

03081

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO 4



COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS
PROYECTO DE DOCTORADO EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DEL GEN QUE
CODIFICA PARA LA PROTEÍNA DE 38 kDa (PstS-1)
Y EL REGULÓN *pho* de *Mycobacterium tuberculosis*.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMÉDICA BÁSICA
P R E S E N T A :
M. en B. ASCENCION TORRES ESCOBAR

DIRECTOR DE LA TESIS: DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON

2960

MEXICO, D. F.

2001



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

ING. LEOPOLDO SILVA GUTIERREZ

Director General de la
Administración Escolar
Presente.

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión del Subcomité Académico del Doctorado en Ciencias Biomédicas que se llevó a cabo el día 7 de febrero del presente año, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Investigación Biomédica Básica del Maestro en Biotecnología **ASCENCIÓN TORRES ESCOBAR**, con no. de cuenta 9380837-2 y no. de expediente 30932035 con la tesis titulada: "Caracterización molecular de la proteína de 38kDa (PstS) y el regulon *pho* de *Mycobacterium tuberculosis*", dirigida por la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Presidente:	Dr. Moisés Selman Lama
Secretario:	Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
Vocal:	Dra. Laura Camarena Mejía
Vocal:	Dra. Adela Rodríguez Romero
Vocal:	Dr. Jorge Nieto Sotelo
Suplente:	Dra. Iris Estrada García
Suplente:	Dr. Guillermo Ruíz Palacios

Atentamente,

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 12 de febrero del 2001.

Dr. J. Javier Espinosa Aguirre
Responsable en el Instituto de
Investigaciones Biomédicas

Dr. César Domínguez Pérez Tejada
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas
COMITE ACADÉMICO

c.e.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

El presente trabajo se realizó principalmente en el Laboratorio de la Dra Clara Inés Espitia Pinzón, del Departamento de Inmunología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México, México, D.F. Otra parte del trabajo se hizo con el Dr. Guillermo Ruiz-Palacios en el Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición “Salvador Subirán”. México D.F.

Este trabajo fue asesorado por el siguiente Comité Tutorial:

Dra Clara Inés Espitia Pinzón, Tutor principal.

Dr. Jorge F. Calderón Jiménez, Cotutor.

Dr. Roberto Hernández Fernández, Cotutor.

Durante este trabajo el autor fue becario de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y se le aprobó un presupuesto, con número de proyecto 030324 por la DGAPA de \$ 25,000 (veinticinco mil pesos moneda nacional) para la realización de su trabajo.

Dedico esta Tesis a la memoria de:

Dr. Lino Díaz de León

Dr. Jorge F. Calderón Jiménez

que en paz descansen.

Agradezco a los investigadores que me brindaron la oportunidad de continuar mi desarrollo académico:

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios.

Dr. Jesús Reynaga Obregón.

Dra. Amelia Farres.

Dr. Lino Díaz de León.

Lic. Jorge Pérez de la Mora.

Dra. Edda Sciutto Conde y su Grupo.

Dr. Juan Pedro Laclette San Roman y su Grupo.

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Dr. Carlos Larralde.

QFB. Mercedes Baca Ladrón de Guevara.

***AL JURADO DE ESTA TESIS QUE CON SUS OBSERVACIONES MEJORARON
LA CALIDAD DE LA MISMA.**

Agradezco especialmente:

A Maria Dolores Juárez Rodríguez (Lolita) por todo su apoyo bondadoso que me ha brindado y a su familia.

A mi familia.

A mis compañeros y amigos.

A el Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y su Grupo.

RESUMEN

La proteína PstS-1 codificada por el gen *pstS-1*, es uno de los antígenos inmunodominantes de *Mycobacterium tuberculosis* más relevante en cuanto a su aplicación potencial para el inmunodiagnóstico e inmunoprofilaxis de la tuberculosis. La PstS-1 tiene 30 por ciento de identidad con la proteína PstS de *Escherichia coli*. En el genoma de *M. tuberculosis* fueron identificados varios genes análogos al operón *pst* (phosphate specific transport) de *E. coli* (*pstS/pstC/pstA/pstB/phoU*), los cuales probablemente conforman el operón *pst* de *M. tuberculosis* (*pstB/pstS-1/pstC-1/pstA*).

El objetivo principal del presente trabajo fue el de iniciar el estudio de los mecanismos mediante los cuales *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en condiciones limitantes de fosfato y establecer la posible participación de las proteínas involucradas en la relación huésped-bacteria. Puesto que el gen *pstS-1* fue detectado únicamente en *M. bovis* y *M. tuberculosis*, se eligieron *M. smegmatis* y *M. vaccae*, micobