM estéril. No hacer uso del vortex o resuspender con la micropipeta, se debe evitar la agitación violenta para no dañar las bacterias. Por lo cual es necesario agitar manualmente el cultivo e introducirlo constantemente en el hielo, ya que algo sumamente importante es mantener fría la suspensión bacteriana.
9. Volver a coleccionar la pastilla bacteriana.
10. Mientras se centrifuga la suspensión bacteriana, preparar en un recipiente una mezcla de hielo seco y Etanol al 70%. Para ello se coloca una cama de hielo seco triturado y se adiciona lentamente el etanol, dejar unos min y si es necesario adicionar un poco más de Etanol hasta cubrir totalmente la cama de hielo seco. Transcurrido unos

min, se forma una pasta, y en ella se pueden colocar los viales previamente identificados para enfriarlos antes de adicionar la suspensión bacteriana.

10. A la pastilla bacteriana formada se le retira cuidadosamente por decantación la solución de CaCl_2 con que fueron lavadas. Repetir una vez más el lavado en la solución fría de CaCl_2 50 mM.

11. La pastilla bacteriana obtenida después del segundo lavado resuspenderla (1/10 a 1/15 de volumen del cultivo) en una solución fría de CaCl_2 50 mM y 20% de glicerol (del mayor grado de pureza posible).

12. Hacer alícuotas de ésta suspensión bacteriana de 200 μl en los viales previamente enfriados en la mezcla de hielo seco/etanol y volver a colocar el vial en esta mezcla para que se congele lo más rápidamente posible la suspensión de bacterias.

13. Guardar las bacterias así preparadas a -80°C hasta su uso. Evitar en lo mayor posible que se descongelen.

Procedimiento de transformación por choque térmico de *E. coli* competentes por Calcio.

1. Tener preparadas las placas (2 a 5 placas) de medio LB con el antibiótico indicado para el marcador de selección del plasmido a usar para transformar. Si es el caso adicionar el inductor e indicador (IPTG, 40 μl de una solución 100 μM y X-Gal, 40 μl de una solución al 2% en Dimethylformamide) para la complementación en α (selección blanco/azul), dispersándolo en la superficie de la placa. Se puede colocar las placas a preincubar a 37°C al igual que el medio SOC (Peptona 2%, Extracto de levadura 0.5%, NaCl 10 mM, KCl 2.5 mM, MgCl_2 10 mM, MgSO_4 10 mM y Glucosa 20 mM) para recuperar las bacterias después del choque térmico.

2. Hecho lo anterior, tomar uno de los viales de la cepa competente por Calcio y descongelarlo en hielo (5-10 min) o calentándolo con la mano, en este último caso cuidar de no mantenerlo en la mano después de descongelarse.

3. Adicionar el plasmido o la reacción de ligación (no es necesario inactivar la enzima) y mezclar moviendo la punta de la micropipeta en la suspensión bacteriana, evitar subir y bajar el volumen con la micropipeta. Colocar en hielo inmediatamente. Se puede emplear un volumen del plasmido o reacción de ligación no mayor al 20 % de la suspensión bacteriana (para 200 μl de bacterias se puede usar hasta 40 μl de la solución del plasmido).

4. Incubar en esta condición por 25-30 min.
5. En un termobloque o baño María equilibrado a 42°C introducir el vial con la suspensión bacteriana y el plasmido por 50-60 s, sin agitar.
6. Volver a colocar el vial en el hielo por 1-2 min.
- 7.- Adicionar 600-800 µl del medio SOC en condicione de esterilidad.
8. Incubar en agitación a 37°C por 45-60 min.
9. Una vez recuperadas las bacterias, tomar 25-100 µl (plasmidos) o 50-200 µl (reacciones de ligación) de la suspensión bacteriana transformada y dispersar en la superficie de la placa.
10. Incubar por toda la noche a 37°C, o por más tiempo si el tamaño de las colonias es pequeño. No incubar por periodos prolongados placas con β-lactámicos (Ampicilina o Carbenicilina) para evitar la aparición de colonias satélites.
11. Cuando se realiza complementación en α es posible que a 37°C todas las colonias sean blancas, para hacer evidente la presencia de colonias azules, colocar las placas a temperatura ambiente o a 4°C por algunas horas.

7.2.2a Preparación de cepas de micobacterias para electrocompetencia y transformación por electroporación [107].

Preparación de electrocompetentes:

1. Sembrar en 5-10 ml de medio 7H9-ADC-Tween 80 una colonia de *M. smegmatis* mc² 155, incubar en agitación constante 200 rpm, a 37 °C por 3 días.
2. Tomar de este precultivo y sembrar 1/100 del volumen final a cultivar en el medio antes descrito y en las mismas condiciones, por 24 a 28 h, lo cual corresponde aproximadamente a la porción media de la fase logarítmica de crecimiento.
3. Cosechar las bacterias centrifugando el cultivo a 3,000 x g durante 10-15 min a 4 °C.
4. Realizar 2 lavados de la pastilla bacteriana con una solución fría (hielo) de Glicerol ultrapuro al 10%, estéril.
4. Resuspender la pastilla en 1/50 a 1/100 en la misma solución de Glicerol.
5. Dispensar en alícuotas de 100 µl y almacenar en congelación (-80°C) hasta su uso.

Procedimiento de electroporación:

1. Colocar 100 µl de la suspensión bacteriana en la cubeta de electroporación previamente enfriada y a la que se le colocó la solución del plasmido seleccionado para transformar, mezclar cuidadosamente con la micropipeta.
2. Electroporar con las siguientes condiciones: Un sólo pulso de 2500 V, 25 µF, 200 Ohms por 5 ms.
3. Colocar de nuevo la cubeta en hielo, recuperar la suspensión bacteriana en 1-2 ml de medio 7H9-ADC-Tween 80 e incubarla por 4 h a 37°C en agitación preferentemente.
5. Sembrar la suspensión en placas de medio 7H11-OADC + el antibiótico indicado para realizar la selección.
6. Incubar las placas a 37°C dentro de una bolsa plástica para reducir la desecación de las mismas hasta que aparezcan las colonias (2 a 4 días).

7.2.2b Preparación de placas de medio Middlebrook 7H11-OADC [106].

1. Para un litro de medio pesar 21 g del medio base Middlebrook 7H11 (Difco), resuspenderlo en 900 ml de agua destilada en un matraz perfectamente lavado de 2.5 l de capacidad con tapa de rosca o tapón de gasa y algodón, en este último caso colocar una cubierta de papel aluminio para evitar que se caiga por la presión del medio caliente al esterilizar. Esterilizar en autoclave por 15 min a 121°C (15 psi = 1.05 kg/cm²). Es importante observar que el medio no adquiera un color negro, de ser así no es recomendable usarlo.
2. Una vez retirado del autoclave, permitir que el medio se enfríe a 50-55°C antes de adicionarle de forma aséptica dentro de una campana de flujo laminar o frente a un mechero 100 ml del enriquecimiento BBL Middlebrook OADC (Becton BD). Para mayor certeza de esterilidad de la solución del enriquecimiento es recomendable esterilizarla por filtración (Ø 0.22 µm), en muchos casos los viales comerciales han sufrido derrames del enriquecimiento y se convierten así en una fuente de contaminación. Esta solución de enriquecimiento debe almacenarse a 4°C protegido de la luz.
3. Finalmente, si se requiere adicionar al medio una solución del antibiótico en la cantidad adecuada para alcanzar la concentración requerida.
4. Dispensar 30 a 35 ml del medio en cajas de Petri, esperar a que solifique y permitir que se pierda la mayor parte de la condensación.
5. Una vez preparado el medio, incubar por lo menos durante una noche a 37°C para verificar la esterilidad del mismo. El medio así preparado está listo para usarse. Se puede almacenar a 4°C por no más de 4 a 6 semanas protegido de la luz.

7.2.2c Cuantificación de proteínas por el método de Lowry en microplaca [84, 93].

1. En una placa de microtitulación (Microtiter[®]) adicionar 50 µl de agua destilada por pozo.
2. Colocar 5 µl por duplicado de cada una de las curvas estándar (mg/ml) y de las muestras problema.
3. Adicionar 150 µl de la Solución de trabajo C, recién preparada, agitar fuertemente durante al menos 20 s. Incubar la placa protegida de la luz por 10 min a temperatura ambiente.
4. Adicionar 15 µl del Reactivo de Folin 1 N (Fluka, BioChemika), agitar fuertemente e incubar en la oscuridad a temperatura ambiente por 30 min.
5. Después de lo anterior, leer las densidades ópticas de la placa en un lector de ELISA con el filtro de 660 o 620 nm.
6. Calcular la concentración de las muestras problema con relación a las curvas estándar.

Soluciones a preparar.

Solución A.

Reactivo:	Concentración:
Na ₂ CO ₃	2%
NaOH	0.4%
Tartrato de Na y K	0.16%
SDS	1%

Solución B.

Reactivo:	Concentración:
CuSO ₄ ·5H ₂ O	4%

Filtrar ambas soluciones por Ø de 0.22 mm y almacenarlos a temperatura ambiente.

Solución de trabajo C.

Reactivo:	Concentración:
Solución A	99%
Solución B	1%

Mezclar perfectamente antes de adicionar a los pozos de la placa.

7.2.2d SDS-PAGE [82, 141].

Procedimiento de preparación de los geles, electroforesis, transferencia y tinción de las membranas PVDF:

1. En un tubo Falcon de 50 ml, limpio, mezclar los siguientes reactivos de acuerdo al porcentaje elido del gel a preparar, después de haber montado los vidrios perfectamente limpios donde se vaciará la solución.

Mezcla para el gel separador (gel de 7 x 9 cm):

Reactivo:	Porcentaje del gel:				
	8%	10%	12%	15%	20%
Agua (ml)	4.8	4.2	3.5	2.5	0.8
Buffer gel separador 4X (ml)	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Acrilamida/Bis-acrilamida* 29:1 (ml)	2.7	3.3	4.0	5.0	6.7
Persulfato de amonio 10% (µl)	50	50	50	50	50
TEMED** (µl)	5	5	5	5	5
Volumen total (ml)	20.055	20.055	20.055	20.055	20.055

* Premezcla (BioRad).

** N, N, N´N´-Tetramethylethylenediamine (BioRad).

2. Vaciar la mezcla y adicionarle 1 o 2 ml de agua en la superficie para eliminar las posibles burbujas formadas, esperar a que polimerice el gel.

3. Para el gel concentrador, retirar el agua del gel separador y preparar la siguiente mezcla de acuerdo al porcentaje elegido.

Mezcla para el gel concentrador:

Reactivo:	Porcentaje del gel:	
	3%	4.5%
Agua (ml)	3.2	3.0
Buffer gel concentrador 4X (ml)	1.25	1.25
Acrilamida/Bis-acrilamida 29:1 (ml)	0.5	0.75
Persulfato de amonio 10% (µl)	100	100
TEMED (µl)	10	10
Volumen total (ml)	5.060	5.110

4. Vaciar la mezcla, colocar el peine con el tamaño de pozos elegido y esperar a que polimerice. Se le puede adicionar un poco de agua para evitar la evaporación de la solución mientras polimeriza.

Soluciones necesarias para el SDS-PAGE:

Buffer gel separador 4X.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 8.8	1,500 mM
SDS	0.4 %

Buffer gel concentrador 4X.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 6.8	500 mM
SDS	0.4 %

Ambas soluciones almacenarlas a 4°C, protegidos de la luz, al igual que la solución de acrilamida/bis-acrilamida.

Solución de Persulfato de amonio al 10%.

Reactivo:	Para 1 ml:
Persulfato de amonio	0.1 gramo
Agua destilada	cbp 1 ml

Guardar a -20 °C.

5. Montar el gel en la cámara de electroforesis y adicionar buffer de corrida 1X frío (4°C) en ambos electrodos. Retirar el peine.

6. Preparar las muestras de proteínas con un volumen igual al del buffer de carga 2X y hervir por 5 min en baño María.

7. Realizar la separación por el tiempo necesario (60 V, hasta llegar al gel separador, subir el voltaje a 120 hasta que llegue al final del gel el colorante Azul de bromofenol.

Soluciones necesarias para la electroforesis:

Buffer de carga 2X.

Reactivo:	Concentración:
Buffer gel concentrador 4X	25%
SDS	0.2%
β-mercaptoetanol	5%
Glicerol	20%
Azul de bromofenol	0.0025%
Rojo de pironina	0.0025%
Mantener en congelación (-20°C).	

Buffer de corrida 10X.

Reactivo:	Concentración:
Tris base	250 mM
Glicina	1.91 M
SDS	10%

Así preparado el pH está en un rango de 8.2 a 8.4. No ajustarlo. Almacenar a 4°C.

8. Una vez concluida la electroforesis, desmontar el gel. Colocarlo sobre el cassette de transferencia con una o dos capas de papel filtro humedecido con el buffer de transferencia 1X.

9. Colocar la membrana PVDF, previamente activada por 30 s más en Metanol absoluto, evitando en mayor posible la formación de burbujas entre ésta y el gel.

10. Montar el cassette de transferencia en la cámara con el buffer de transferencia 1X frío (4°C) y transferir por 60 min a 60 V, para geles de 0.75 a 1 mm de grosor.

Soluciones necesarias para la transferencia:

Buffer de transferencia 10X.

Reactivo:	Concentración:
Tris base	250 mM
Glicina	1.91 M

Así preparado el pH está en un rango de 8.2 a 8.4. No ajustarlo. Almacenar a 4°C.

Para usarlo, diluirlo a 1X y adicionarle 10% de Metanol.

11. Una vez concluida la transferencia, retirar la membrana, un control de la misma es la localización del Rojo de pironina en esta.

12. Secar la membrana.

13. Para teñirla, colocarla en la solución de tinción de azul de Comassie por 30 s. Retirla y eliminar el exceso de la solución de tinción.

14. Para desteñir, adicionarle la solución para desteñir por el tiempo necesario para alcanzar un resultado satisfactorio. Es recomendable cubrir perfectamente el recipiente con la solución de tinción y la solución para desteñir mientras se realizan ambos procesos a fin de evitar la evaporación excesiva del Metanol.

Soluciones necesarias para la tinción de las membranas PVDF con azul de Comassie:

Solución de tinción de azul de Comassie para membranas PVDF.

Reactivo:	Concentración:
Azul de Comassie R-250	0.1%
Metanol absoluto	50%
Ácido acético glacial	7%

Solución para desteñir membranas PVDF teñidas con azul de Comassie.

Reactivo:	Concentración:
Metanol absoluto	40%
Ácido acético glacial	10%

10.2.2a Procedimiento para obtención de cuerpo de inclusión de proteínas sobre-expresadas en *E. coli* [32, 78, 121].

1. Resuspender la pastilla bacteriana en el Buffer de lisis (~6 ml por gramo de peso húmedo). Adicionar lisozima a una concentración final de 300 mg/ml. Incubar en agitación constante durante 30 minutos a 4°C.
2. Adicionar Tritón X-100 a una concentración final de 1% (v/v) y sonicar.
3. Centrifugar la suspensión a 12,000 x g por 15 minutos a 4 °C. Retirar el sobrenadante y resuspender la pastilla en Buffer de lisis, adicionar Tritón X-100 a una concentración de 0.5%. Incubar por 10 minutos a temperatura ambiente, centrifugar y retirar el sobrenadante. Repetir el lavado sólo con el Buffer de lisis.
4. Resuspender la pastilla en el buffer indicado para cada proteína.

Composición del Buffer de lisis.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 8.0	50 mM
EDTA	1 mM
NaCl	50 mM
PMSF*	1 mM

* Phenylmethylsulfonyl fluoride (Roche).

10.2.2.b Procedimiento de purificación por afinidad a metales de la subunidad α del core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv [32, 78, 121].

1. Lavar la matriz (2 ml Chelating Sepharose™ Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech AM) con 5 volúmenes (10 ml) de agua destilada para retirar el Etanol en el que se encuentra resuspendida.
2. Adicionar 0.5 (1 ml) volúmenes de una solución de 100 mM de Sulfato de Níquel.
3. Lavar la matriz con 5 volúmenes (10 ml) de agua para retirar el exceso de Níquel.
4. Lavar la matriz con un volumen (2 ml) de una solución de Acetato de sodio 0.02 M, pH 4.0 y NaCl 0.5 M.
5. Equilibrar la matriz con 2 volúmenes (4 ml) de Buffer A con 8 M de Urea.
6. Adicionar 2 ml de la muestra resuspendida en Buffer A con 8 M de Urea.
7. Colectar la muestra no pegada.
8. Lavar 5 veces con 2 volúmenes (4 ml) del Buffer A60 con 8 M de Urea. Colectar cada uno de los lavados por separado
9. Eluir con 3 ml del Buffer A500 con 8 M de Urea, agregar cada ml por separado y colectarlos juntos o separados.
10. Retirar el Níquel de la matriz con la adición de 1 ml de una solución de 200 mM de EDTA, pH 8.0 y 500 mM de NaCl.
11. Retirar el exceso de EDTA con un lavado con 2-3 volúmenes (4-6 ml) de una solución de NaCl 0.5 M. Estos dos últimos pasos son necesario sólo cuando se quiere verificar si restos de la proteína no se han logrado eluir con el Imidazol.
12. Para almacenar la matriz por largos periodos de tiempo mantenerla en etanol al 20 %.

Composición de buffers:

Buffer A con 8 M de Urea.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	5 mM
Urea	8 M

Buffer A60 con 8 M de Urea.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	60 mM
Urea	8 M

Buffer A500 con 8 M de Urea.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	20 mM
NaCl	500 mM
Imidazol	500 mM
Urea	8 M

Los tres buffers filtrarlos por Ø de 0.44 mm y almacenarlos a 4°C.

10.2.4a Buffers para el plegado del core de la RNA polimerasa y los factores sigma A y D, recombinantes de *M. tuberculosis* H37Rv [78].

Buffer C4.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%
Urea	4 M

Buffer C2.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%
Urea	2 M

Buffer C1.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%
Urea	1 M

Buffer C0.5.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%
Urea	0.5 M

Buffer C0.25.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%
Urea	0.25 M

Buffer C.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 μM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%

10.2.4b Procedimiento de purificación por afinidad a metales del core de la RNA polimerasa recombinante de *M. tuberculosis* H37Rv [32, 78, 121].

1. Lavar la matriz (2 ml Chelating Sepharose™ Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech AM) con 5 volúmenes (10 ml) de agua destilada para retirar el Etanol en el que se encuentra resuspendida.
2. Adicionar 0.5 (1 ml) volúmenes de una solución de 100 mM de Sulfato de Níquel.
3. Lavar la matriz con 5 volúmenes (10 ml) de agua para retirar el exceso de Níquel.
4. Lavar la matriz con un volumen (2 ml) de una solución de Acetato de sodio 0.02 M, pH 4.0 y NaCl 0.5 M.
5. Equilibrar la matriz con 2 volúmenes (4 ml) de Buffer C10.
6. Adicionar 2 ml de la muestra resuspendida en Buffer C.
7. Colectar la muestra no pegada.
8. Lavar 5 veces con 2 volúmenes (4 ml) del Buffer C10. Colectar cada uno de los lavados por separado
9. Eluir con 3 ml del Buffer C500, agregar cada ml por separado y coleccionarlos juntos o separados.
10. Retirar el Níquel de la matriz con la adición de 1 ml de una solución de 200 mM de EDTA, pH 8.0 y 500 mM de NaCl.
11. Retirar el exceso de EDTA con un lavado con 2-3 volúmenes (4-6 ml) de una solución de NaCl 0.5 M. Estos dos últimos pasos son necesario sólo cuando se quiere verificar si restos de la proteína no se han logrado eluir con el Imidazol.
12. Para almacenar la matriz por largos periodos de tiempo mantenerla en etanol al 20 %.

Composición de buffers:

Buffer C.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Glicerol	20%

Buffer C10.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Imidazol	10 mM
Glicerol	20%

Buffer C500.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Imidazol	500 mM
Glicerol	20%

Los tres buffers filtrarlos por Ø de 0.44 mm y almacenarlos a 4°C.

10.2.6a Procedimiento de purificación por afinidad a metales de los factores sigma A y D recombinantes de *M. tuberculosis* H37Rv [32, 78, 121].

1. Lavar la matriz (2 ml Chelating Sepharose™ Fast Flow, Amersham Pharmacia Biotech AM) con 5 volúmenes (10 ml) de agua destilada para retirar el Etanol en el que se encuentra resuspendida.
2. Adicionar 0.5 (1 ml) volúmenes de una solución de 100 mM de Sulfato de Níquel.
3. Lavar la matriz con 5 volúmenes (10 ml) de agua para retirar el exceso de Níquel.
4. Lavar la matriz con un volumen (2 ml) de una solución de Acetato de sodio 0.02 M, pH 4.0 y NaCl 0.5 M.
5. Equilibrar la matriz con 2 volúmenes (4 ml) de Buffer C10 con 8 M de Urea.
6. Adicionar 2 ml de la muestra resuspendida en Buffer C con 8 M de Urea.
7. Colectar la muestra no pegada.
8. Lavar 5 veces con 2 volúmenes (4 ml) del Buffer C10 con 8 M de Urea. Colectar cada uno de los lavados por separado
9. Eluir con 3 ml del Buffer C500 con 8 M de Urea, agregar cada ml por separado y coleccionarlos juntos o separados.
10. Retirar el Níquel de la matriz con la adición de 1 ml de una solución de 200 mM de EDTA, pH 8.0 y 500 mM de NaCl.
11. Retirar el exceso de EDTA con un lavado con 2-3 volúmenes (4-6 ml) de una solución de NaCl 0.5 M. Estos dos últimos pasos son necesario sólo cuando se quiere verificar si restos de la proteína no se han logrado eluir con el Imidazol.
12. Para almacenar la matriz por largos periodos de tiempo mantenerla en etanol al 20 %.

Composición de buffers:

Buffer C.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Urea	8 M
Glicerol	20%

Buffer C10.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Imidazol	10 mM
Urea	8 M
Glicerol	20%

Buffer C500.

Reactivo:	Concentración:
Tris-HCl, pH 7.9	50 mM
KCl	200 mM
ZnCl ₂	10 µM
EDTA	1 mM
2-Mercaptoetanol	5 mM
Imidazol	500 mM
Urea	8 M
Glicerol	20%

Los tres buffers filtrarlos por Ø de 0.44 mm y almacenarlos a 4°C.

10.2.8a Procedimiento de purificación de oligonucleótidos en geles desnaturalizantes de poli-acrilamida [119].

Preparación del gel:

1. Preparar una mezcla de los siguientes reactivos en un tubo Falcon de 50 ml:

Gel de poli-acrilamida-TBE 10 % (13 x 15 cm x 0.75 mm).

Reactivo:	15 ml (1 gel)
Urea	7.2 g
TBE 10X	1.5 ml
Acri/Bis-acri(19:1) 40 %	3.8 ml
Agua destilada	cbp 15 ml

Mezclar hasta que se encuentre completamente disuelta la Urea y adicionar:

Reactivo:	15 ml (1 gel)
Persulfato de amonio 10 %	60 µl
TEMED	6 µl

2. Mezclar rápidamente y verter el gel en los vidrios previamente montados.

3. Después de polimerizada la mezcla, montar en el cámara de electroforesis y lavar los restos de Urea de los pozos con buffer TBE 1X.

Soluciones a preparar:

Buffer TBE 10X.

Reactivo:	Concentración:	Para 500 ml:
Tris base	0.9 M	54.5 g
Ácido bórico	0.9 M	27.5 g
Solución de EDTA 0.5 M pH 8.0	20 mM	20 ml

Filtrar por Ø de 0.44 mm.

Solución de Acrilamida:Bis-acrilamida 40% (19:1).

Reactivo: Para 50 ml:

Acrilamida	19 g
Bis-acrilamida	1 g

Filtrar por Ø de 0.22 mm, almacenar protegido de la luz a 4°C.

Solución de Persulfato de amonio al 10%.

Reactivo:	Para 1 ml:
Persulfato de amonio	0.1 gramo
Agua destilada	cbp 1 ml

Guardar a -20 °C.

Buffer de carga 2X.

Reactivo:	Concentración:
Formamida	95 %
Xylene cyanol	0.025 %
Azul de Bromofenol	0.025 %
EDTA	18 mM
SDS	0.025 %

Guardar en refrigeración (4°C), protegido de la luz.

Preparación de la muestra, electroforesis y purificación:

1. Resuspender el oligonucleótido en agua destilada o buffer TE (Tris-HCl 10 mM y EDTA 5 mM, pH 8.0).
2. Mezclarlo con un volumen del buffer de carga 2X y realizar la electroforesis a 60 V por ~120 min, en buffer TBE 1X.
3. Retirar el gel, teñirlo por 10 a 15 min en una solución de Bromuro de etidio (0.5 mg/ml en TBE 1X).
4. Cortar lo más rápido posible la banda del oligonucleótido.
5. Cortar en pequeños fragmentos el gel, y eluirlo en 10 mM de Tris-HCl, pH 8.0, dentro de un tubo eppendorf durante toda la noche, a temperatura ambiente o a 37°C.
6. Realizar uno o dos lavados con Fenol/Cloformo.
7. Precipitar con Acetato de amonio, lavar con etanol y resuspender en agua tratada con DEPC.
8. Cuantificar por espectrofotometría.

10.2.8b Electroforesis en gel desnaturizante de poli-acrilamida y electrotransferencia a membrana de Nylon del cDNA marcado con Biotina [119].

Procedimiento de electroforesis:

1. Preparar un gel de poli-acrilamida desnaturizante al 10%, de acuerdo al protocolo descrito en el anexo anterior (10.2.8a).
2. Mezclar la reacción de síntesis del cDNA con un volumen semejante del Buffer de carga y calentar la mezcla por 2 min a 94°C (Para el Buffer de carga ver el anexo 10.2.8a).
3. Realizar la electroforesis en buffer TBE 1X a 60 V por ~120 min.

Procedimiento de transferencia:

1. Después de la electroforesis, preparar 2-4 piezas de papel filtro del tamaño del gel a transferir. Humedecerlas con Buffer TBE 0.5 X, colocar 1-2 piezas en el ánodo (-), colocar el gel sobre esta superficie.
2. Sobre el gel colocar la membrana de Nylon previamente humedecida en agua destilada, preferentemente en agua tratada con DEPC. También es importante colocar una marca en la membrana para identificar la orientación de la misma.
3. Adicionar 1-2 piezas de papel y armar la unidad de transferencia.
4. Transferir por 30 min a 200 mA en Buffer TBE 0.5 X.

Procedimiento de fijado del cDNA:

1. Una vez concluida la transferencia, retirar la membrana y esperar a que se seque.
2. Fijar el cDNA con un tratamiento por 5 minutos en el trans-iluminador para DNA, colocando la membrana con la superficie hacia donde se transfirió hacia abajo para que incida directamente la luz UV.
3. La membrana así tratada se puede guardar a -20 °C en un recipiente donde no sufra un daño físico.

10.2.8c Detección en la membrana de Nylon del cDNA marcado con Biotina [3].

Detección con los reactivos del kit BrightStar™ BioDetect™ (Ambion).

Procedimiento:

1. Lavar la membrana en el Buffer de lavado 1X dos veces con una duración de 5 minutos cada lavado (1 ml por cada cm² de membrana).
2. Incubar la membrana en el Buffer de bloqueo 2 veces por 5 minutos (0.5 ml por cada cm² de membrana).
3. Incubar la membrana en el Buffer de bloqueo por 30 minutos (1 ml por cada cm² de membrana).
4. Incubar la membrana en el Buffer de bloqueo al cual se le adicionó la Streptavidina-AP (10 mL del Buffer/1 mL de la Streptavidina) por 30 minutos (10 ml por 100 cm²).
5. Incubar la membrana en el Buffer de bloqueo por 10 minutos (0.5 ml por cada cm² de membrana).
6. Lavar la membrana en el Buffer de lavado 1X tres veces con una duración de 5-10 minutos cada lavado (1 ml por cada cm² de membrana).
7. Incubar la membrana en el Buffer de ensayo dos veces con una duración de 2 minutos cada incubación.
8. Retirar la membrana, eliminando el exceso del Buffer de ensayo, y colocarla sobre una porción de Acetato, adicionarle 3-5 ml de la solución CDP-Star, colocarle una porción adicional de Acetato sobre la membrana. Este arreglo se puede hacer el cassette para la película radiográfica.
9. En el cuarto oscuro colocar la película radiográfica. Incubar por tiempos hasta que se alcance el mejor resultado al revelar la película radiográfica.

15.2 Genotipo y características de las cepas empleadas.

Cepas de <i>E. coli</i> :		Genotipo o características:	Uso:
<i>E. coli</i> (Invitrogen)	TOP10	F'- <i>mcrA</i> $\Delta(mrr-hsdRMS-mcrBC)$ $\phi 80lacZ\Delta M15$ $\Delta lacX74$ <i>recA1</i> <i>araD139</i> <i>galU</i> <i>galK</i> $\Delta(ara-leu)7697$ <i>rpsL</i> (Str ^R) <i>endA1</i> <i>nupG</i>	Manipulación de DNA.
<i>E. coli</i> pLysS (Novagen)	BL21 (DE3)	F'- <i>ompT</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ (DE3[<i>lacI</i> <i>lacUV5</i> -T7 <i>gene 1</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>]) pLysS(Cm ^R) T1R	Expresión de proteínas recombinantes.
<i>E. coli</i> (Novagen)	Rosetta (DE3)	F'- <i>ompT</i> <i>lon</i> <i>hsdS_B</i> (<i>r_B</i> - <i>m_B</i> -) <i>gal</i> <i>dcm</i> λ (DE3 [<i>lacI</i> <i>lacUV5</i> -T7 <i>gene 1</i> <i>ind1</i> <i>sam7</i> <i>nin5</i>]) pRARE(Cam ^R)	Expresión de proteínas recombinantes.
Cepas de <i>Mycobacterium</i> :		Descripción:	
<i>M. smegmatis</i> mc ² 155		Cepa de fácil transformación [125].	
<i>M. tuberculosis</i> H37Rv		Cepa tipo [21, 28].	
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551		Cepa tipo [53].	
<i>M. tuberculosis</i> CDC1551 $\Delta sigD$		Mutante en el factor sigma D [20].	

15.3 Publicación.

Microb Pathog. 2009 Mar;46(3):119-27. Epub 2008 Nov 27.

Expression of *Mycobacterium tuberculosis* *pe_pgrs33* is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A.

Vallecillo AJ, Espitia C.

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México D.F., Mexico.

Although recent work shows that the expression of the PE/PE_PGRS protein family occur both in vitro and in vivo under stress conditions, very little is known about their promoter and how they are regulated. In this work, the promoter region of a member of PE_PGRS family, the PE_PGRS33 was identified and the promoter boxes were determined. To date, this is one of the few reports that describe a promoter region of a PE_PGRS member. In addition, the gene promoter functionality was assayed in *Mycobacterium smegmatis* with the green fluorescent protein reporter gene fused to different lengths of *pe_pgrs33* promoter sequences. The GFP was down-regulated in the stationary phase, under nutrient starvation and oxygen depletion, suggesting that, in stress conditions, regulation of the gene could be under control of a repressor molecule. A 5' rapid amplification of cDNA end assay of transcriptional fusions evaluated in *M. smegmatis* and in *Mycobacterium tuberculosis* mRNA revealed a transcription start point 75 nt upstream of the ATG codon and a -10 like-SigA box. Furthermore, a transcription run assay confirmed that SigA mediates in vitro transcription of *pe_pgrs33*. Interestingly, conserved -10 SigA boxes were found in the intergenic region of several PE_PGRS genes. These results suggest that expression of some PE_PGRS genes may be mediated by SigA, and the differences in expression observed in the gene family could be explained by the participation of additional regulatory genetic elements.

PMID: 19068228 [PubMed - indexed for MEDLINE]

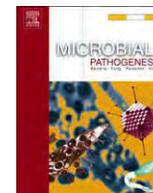
doi:10.1016/j.micpath.2008.11.003

Copyright © 2008 Elsevier Ltd All rights reserved.



Contents lists available at ScienceDirect

Microbial Pathogenesis

journal homepage: www.elsevier.com/locate/micpath

Expression of *Mycobacterium tuberculosis* *pe_pgrs33* is repressed during stationary phase and stress conditions, and its transcription is mediated by sigma factor A

Antonio J. Vallecillo, Clara Espitia*

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, C.P. 04510 México D.F., Mexico

ARTICLE INFO

Article history:

Received 19 September 2008
 Received in revised form
 13 November 2008
 Accepted 18 November 2008
 Available online 27 November 2008

Keywords:

Mycobacterium tuberculosis PE_PGRS
 Promoter
 Transcription start mapping
 Sigma factor A
 Transcription run assay

ABSTRACT

Although recent work shows that the expression of the PE/PE_PGRS protein family occur both *in vitro* and *in vivo* under stress conditions, very little is known about their promoter and how they are regulated. In this work, the promoter region of a member of PE_PGRS family, the PE_PGRS33 was identified and the promoter boxes were determined. To date, this is one of the few reports that describe a promoter region of a PE_PGRS member. In addition, the gene promoter functionality was assayed in *Mycobacterium smegmatis* with the green fluorescent protein reporter gene fused to different lengths of *pe_pgrs33* promoter sequences. The GFP was down-regulated in the stationary phase, under nutrient starvation and oxygen depletion, suggesting that, in stress conditions, regulation of the gene could be under control of a repressor molecule. A 5' rapid amplification of cDNA end assay of transcriptional fusions evaluated in *M. smegmatis* and in *Mycobacterium tuberculosis* mRNA revealed a transcription start point 75 nt upstream of the ATG codon and a –10 like-SigA box. Furthermore, a transcription run assay confirmed that SigA mediates *in vitro* transcription of *pe_pgrs33*. Interestingly, conserved –10 SigA boxes were found in the intergenic region of several PE_PGRS genes. These results suggest that expression of some PE_PGRS genes may be mediated by SigA, and the differences in expression observed in the gene family could be explained by the participation of additional regulatory genetic elements.

© 2008 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The sequencing of the *Mycobacterium tuberculosis* genome reveals two multigenic families, the PPE and the PE, which have conserved motifs of Proline-Proline-Glutamic and Proline-Glutamic respectively at the N-terminal sequence. Of different size, the PPE and the PE families represent about 4% of the total number of annotated ORFs and approximately 10% of the coding capacity of the genome. The PE family with more members (~99) encompasses the PE and PE_PGRS subfamilies with 36 and 63 members respectively. Although the PE_PGRS genetic subfamily is restricted to mycobacterial species, they have preferentially expanded within the genomes of pathogenic mycobacteria [1–5].

One of the recent studies with RT-PCR and microarrays with whole genome expression patterns have suggested that most PE/

PE_PGRS genes are transcriptionally active [6–11]. However, only a few PE/PE_PGRS proteins have been identified in mycobacterial proteomes [12–14]. Recognition of PE/PE_PGRS recombinant proteins by antibodies from tuberculosis patients indirectly indicates that these proteins are expressed during infection [15]. In addition, a structural function has been assigned to these proteins and mutagenic studies indicate that some of the PE subfamily members are required for optimal growth [1,16].

However, the most widely studied PE_PGRS proteins is PE_PGRS33, a cell-surface molecule involved in various host-pathogen interaction events. The *pe_pgrs33* mutation introduces new phenotypic properties to BCG strain. These properties include dispersed growth in liquid medium and reduced infection of macrophages [17]. In addition, the PGRS domain, but not PE, affects bacterial shape and colony morphology when Rv1818c is overexpressed in *Mycobacterium smegmatis* and *M. tuberculosis* [18]. More recently, it has been reported that PE_PGRS33 induces death by necrosis in macrophages infected with *M. smegmatis* that overexpress the protein [19]. Basu et al. demonstrated that recombinant PE_PGRS33 interacts with Toll-like receptor 2, inducing TNF- α , which mediates cellular death by apoptosis [20]. These observations indicate that the protein plays an important role in tuberculosis pathogenesis.

Abbreviations: EtBr, ethidium bromide; HRP, horseradish peroxidase; RBS, ribosome binding site; TAE, tris-acetate-EDTA buffer; TBE, Tris-borate-EDTA buffer; TSP, transcription start point; 5'-RACE, 5'-rapid amplification of cDNA end.

* Corresponding author. Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Inmunología, Apartado Postal 70-228, 04510 México D.F., Mexico. Tel.: +52 5556223860; fax: +52 55 56223369.

E-mail address: espitia@biomedicas.unam.mx (C. Espitia).

However, it has not been determined how the gene coding for this protein is regulated. In the present work, the region located 5' upstream of *pe_pgrs33* was found to drive the expression of the gene mediated by sigma factor A and modulated in stress conditions. Comparative analysis of the 5' upstream intergenic region of the PE_PGRS genes shows the presence of putative -10 SigA-like boxes. These findings suggest a common expression mechanism for these sequences, which could be modified depending on the stress stimulus as has been observed for *pe_pgrs33*.

2. Results

2.1. *pe_pgrs33* is not co-transcribed with *rv1819c*

Since the *pe_pgrs33* and *Rv1819c* had the same orientation, it was evaluated if the genes are transcribed in a bicistronic messenger (Fig. 1A). In the experiment, when genomic DNA was used for PCR amplification, the expected products of 69 and 245 bp were observed (Fig. 1B, lanes 1 and 2). However, no PCR product of cDNA amplification was observed when the oligonucleotide that hybridizes at 89 bp upstream of the *Rv1819c* stop codon was used. The amplification of minor PCR product shows the presence of *pe_pgrs33* mRNA in cDNA synthesis reaction (Fig. 1B, lanes 3 and 4). No product was observed in the PCR reaction with total RNA without cDNA synthesis (Fig. 1B, lanes 5 and 6). These results show that *pe_pgrs33* was transcribed independently from *Rv1819c* and suggest the presence of a promoter sequence in the 5' upstream *pe_pgrs33* gene.

2.2. Promoter sequence functionality and upregulation of the *pe_pgrs33* in the *M. tuberculosis sigD* mutant

5' upstream fragments of *pe_pgrs33* were fused to *gfp*-reporter gene in the pFPV27 vector, functionality of the transcriptional fusions was evaluated with the immunodetection of GFP in protein extracts from *M. smegmatis* mc² 155 grew to logarithmic phase. Expression of reporter gene was similar in all the transcriptional fusion studied; 150, 196 and 245 bp fragments, only 69 bp fragment showed a minimal expression of reporter gene. When the fragment of 150 bp was cloned in inverted orientation,

expression of reporter gene was abolished (Fig. 2A). These results demonstrated the capacity of 5' upstream region to drive the expression of *pe_pgrs33*. Additionally, culture of *M. smegmatis* transformed with transcriptional fusions that include fragments higher than 150 bp in stationary phase show slightly reduction in expression of reporter gene (Fig. 2B). To evaluate this change and the influence of stress conditions in gene expression, qRT-PCR assay was performed. A significant reduction of *gfp* mRNA was observed in bacteria grown to stationary phase or exposed to oxygen and nutrients depletion compare with those grown to log phase (Fig. 2C). On the other hand, Raman et al. using microarrays showed variation in the expression of *pe_pgrs33* between *M. tuberculosis* H37Rv and the CDC1551 *sigD* mutant [21]. These data were corroborated in the present work with *M. tuberculosis* CDC1551 and their isogenic mutant grown by 3 weeks in Middlebrook 7H9-ADC-Tween, qRT-PCR assay showed the expression of *pe_pgrs33* mRNA was significantly higher in the *sigD* mutant with respect to the wild type (Fig. 2D). These results indicate that the presence of SigD downregulates the expression of *pe_pgrs33* in stationary phase.

2.3. Transcription start point mapping of the *pe_pgrs33* mRNA

The *pe_pgrs33* transcription start point (TSP) was localized 75 nucleotides 5' upstream of the ATG initial codon by the 5'-RACE assay, (Fig. 3). This site was the same in *pe_pgrs33* mRNA from *M. tuberculosis* and mRNAs from *M. smegmatis* transformed with two transcriptional fusions. There was no variation when *M. smegmatis* was submitted to oxygen and nutrient depletion, a demonstration that there is only one functional promoter in these conditions. Once the TSP was defined, the -10 box (TACGCT) was predicted but for the -35 box no clear consensus could be established by comparison of the upstream sequences with experimentally defined *M. tuberculosis* promoter regions [22]. As shown in Fig. 3, -10 boxes showed high homology with known type B/SigA gene and *rrn* operon promoters [23,24].

2.4. Transcription run assay

Recognition of -10 and -35 boxes in the *pe_pgrs33* promoter by SigA was evaluated in an *in vitro* transcription run assay employing

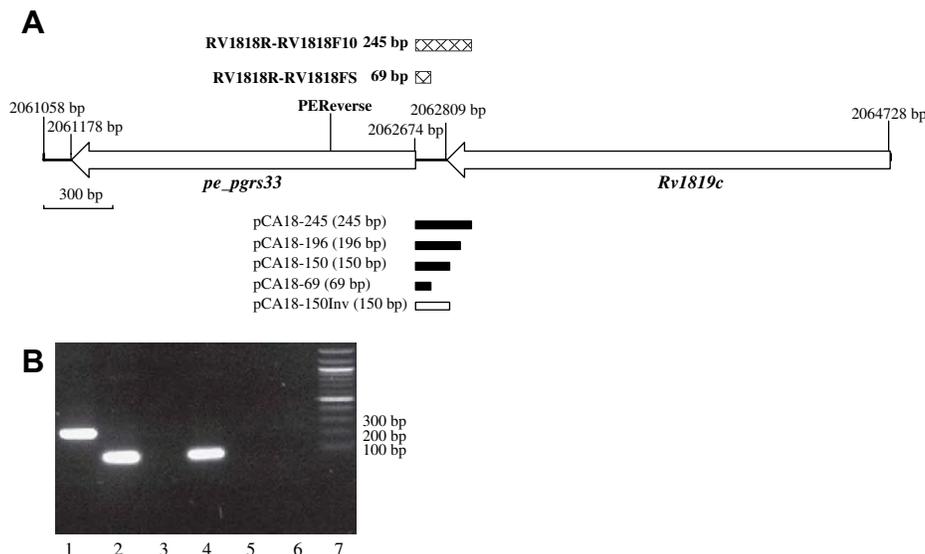


Fig. 1. Genomic organization of *pe_pgrs33* in *M. tuberculosis* H37Rv chromosome. (A) The hybridizing site for the primer employed for cDNA synthesis (PEReverse) is indicated as well as those used for amplification of PCR products (69 and 245 bp) in *pe_pgrs33*-*Rv1819c* transcription analysis. Localization of PCR products (69 bp, 150 bp, 150 bp in inverted orientation, 196 bp and 245 bp fragments) fused to *gfp*-reporter gene in transcriptional fusion is also shown. (B) PCR products amplified from genomic DNA (lanes 1 and 2), cDNA (lanes 3 and 4) and total RNA (lanes 5 and 6) in the transcription analysis of the *pe_pgrs33* mRNA.

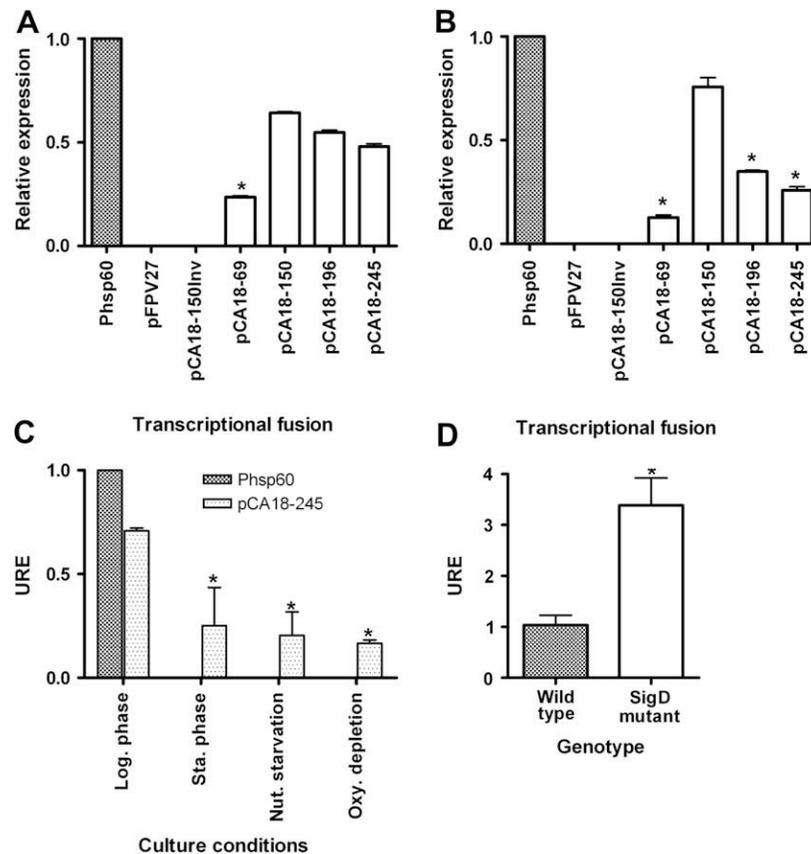


Fig. 2. Functionality of transcriptional fusion and qRT-PCR analysis of expression of *gfp* and *pe_pgrs33*. (A) Effect of size reduction of promoter sequence in quantity of GFP immunodetected with mouse anti-GFP antibody in soluble extract of *M. smegmatis* mc² 155 transformed with different transcriptional fusions grown to middle logarithmic phase and (B) stationary phase. *Statistical differences to respect pCA18-150 transcriptional fusion (ANOVA, $p < 0.05$), Bonferroni post-tests. (C) Units relative of expression (URE) of *gfp* in *M. smegmatis* mc² 155 transformed with pCA18-245 transcriptional fusion in different culture conditions. *Statistical differences to respect logarithmic phase (ANOVA, $p < 0.05$), Bonferroni post-tests. (D) URE of *Rv1818c* in *M. tuberculosis* CDC1551 grown by 3 weeks relative to isogenic *sigD* mutant. *Statistical differences (*t*-test, $p < 0.05$).

a system adapted from Jacques et al. [25]. In the assay, the *in vitro* transcript was detected when sigma A was present (Fig. 4, lane 1). This result indicated that *pe_pgrs33* promoter is recognized by SigA.

2.5. Identification of putative SigA boxes in the 5' upstream intergenic region of PE_PGRS genes

The size of the PE_PGRS 5' upstream intergenic regions varies from 20 to 754 bp with an average of 283.475 bp. The upstream region of the *pe_pgrs13*, *pe_pgrs36*, *pe_pgrs37*, *pe_pgrs49*, *pe_pgrs56* and *pe_pgrs61* genes were not considered for the analysis, since their 5' upstream intergenic regions overlap with the neighbor gene, which in most cases is another PE_PGRS except for *pe_pgrs36*, where the upstream gene is *pe21* and for *pe_pgrs37* where the upstream gene is different to *pe-pgrs*. Inspection of the *M. tuberculosis* genome (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/lproks.cgi>) showed that orthologs of *pe_pgrs13* exists in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur as a single gene while in *M. tuberculosis* H37Rv and *M. bovis* AF2122/97, it is split into 2 genes, *pe_pgrs12* and *pe_pgrs13*. In *M. tuberculosis* H37Rv, *pe_pgrs36* and *pe21* exist as 2 genes but in *M. bovis* AF2122/97 and in *M. bovis* BCG Pasteur, they are a single product. In *M. bovis* BCG Pasteur, *pe_pgrs50* and *pe_pgrs49* is a single gene. In *M. tuberculosis* H37Rv, *pe_pgrs55* and *pe_pgrs56* exist as 2 genes but in *M. bovis* AF2122/97, they are a single product. *pe_pgrs60* and *pe_pgrs61* exist as 2 genes in *M. tuberculosis* complex strains and, finally, *pe_pgrs37* has been considered a pseudogene fragment.

The presence of SigA-like boxes in the PE_PGRS intergenic regions was detected in 39 sequences. Alignment of the 70 bp

intergenic region containing the putative –10 SigA showed a clearly conserved SigA hexamer and a conserved poly-A stretch of about 23–39 bp upstream of –10 boxes (Fig. 5).

3. Discussion

To understand the pathogenesis of tuberculosis it is essential to know how the genes involved in bacterial virulence are regulated. The PE_PGRS33 protein, a member of PE_PGRS multigenic subfamily, has been associated to bacterial invasion and is also an immunogenic protein due to its capacity to induce a strong T-cell response and be responsible of apoptosis and necrosis in target eukaryotic cells [15,19,20,26]. Furthermore, the wide polymorphism associated with this protein has been related with the clinical presentation of pulmonary tuberculosis [27].

Although many biological effects have been attributed to PE_PGRS33, nothing is known about the gene promoter region. In this work, we are defined a *pe_pgrs33* promoter region, determining their boxes and in addition based in our results we are proposing a mechanism to explain the downregulation expression of this gene.

The *pe_pgrs33* was found to be transcribed from monocistronic mRNA, in contrast with some members of the PE subfamily that are integrated into operons with PPE members. The co-transcription of both genes favors the interaction of PPE with PE proteins, which contributes to the stability of the proteins [28]. We also found that, although the 150 bp fragment 5' upstream from the start codon was able to mediate the transcription of the *gfp*-reporter gene, when 46 or 95 bp were added to this fragment a significant reduction of GFP

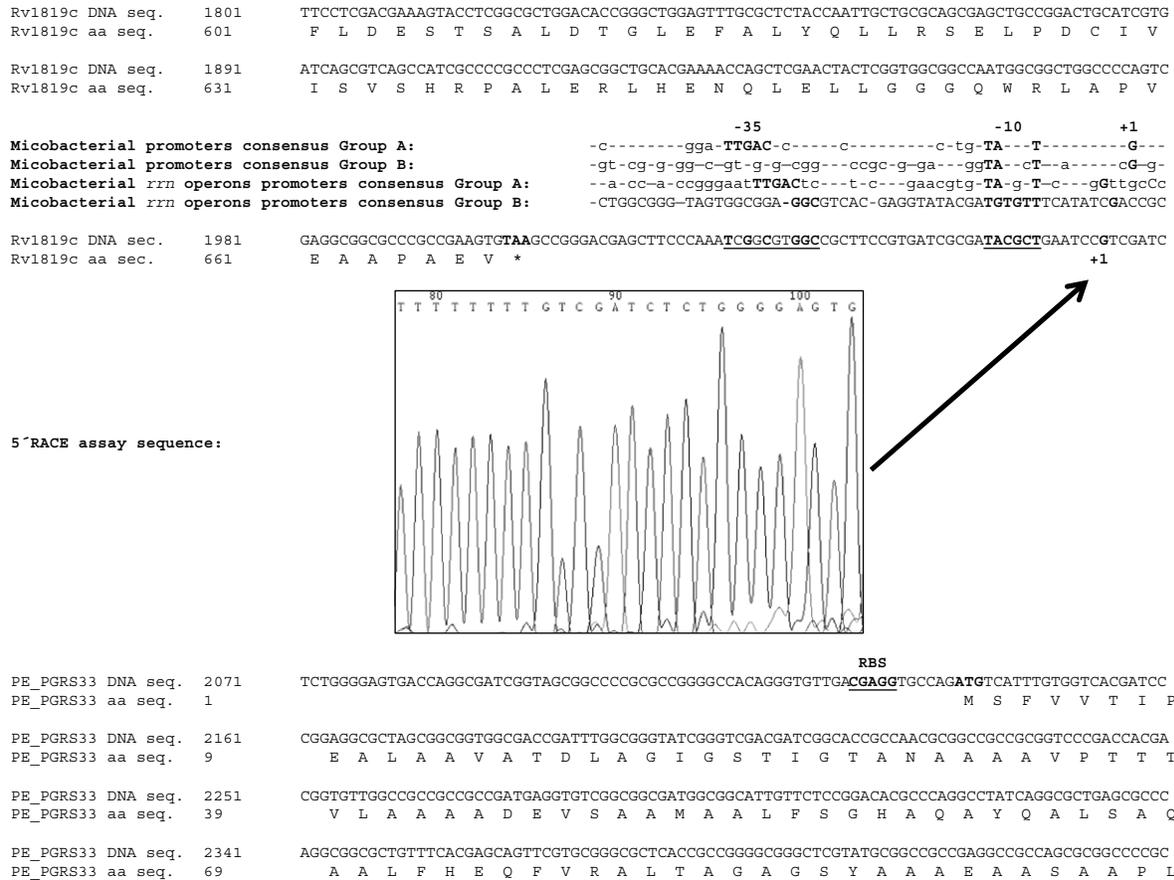


Fig. 3. Identification of promoter elements of *pe_pgrs33*. Transcription start point (+1) 75 nt (in bold) 5' upstream ATG codon was identified by sequencing of the products of 5'-RACE assays (box). Alignment of the intergenic *pe_pgrs33*-*Rv1819c* region with consensus sequences of mycobacterial promoters recognized by sigma factor A, type A and B, and consensus sequences of mycobacterial *rrn* operons promoters type A and B are shown [22]. The ribosome binding site (RBS), -10 box and two possible -35 boxes of *pe_pgrs33* promoter are in bold and underlined.

was observed in the stationary phase, with nutrient starvation, and oxygen depletion. These observations suggest the existence of an operator sequence in the *pe_pgrs33* promoter which may be recognized by an induced repressor protein and agree with published observations that show that the levels of *pe_pgrs33* mRNA decrease slightly when bacteria are grown inside macrophages or are exposed to nutrient starvation and oxygen depletion [29]. The basal expression seen with the 69 bp fragment which does not contain the promoter region could be due to the addition of an RBS that could increase the efficiency in translation since basal expression has been observed with empty pFPV27 [30].

On the other hand, by microarray assays, some PE_PGRS have been found to be upregulated in the *sigD* mutant, and *pe_pgrs33* is one of these genes [21]. We confirmed this result by qRT-PCR assay, since reduction of mRNA expression was detected in the wild type in contrast with the *sigD* mutant. In addition, several studies have shown that expression of *sigD* increases in the stationary growth phase and nutrient starvation, but decreases under oxygen depletion [31–33]. Downregulation of *pe_pgrs33* in the stationary phase and nutrient starvation could be explained by the increase in SigD which could directly or indirectly drive the expression of a repressor protein. However, downregulation of *pe_pgrs33* by SigD during oxygen depletion is hard to explain since SigD decreases drastically in this condition [33].

The identification of the TSP in two transcriptional fusions of the *pe_pgrs33* promoter (pCA18-150 and pCA18-245) evaluated in *M. smegmatis* and TSP of *pe_pgrs33* mRNA of *M. tuberculosis* showed that transcription initiates at the same position in both species. Thus, the specificity of transcriptional recognition of *pe_pgrs33*

promoter in these mycobacterial species appears to be conserved, as has been suggested by Bashyam et al. for other promoters [34].

The search for mycobacterial promoter sequences previously identified 5' upstream of TSP of *pe_pgrs33* revealed a highly conserved Pribnow box-like hexamer located at the 7 nt position 5' upstream TSP. However, a conserved -35 like sequence box along the promoter sequence of *pe_pgrs33* was not found. This is a common characteristic found in many of mycobacterial promoters described [22,34]. Bashyam et al. suggest that the heterogeneity of -35 boxes can be explained by the high number of sigma factors present in the genus of mycobacteria with different or overlapping specificities for -35 box [34]. The mycobacterial transcription machinery supports the sequence variation in the -35 box, or even more the lack of this sequence. This condition can influence the frequency with which the promoter is recognized and therefore the strength of the promoter.

The identification of TSP in the *pe_pgrs33* gene allowed the localization of a putative -10 box. This element matched with the group B/SigA-like mycobacterial promoters. Furthermore, the *in vitro* transcription assay developed by Jacques et al. confirmed that SigA recognizes the promoter region of the *pe_pgrs33* gene [25]. Sigma factor A is considered essential in mycobacteria, and its expression is constant during kinetic growth, and is not affected by changes in culture conditions [35]. However, as observed in this work for *pe_pgrs33* regulation of the expression of *gfp*-reporter gene under stress conditions, the possibility arises that this gene could be negatively regulated by a repressor protein expressed in stationary phase and poor nutrients conditions when *sigD* is induced.

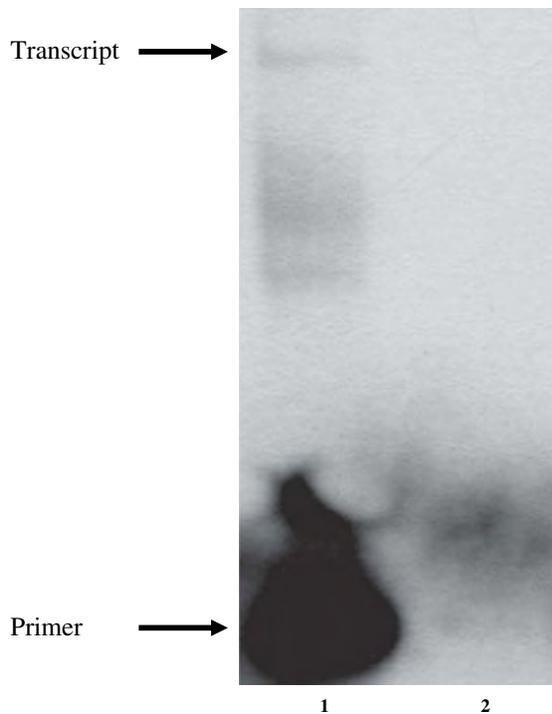


Fig. 4. *In vitro* transcription assay of the promoter sequence of *pe_pgrs33*. Detection of cDNA of transcript (arrow) generated *in vitro* by *M. tuberculosis* recombinant RNA polymerase and sigma factor A (lane 1). No signal was detected when the primer was omitted in the cDNA synthesis reaction (lane 2).

To date, this is one of the few reports that describe a promoter region of a PE_PGRS member. In addition, in the intergenic region of some *pe_pgrs* we found a similar promoter sequence to that observed in *pe_pgrs33*. Comparison of the 5' upstream region of *pe_pgrs* genes showed conserved –10 SigA in 39 of these sequences. The analysis also showed that the *pe_pgrs32* gene has a putative SigA-like box which overlaps with the 3 last nucleotides of the SigH binding site previously identified by Rodrigue et al. by using chromatin immunoprecipitation assays [36]. On the other hand, additionally to the conserved –10 SigA boxes present in the PE_PGRS intergenic regions no clear –35 Sig A box could be determined; instead, a poly-A stretch near the putative –35 region defined for *pe_pgrs33* was present in most of the sequences. It is important to mention that a poly-A stretch near the –35 boxes is also present in the type B/SigA promoter of *rrn* operons [24]. Experimental work will be needed to confirm the functionality of these elements and to establish the biological significance of poly-A regions. In conclusion, we presently show that the *pe_pgrs33* promoter belongs to a group B/SigA-like mycobacterial promoter. Moreover, we also demonstrated that a sequence upstream of promoter was required for transcriptional activity reduction in bacteria cultured under starvation or oxygen depletion conditions, suggesting these results that a trans-regulator factor could be involved in the expression of *pe_pgrs33*. Future studies to identify the putative trans-regulator factor will enhance our understanding of how this gene is regulated in *M. tuberculosis* and will perhaps provide additional clues to the function of PE_PGRS33 during mycobacterial infection. Finally, we found that SigA putative consensus promoters are present in many other upstreams sequence of PE_PGRS genes. These observations suggest that a basal expression level is mediated by SigA, but when bacteria environmental conditions change, depending on the stimulus down and upregulation of the genes could occur mediated by additional genetic elements. This hypothesis could be the basis for explaining the variable expression pattern describing these sequences under different stresses.

4. Materials and methods

4.1. Plasmids and primers employed

Plasmids and primers used in this study are summarized in Table 1.

4.2. Culture medium and growth conditions

Escherichia coli strains TOP10F' (Invitrogen™, Life Technologies Inc.), Rosetta (DE3) and BL21 (DE3) pLysS (Novagen) were cultured in Luria–Bertani medium at 37 °C. Both, broth and plates were mixed with carbenicillin 100 µg/ml or kanamycin 50 µg/ml when necessary. Liquid cultures were constantly agitated at 200 r.p.m. Mycobacterial strains were grown on Middlebrook 7H9 broth plus 10% ADC enrichment [5% (w/v) BSA fraction V, 2% (w/v) glucose and 0.85% (w/v) NaCl] and 0.05 g/l of Tween 80 or Middlebrook 7H11 plates with 10% OADC enrichment [5% (w/v) BSA fraction V, % (w/v) glucose, 0.85% (w/v) NaCl and 0.06% (v/v) oleic acid]. The medium was added to kanamycin 25 µg/ml when required.

4.3. DNA manipulations, transformation of *E. coli* and mycobacterial strains

DNA manipulations were done according to the standard methodologies described by Sambrook and Russell [37]. Genetic transformation of *E. coli* strains was induced to chemical competence as described elsewhere [38]. *M. smegmatis* mc² 155 was electroporated following the recommendations of Parish and Stoker [39].

4.4. Transcriptional fusions

Several 5' upstream intergenic *pe_pgrs33* PCR products were fused to green fluorescent protein gene by subcloning in the pFPV27 vector. Fragments of 245, 196, 150 and 69 bp were amplified by PCR from *M. tuberculosis* H37Rv genomic DNA with oligonucleotides including restriction enzyme sites (see Table 1). The fragments were then captured in pCR4-TOPO Blunt vector (Invitrogen™, Life Technologies, Inc.) and subcloned in the pFPV27 vector to obtain the plasmids described in Table 1. A 150 bp fragment was also subcloned in inverted position, the fragment was amplified by PCR with the oligonucleotides described in Table 1 and cloned under the conditions described. All transcriptional fusions were confirmed by automatic sequencing (Synthesis and Sequencing DNA Unit, Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México).

4.5. Oxygen depletion and nutrient starvation

M. smegmatis mc² 155 transformed with the different transcriptional fusions were grown in Middlebrook 7H9-ADC-Tween 80 with shaking at 37 °C. Culture aliquots of 1.5–2 ml were harvested in logarithmic (26–28 h) and stationary growth phases (48 h). Cultures taken at logarithmic phase were also submitted to oxygen depletion and nutrient starvation. Oxygen concentration was monitored by reduction of methylene blue, as described by Wayne and Hayes [40]. For nutrient starvation, bacterial cultures were washed twice and grown for 12 h in PBS (10 mM phosphate pH 7.4, 150 mM NaCl) as described elsewhere [31]. Cultures were collected by centrifugation at 6000 g for 5 min at room temperature (RT); pellets were washed twice with PBS and resuspended in 100 µl of the same buffer. Cells were disrupted by sonication in an ice bath for 30 s at 71.25 Watts of ultrasonic power in a VirSonic sonicator (Virtis™). The sample was centrifuged at 12 000 g for 5 min at RT and the supernatant was collected and quantified by the Lowry method.

5' upstream intergenic region*

Gene	Size of region (bp)	Gene	Sequences alignments
Rv0108c	278	PE_PGRS1	---AGCCGAATCCCGCAATGGCGCA---ACGTGCCCGGAAGCCGCT TACATT TGGCTCCTAGCAGCTTGCCC-----28-ATG
<i>mgo</i>	207	PE_PGRS48	---AAGACAATACCCCGTAGCCACACA---ATGTGCGTCCCTGGCCGCC TAGAAT CCGCACTATCCGCCAGTCC-----21-ATG
PE_PGRS20	362	Rv1069c	---GGAAAGATTTGTCGA ACTC -TGC---ATTTCCGTTCCGGGC-GTGC TAGACT CGCGCCATCAGCTTGACTCC-----42-ATG
Rv3651	754	PE_PGRS60	---CGAGGACTTTTGG AAA CCCAACGC---ACATGCTTCCCGGATAGCG ATAAGCT GGCGCTCCAGCAGATTGTCGG-----53-ATG
PE_PGRS25	255	Rv1397c	-----ACGTTTCTATA CACT TTACCAATGATGGCCATATATCACTGGCT TATGCT -GCAAGATCAGACAAGTCC-----30-ATG
iRNA ^{mtc}	665	PE_PGRS12	---TAGGGCAACCTCGTATTCCCGG---ATGTTGGGGCCCCGAGGGAT TACACT GGCTTCTCTGCTGATTCTCCCC-----64-ATG
PE_PGRS46	29	Rv2635	---TACGCGCCCGCGGCAAA TGG CTC---CGCCGCTCTGCGAGGGGG TAGGAT TTGTTGCTCGCGAGTGTCTCG-----46-ATG
PE_PGRS9	399	PE_PGRS10	---CCTCGAAACAGTGTGA AG CGCTGC-ATGCGGTGCC-GGATCG- CGATATCGT TGATTTCT-GCAATTAATTCC-----62-ATG
<i>fadD17</i>	171	PE_PGRS53	---GGAA TAAT CGGGTAG AA CCGCGCA-ATGAGCTGCCCGGATCG- CGATACGAT CCATTCCTAGCAATTCAGCC-----51-ATG
Rv0123	309	PE_PGRS2	---CGGCA AT TTTGGCG AA TAGGCCGT-GTGCGGTGCC-GGGTCG- CGCTACGTT CAGATTACCACTCAACTGTC-----56-ATG
Rv1086	177	PE_PGRS21	---GATCTGCCAGGTG AAA CCCGGTT-TTGGGATCTCGGATAG- CGATACCAT CGACTGATCCATCGCGGACA-----29-ATG
<i>celA2b</i>	415	PE_PGRS22	---ATTCTGCTC AT TGG AAA CCGGGTT-GATGGTGGGCGCTCAG- CGATACGAT CTGTGACCCCTGACGACATG-----29-ATG
PE_PGRS58	111	Rv3591c	---CGAAAAGCTGGCCATA AA CGGGTTT-TGTCG-GCCCGTGATCG- CGCTACGAT CGGGCCGTCAGGCCGCGCCG-----15-ATG
PE_PGRS29	242	<i>ctpD</i>	---GGTGCCTTACCCCG AAA CGGGTGA-AGCGGCCGCTG-GATCG- CGATAGAT ACGTCGGTCGCTAGCTCTTTC-----16-ATG
PE_PGRS33	135	Rv1819c	---GGGACGAGCTTCC AAA TCCGCGT-GCCCGCTTCCGTGATCG- CGATACGCT GAAATCCGTCGATCTCTGGGG-----61-ATG
PE_PGRS34	163	Rv1841c	---CTGATCAGTTGGCC AAA CGCCGGA-CGTGG-TGGCGGGA-CGT CAATACGCT GTAACCGCTGGGACTGGCGA-----23-ATG
Rv3387	190	PE_PGRS52	---GGGGCCCTGCGCG AAA ACCAGCA-CGTGA-TGCCGTGATCGCG ATACCC TCGACCCATTTGAGGGAGAA-----5-ATG
Wag22	576	Rv1760	---GTATGAGTCG-GGCTGG AAA CACCCG-TTGGGTGCTCTGCCCGC- CGATACGCT GATTCG-GACCCGATTCACCCG-----62-ATG
Rv2740	232	PE_PGRS47	---TGCGAAGTGTGGCG AAA CCGCAA-ATGCATCGCTCGGCCG-C ATAACGAT CCCCATGCACTGCTTGGAG-----56-ATG
PE_PGRS53	291	PE_PGRS54	---GGTGGCCGT-ACTGG AAA CCGTAGACGCTTGGGCGGGTGACGA ATAA-GAT CCTGGCTTAACTACTGCTC-----43-ATG
Rv3510c	360	PE_PGRS55	---TGGA TA CTCAGCA AA AGCTTGGACGATTTGGGCGGGTCTGAA ATTATGAT CCCGACACA ACT GCATCA AT -----45-ATG
<i>fadD18</i>	46	PE_PGRS57	---TCCGCGATT-ACC CA GA AA AGCCCGGCACATATTAGATGAGTGGCA CTAA-GGT TCTCACTTAAAGATGCCGCC-----47-ATG
PE_PGRS7	322	Rv579	---GATAGTTCGTTCCG TAA AGTTTG---GGGTTTGGCCCTTTGACG ATAGCCT CAAC-AAGGGATCGTTGGAGT-----101-ATG
Rv1767	181	PE_PGRS31	---TGTAAGTCCAGCG-GAA AT TGCGGG---CGCTGTTGGCCGATGGCG ATAGCCT TTGCCGAGGGTTCAATGGTG-----41-ATG
PE_PGRS39	499	iRNA ^{asn}	---CAGTAGG-CATGCCT GAA TGCTGGG---ATGTTCTGGTGCATCG ATAGGAT TCGGCGTGAACAACCGCGGCTC-----50-ATG
<i>spoU</i>	367	PE_PGRS51	---AATGAATCTGCCG AAA CCCCACG---CCGTTGGCCCATATTCG CTAGCAT CCGGGTGTTGTGATCTCGCA-----33-ATG
PE_PGRS4	291	<i>ppe3</i>	---GGAGATATTTGGG AAA TACCAAA---TCCCTTCCCGGGCCGGAG TATCT GTAGCCCGCGATTTTGTCT-----56-ATG
Rv2395	724	PE_PGRS41	---GGCGGTGATCTGGG AAA AGCCTTGA---TGTCTTCCCGCCCGAGT CTATAGT CAACTGCGCGATGGGTCAA-----62-ATG
Rv1982c	412	PE_PGRS35	---GCCGTAGCTACTG AAA ATCCGAGATGTC CA AAGGCAGCGTCT- GGATACGCT GTATGCGCCGCGGATGCTG-----19-ATG
Rv0531	147	PE_PGRS6	---TGCGCTGATCGTGG CA ATTCGCCCTCGGCCGCGATTTGGCGGCTC TACCGT TGGCTGCACCGGGTGTGGT-----16-ATG
PE_PGRS14	468	<i>lpqQ</i>	---TTGACGAGTGTCA ACT TCTGCTCCCGGTAGGCGCTATATGCGCG TATCGT AACGATGGGCGACAGTCA GA -----27-ATG
Rv3811	154	PE_PGRS62	---CATTCTGGCTCGGA AT TCGCCCGCGCATAGACACCCCTGTGCC ATTAGGCT CCATTTGCCCGGCTGATCAC-----34-ATG
PE_PGRS63	119	Rv3898c	---TTGGGAATTCCGCG AAA TGGCA-C---GTACTACTCGCGCGTGGCG ATAAGCT CCGGCTACTCCGCGATCGT-----46-ATG
PE_PGRS24	152	<i>glgB</i>	---CACACTCGACTCG GA GATGATCAGAAAGGCT AA AGCGATAGCG CTACCC TGTGCTAACTCGAGCTGGATA-----28-ATG
PE_PGRS30	194	<i>argC</i>	-----TCCGCGAAAACGTGCGTTTCCCTC CA CATGACATAAGACCC AACTAGGCT GAATTTCCCGTGACACA AGT -33-ATG
PE_PGRS19	333	PE_PGRS20	---CCAGCAATGGCG AAA CCGCCCGAGTTCGGGTGTGCGCTAG TAACT CGCAACTACATCACTCA AAA -----16-ATG
PE_PGRS32	181	Rv1804c	---CCGTGAATCTGGT GA TGCA ACC -CATAGCGGGTCCGCA AACTCTACGCT TGGCGTGGTTC CA AAA ATT -----47-ATG
PE_PGRS38	210	<i>pbpB</i>	---AAGCTCTTTAAG TA AGTGGCA-CATCCTCTTTT CAG ATGTT TAGGAT CGAAAGCCCGCTGCCGCGGCT-----50-ATG
Rv0745	20	PE_PGRS9	---GTCGTCTTCAG CA GTTCGGGTGACTTGTCTCAGAA AT CAGTGT CTATGGT CAATCGGGGGTGTCTGTGGCG-----51-ATG
Rv0976c	198	PE_PGRS16	---CGTTCCTGAGT CG AAAGCCGCGCTGCGCCGTCATTTGG AGT TAGAGTCCGGTTTCGCTACGGAGCCG-----32-ATG

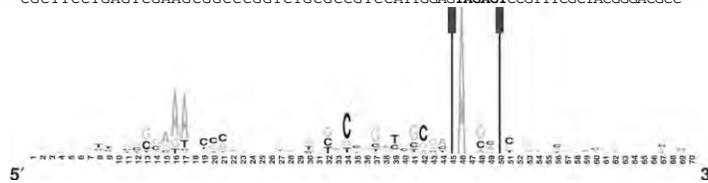


Fig. 5. Alignment of 5' upstream intergenic region of *M. tuberculosis* H37Rv PE_PGRS. Alignment of PE_PGRS 5' upstream intergenic regions containing –10 hexamers (in bold). Hexamers were considered if they matched with the first two and with the last position of the consensus (TA–T). In most of the sequences a poly-A stretch near to –35 boxes was present (underlined). The promoter sequence of *pe_pgrs33* was included in the alignment, in bold/italics the TSP experimentally determined is shown. Consensus sequence were obtained by using Weblogo software (<http://weblogo.berkeley.edu/logo.cgi>). *Underlying gene names correspond to 5' upstream region aligned.

4.6. Total RNA extraction from mycobacterial strains

To obtain total RNA, 5–10 ml of transformed *M. smegmatis* and *M. tuberculosis* cultures were collected directly into four volumes of GTC solution (4 M guanidium thiocyanate, 0.5% (w/v) sodium *N*-lauroyl sarcosine, 25 mM tri-sodium citrate pH 7.0, 0.1 M 2-mercaptoethanol and 0.5% (w/v) Tween 80 in RNase-free water) and the sample was incubated at RT for 10 min. After centrifugation, cells were resuspended in Trizol (Invitrogen™, Life Technologies Inc.), and disrupted with glass beads (<106 μm), acid-washed (Sigma), for 2 cycles of 15 s (setting of 6.5 m/s) using a FastPrep® instrument (Savant). RNA was extracted with chloroform and precipitated with isopropanol and treated with deoxyribonuclease I (DNase I amplification grade, Invitrogen™, Life Technologies Inc.). RNA integrity was visualized in an agarose-formaldehyde gel and quantified by spectrophotometer.

4.7. Detection of *pe_pgrs33*-Rv1819c transcripts

cDNA synthesis was carried out with 1 μg of *M. tuberculosis* total RNA in 20 μl of reaction volume containing 50 mM Tris–HCl, pH 8.3; 75 mM KCl; 3 mM MgCl₂; 10 mM DTT; 2 mM dNTPs; 100 U of

SuperScript^{MT} II Reverse Transcriptase (Invitrogen™, Life Technologies Inc.) and 2.5 mM of PERverse primer. This primer hybridized at the beginning of the *pe_pgrs33* gene (Table 1). The reaction was incubated for 30 min at 42 °C and enzymatic activity was eliminated to incubate at 70 °C for 15 min. cDNA fragments were amplified with a mixture of primers: RV1818R/RV1818S and RV1818R/RV1818F10 (size PCR products expected 69 and 245 bp respectively) in a reaction volume of 25 μl containing 10 mM Tris–HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.8 mM of the four dNTPs, 1.25 U Taq DNA polymerase (Roche Applied Science) and 4 μl of the cDNA synthesis reaction. Genomic DNA and total RNA from *M. tuberculosis* were also included in the PCR reaction as positive and negative controls respectively. The PCR products were separated in 1.5% (w/v) agarose-TAE buffer gels and EtBr stained.

4.8. Quantitative real-time RT-PCR (qRT-PCR) of *gfp* in *M. smegmatis mc² 155* and the *pe_pgrs33* in the *M. tuberculosis* and their *sigD* mutant

M. tuberculosis CDC1551 and *sigD* isogenic mutant were donated by Dr. William Bishai from Center for Tuberculosis Research Dept. of Medicine, Div. of Infectious Diseases Johns Hopkins School of

Table 1
Plasmids and primers used in the present work.

Plasmid	Size (kb)	Marker	Description	References
pUC18	2.69	Amp ^R	Multiproposite vector	[42]
pSR52	6.74	Amp ^R	Expression RNA polymerase His-tagged α subunit	[25]
pJF09	9.16	Amp ^R	Expression RNA polymerase β subunit	[25]
pJF10	9.23	Kan ^R	Expression RNA polymerase β' subunit	[25]
pSR02	6.99	Kan ^R	Expression His-tagged sigma factor A	[25]
pCR4-TOPO Blunt	3.95	Amp ^R and Kan ^R	Cloning of blunt-end PCR products	Invitrogen
pFPV27	4.91	Kan ^R	Promoter trapping shuttle vector	[43]
pFPV27-Phsp60		Kan ^R	pFPV27 containing promoter sequence of HSP60	Lab stock
pCA18-69	4.97	Kan ^R	pFPV27 containing 69 bp upstream PE_PGRS33	This work
pCA18-150	5.06	Kan ^R	pFPV27 containing 150 bp upstream PE_PGRS33	This work
pCA18-196	5.10	Kan ^R	pFPV27 containing 196 bp upstream PE_PGRS33	This work
pCA18-245	5.15	Kan ^R	pFPV27 containing 245 bp upstream PE_PGRS33	This work
pCA18-150In	5.06	Kan ^R	pFPV27 containing 150 bp upstream PE_PGRS33 in inverted orientation	This work
Primer name	Sequence	Restriction enzyme	Employed	
RV1818R	TATGT GATATC TGGCACCTCGTCAACAC	EcoRV	All constructions	
RV1818FS	TAT GCGGCCG CTGGGAGTGACCAAGC	NotI	69	
RV1818F	TAT GCGGCCG CCGAAGTGTAAAGCC	NotI	150	
RV1818F05	T AGGATC CTACTCGGTGGCCGCCAAT	BamHI	196	
RV1818F10	T AGGATC CGTCAGCCATCGCCCG	BamHI	245	
RV1818RI	AT GCGGCCG CTGGCACCTCGTCAAC	NotI	150Inv	
RV1818FI	TATGT GATATC GAAAGTGTAAAGCCGG	EcoRV	150Inv	
PERReverse	TAGGATCCCTAGTGGCTCCGTTACCGAT		cDNA synthesis	
RV1818RB	TATGTGATATCTGGCACCTCGTCAACAC		cDNA synthesis	
GFPCDNA	CATGGCACTCTGAAAAAGTCATGC		cDNA synthesis	
Oligo d(T)-anchor	GACCACGGTATCGAT GTCGACTT TTTTTTTTTTTTT	Sall	5'-RACE	
PCR-anchor	GACCACGGTATCGAT GTCGACTT	Sall	5'-RACE	
RV1818RTR	CCAAATCGGTCCGCCACC		qRT-PCR	
RV1818RTF	ATGTCATTTGTGGTCACGA		qRT-PCR	
RPOBTR	ACGTGCCCTCTCCGGTC		qRT-PCR	
RPOBRTF	CAGACGGTGTTCATGGGTGA		qRT-PCR	
rpoBmSmF	CGAAGCTATACCAATAACTCCG		qRT-PCR	
rpoBmSmR	ACTCGAAGGAATCCGTCTGAAC		qRT-PCR	
GFP27F	GATGGAAGCGTTCAACTAGCAGAC		qRT-PCR	
GFP27R	GTGTGGACAGGTAATGGTTGTC		qRT-PCR	

Medicine [32]. Bacteria were grown in Middlebrook 7H9-ADC-Tween 80 with shaking at 37 °C, and harvested in stationary phase (3 weeks). RNA obtention was carried out as described above. 250 ng of RNA total of *M. smegmatis* mc² 155 transformed with transcriptional fusions and *M. tuberculosis* CDC1551 and their *sigD* mutant were used to cDNA synthesis with respective primers (see Table 1) and SuperScript^{MT} II Reverse Transcriptase (InvitrogenTM, Life Technologies Inc.) in same manner described above. A volume of the cDNA synthesis reaction corresponding to 50 ng of RNA was used in the PCR reaction employed Taq DNA polymerase (PCR Master Mix, Promega). Amplification of PCR products was monitored by incorporation of SYBR Green I with LightCycler[®] 480 thermocycler (Roche Applied Science). For each messenger a melting-curve analysis was done to demonstrate specificity and an assay using cDNA dilutions was also carried out to determine the

efficiency of the PCR amplification. Threshold cycle values of the sample were used to calculate the relative units of expression (URE) by the comparative ($\Delta\Delta C_T$) method [41].

4.9. Detection of Green fluorescent protein (GFP) by western blot

Eight μ g of total proteins from soluble fractions were separated by electrophoresis in 12% SDS-PAGE and transferred to an immobilon polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane (Millipore). For GFP detection, the distained membrane was pre-incubated with PBS-T-BSA (PBS with 0.05 (v/v) % Tween 20 and 3% (w/v) BSA) for 20 min in constant agitation at RT and then incubated in the same conditions for 2 h in presence of 1:2000 dilution of mouse anti-GFP antibody (Zymed); after 3 washes with cold PBS-T (PBS with 0.05% (v/v) Tween 20), the membrane was incubated for 1 h with a 1:1000 dilution of goat anti-mouse horseradish peroxidase (HRP) conjugated antibody (Zymed). After 3 washes with cold PBS-T reactivity was revealed with 3 mg/ml of 3,3-diaminobenzidine (Sigma) and 30% hydrogen peroxide (Merck) 1:1000 diluted in PBS-T. The dry membrane was scanned in HP-Scanjet 4670 (Hewlett-Packard) and band pixel density was detected and quantified by using free software ImageJ (Wayne Rasband; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>).

4.10. 5'-Rapid amplification of cDNA end (5'-RACE)

A 5'-RACE assay was performed with a 5'/3'RACE Kit 2nd Generation (Roche Applied Science) following the recommendation of the manufacturer with a few modifications. One μ g samples of total RNA from *M. tuberculosis* and *M. smegmatis* transformed with the pCA18-150 and pCA18-245 vectors (Table 1) were used for cDNA synthesis with PERReverse or GFPCDNA (Table 1) primer respectively. Purified cDNA (Qiagen) was poly-A tailed and amplified by PCR with Oligo-(T)-anchor and RV1818R primers (Table 1). When necessary, PCR products were re-amplified with PCR-anchor and RV1818R primers. PCR products were purified (Qiagen) and after Sall digestion, the fragment was cloned in pUC18 vector (SmaI-Sall digested). Finally, 2–4 clones per 5'-RACE reaction were sequenced. The sequences were then aligned to the upstream start codon sequence of *pe_pgrs33*.

4.11. Expression and purification of recombinant RNA polymerase and sigma factor A

Vectors containing the coding sequences for RNA polymerase subunits, and sigma factor A (Table 1) were donated by Dr. S. Rodrigue from the Centre de Recherche sur le Mécanismes du Fonctionnement Cellulaire. Université de Sherbrooke, QC, Canada. The expression, purification and reconstitution of RNA polymerase subunits and sigma factor were performed according to the protocol described by Jacques et al. with slight modifications [25]. Briefly, RNA polymerase α subunit were expressed in *E. coli* BL21 (DE3) pLysS and RNA polymerase β , β' subunits and SigA in *E. coli* Rosetta (DE3). Expression of the proteins was induced at logarithmic phase with 250 μ M IPTG. His-tagged recombinant proteins were purified in EDTA-free buffers in a Chelating SepharoseTM Fast Flow matrix (Amersham Pharmacia Biotech). For reconstitution of RNA polymerase, 20 nmol of α , 10 nmol β and 10 nmol β' subunits were incubated in 10 ml reaction buffer; then, the complex was purified by metal affinity by binding of the His-tag α subunit to Chelating SepharoseTM Fast Flow matrix. After elution, the purified complex was dialyzed and concentrated as described [25]. 40 nmol of sigma factor were folded into the same volume buffer, dialyzed, concentrated and stored in similar conditions.

4.12. *In vitro* transcription run assay

The *in vitro* transcription run assay used in this work was adapted from Jacques et al. with some modifications [25]. Promoter sequence (245 bp PCR product agarose-gel purified (Qiagen), 22.5 pmol RNA polymerase, 3 pmol sigma factor were mixed in transcription reaction buffer (45 mM Tris–HCl, pH 7.9, 5 mM MgCl₂, 75 mM KCl, 1 mM DTT, 250 µg/ml BSA, 13% (v/v) glycerol) to a final volume of 40 µl. The mixture was incubated at 37 °C for 30 min and the transcription reaction was initiated by addition of 4 µl of 1.5 mM of rNTPs. For the transcript generation reaction it was incubated in the same conditions for 30 min. For transcript detection, RNA was extracted with 500 µl of Trizol (Invitrogen™, Life Technologies Inc.), according to the manufacturer's instructions. cDNA was synthesized with a biotin-labeled oligonucleotide RV1818RB. Total reaction of cDNA synthesis was separated in denatured 10% acrylamide/bis-acrylamide (19:1)–TBE gel and electrotransferred to a nylon membrane. The biotin-labeled *in vitro* transcript was detected with BrighStar^{MT} BioDetect^{MT} (Ambion) according to the manufacturer's instructions.

4.13. Comparative sequence analysis of intergenic regions of PE_PGRS genes

Three hundred bp of the 5' upstream start codon of the *pe-pgrs* genes were obtained from the Tuberculist database (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList>). We searched for the presence of a promoter element identified in the intergenic regions of *pe_pgrs33*. Sequences were considered for alignment only if they matched with the first two and with the last position of the consensus (TA–T). Additional to these consensus sequence 20 bp downstream and 44 bp upstream were alignment (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw/index.html>).

Acknowledgements

We are grateful to Cristina Parada for technical assistance and to Isabel Perez Montfort for reviewing the English version of the manuscript. This work was supported by grants from CONACyT (46739–M) and DGPA (IN221107) Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- Brenan MJ, Gey van Pittius NC, Espitia C. The PE and PPE multigene families of mycobacteria. In: Cole ST, Eisenach KD, McMurray DN, Jacobs Jr WR, editors. Tuberculosis and tubercle bacillus. Washington, DC: ASM Press; 2005. p. 513–25.
- Camus JC, Pryor MJ, Médigue C, Cole ST. Re-annotation of the genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Microbiology 2002;148(Pt 10):2967–73.
- Cole ST, Brosch R, Parkhill J, Garnier T, Churcher C, Harris D, et al. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. Nature 1998;393(6685):537–44.
- Fleischmann RD, Alland D, Eisen JA, Carpenter L, White O, Peterson J, et al. Whole-genome comparison of *Mycobacterium tuberculosis* clinical and laboratory strains. J Bacteriol 2002;184(19):5479–90.
- Gey van Pittius NC, Sampson SL, Lee H, Kim Y, van Helden PD, Warren RM. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. BMC Evol Biol 2006;6:95.
- Banu S, Honore N, Saint-Joanis B, Philpott D, Prevost MC, Cole ST. Are the PE-PGRS proteins of *Mycobacterium tuberculosis* variable surface antigens? Mol Microbiol 2002;44(1):9–19.
- Flores J, Espitia C. Differential expression of PE and PE_PGRS genes in *Mycobacterium tuberculosis* strains. Gene 2003;318:75–81.
- Rodriguez MG, Voskuil MI, Gold B, Schoolnik GK, Smith I. *ideR*, an essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of *IdeR* in iron-dependent gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. Infect Immun 2002;70(7):3371–81.
- Saviola B, Woolwine SC, Bishai WR. Isolation of acid-inducible genes of *Mycobacterium tuberculosis* with the use of recombinase-based *in vivo* expression technology. Infect Immun 2003;71(3):1379–88.
- Triccas JA, Berthet FX, Pelicic V, Gicquel B. Use of fluorescence induction and sucrose counterselection to identify *Mycobacterium tuberculosis* genes expressed within host cells. Microbiology 1999;145(Pt 10):2923–30.
- Voskuil MI, Schnappinger D, Rutherford R, Liu Y, Schoolnik GK. Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis* PE/PPE genes. Tuberculosis (Edinb) 2004;84:256–62.
- Gazdik MA, McDonough KA. Identification of cyclic AMP-regulated genes in *Mycobacterium tuberculosis* complex bacteria under low-oxygen conditions. J Bacteriol 2005;187(8):2681–92.
- Mälen H, Berven FS, Fladmark KE, Wiker HG. Comprehensive analysis of exported proteins from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. Proteomics 2007;10:1702–18.
- Mawuenyega KG, Forst CV, Dobos KM, Belisle JT, Chen J, Bradbury EM, et al. *Mycobacterium tuberculosis* functional network analysis by global subcellular protein profiling. Mol Biol Cell 2005;16(1):396–404.
- Espitia C, Lacllette JP, Mondragon-Palomino M, Amador A, Campuzano J, Martens A, et al. The PE-PGRS glycine-rich proteins of *Mycobacterium tuberculosis*: a new family of fibronectin-binding proteins? Microbiology 1999;145(Pt 12):3487–95.
- Sasseti CM, Boyd DH, Rubin EJ. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. Mol Microbiol. 2003;48(1):77–84.
- Brennan MJ, Delogu G, Chen Y, Bardarov S, Kriakov J, Alavi M, et al. Evidence that mycobacterial PE_PGRS proteins are cell surface constituents that influence interactions with other cells. Infect Immun 2001;69(12):7326–33.
- Delogu G, Pusceddu C, Bua A, Fadda G, Brennan MJ, Zanetti S. Rv1818c-encoded PE_PGRS protein of *Mycobacterium tuberculosis* is surface exposed and influences bacterial cell structure. Mol Microbiol 2004;52(3):725–33.
- Dheenadhayalan V, Delogu G, Brennan MJ. Expression of the PE_PGRS33 protein in *Mycobacterium smegmatis* triggers necrosis in macrophages and enhanced mycobacterial survival. Microbes Infect 2006;8(1):262–72.
- Basu S, Pathak SK, Banerjee A, Pathak S, Bhattacharyya A, Yang Z, et al. Execution of macrophage apoptosis by PE_PGRS33 of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by Toll-like receptor 2-dependent release of tumor necrosis factor- α . J Biol Chem 2007;282(2):1039–50.
- Raman S, Hazra R, Dascher CC, Husson RN. Transcription regulation by the *Mycobacterium tuberculosis* alternative sigma factor SigD and its role in virulence. J Bacteriol 2004;186(19):6605–16.
- Gomez M, Smith I. Determinants of mycobacterial gene expression. In: Hatfull GF, Jacobs Jr WR, editors. Molecular genetics of mycobacteria. Washington, DC: ASM Press; 2000. p. 111–29.
- Gonzalez-y-Merchand JA, Colston MJ, Cox RA. The rRNA operons of *Mycobacterium smegmatis* and *Mycobacterium tuberculosis*: comparison of promoter elements and of neighbouring upstream genes. Microbiology 1996;142(Pt3):667–74.
- Gonzalez-y-Merchand JA, Garcia MJ, Gonzalez-Rico S, Colston MJ, Cox RA. Strategies used by pathogenic and nonpathogenic mycobacteria to synthesize rRNA. J Bacteriol 1997;179(22):6949–58.
- Jacques JF, Rodrigue S, Brzezinski R, Gaudreau L. A recombinant *Mycobacterium tuberculosis* *in vitro* transcription system. FEMS Microbiol Lett 2006;255(1):140–7.
- Delogu G, Brennan MJ. Comparative immune response to PE and PE_PGRS antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun 2001;69(9):5606–11.
- Talarico S, Cave MD, Foxman B, Marrs CF, Zhang L, Bates JH, et al. Association of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS33 polymorphism with clinical and epidemiological characteristics. Tuberculosis (Edinb) 2007;87(4):338–46.
- Strong M, Sawaya MR, Wang S, Phillips M, Cascio D, Eisenberg D. Toward the structural genomics of complexes: crystal structure of a PE/PPE protein complex from *Mycobacterium tuberculosis*. Proc Natl Acad Sci U S A 2006;103(21):8060–5.
- Dheenadhayalan V, Delogu G, Sanguinetti M, Fadda G, Brennan MJ. Variable expression patterns of *Mycobacterium tuberculosis* PE_PGRS genes: evidence that PE_PGRS16 and PE_PGRS26 are inversely regulated *in vivo*. J Bacteriol 2006;188(10):3721–5.
- Hernandez-Abanto SM, Woolwine SC, Jain SK, Bishai WR. Tetracycline-inducible gene expression in mycobacteria within an animal host using modified *Streptomyces* tcp830 regulatory elements. Arch Microbiol 2006;186:459–64.
- Betts JC, Lukey PT, Robb LC, McAdam RA, Duncan K. Evaluation of a nutrient starvation model of *Mycobacterium tuberculosis* persistence by gene and protein expression profiling. Mol Microbiol 2002;43(3):717–31.
- Calamita H, Ko C, Tyagi S, Yoshimatsu T, Morrison NE, Bishai WR. The *Mycobacterium tuberculosis* SigD sigma factor controls the expression of ribosome-associated gene products in stationary phase and is required for full virulence. Cell Microbiol 2005;7(2):233–44.
- Voskuil MI, Visconti KC, Schoolnik GK. *Mycobacterium tuberculosis* gene expression during adaptation to stationary phase and low-oxygen dormancy. Tuberculosis (Edinb) 2004;84(3–4):218–27.
- Bashyam MD, Kaushal D, Dasgupta SK, Tyagi AK. A study of mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. J Bacteriol 1996;178(16):4847–53.
- Hu Y, Coates AR. Transcription of two sigma 70 homologue genes, sigA and sigB, in stationary-phase *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol 1999;181(2):469–76.
- Rodrigue S, Brodeur J, Jacques PE, Gervais AL, Brzezinski R, Gaudreau L. Identification of mycobacterial sigma factor binding sites by chromatin immunoprecipitation assays. J Bacteriol 2007;189(5):1505–13.
- Sambrook J, Russell DW. Molecular cloning: a laboratory manual. 3th ed. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory; 2001.

- [38] Hanahan D, Jessee J, Bloom FR. Plasmid transformation of *Escherichia coli* and other bacteria. *Methods Enzymol* 1991;204:63–113.
- [39] Parish T, Stoker NG. Electroporation of mycobacteria. In: Parish T, Stoker NG, editors. *Methods in molecular biology. Mycobacterial protocols*, vol. 101. Totowa, NJ: Humana Press Inc; 1998. p. 129–44.
- [40] Wayne LG, Hayes L. An in vitro model for sequential study of shutdown of *Mycobacterium tuberculosis* through two states of nonreplicating persistence. *Infect Immun* 1996;64(6):2062–9.
- [41] Qiagen. Integrative solutions – real-time PCR applications. Critical factors for successful real-time PCR [online]. Available from: http://www1.qiagen.com/literature/brochures/pcr/QT/1037490_AG_PCR_0206_Int_lr.pdf; 2006.
- [42] Norrander J, Kempe T, Messing J. Construction of improved M13 vectors using oligodeoxynucleotide-directed mutagenesis. *Gene* 1983;26(1):101–6.
- [43] Valdivia RH, Hromockyj AE, Monack D, Ramakrishnan L, Falkow S. Applications for green fluorescent protein (GFP) in the study of host-pathogen interactions. *Gene* 1996;173(1):47–52.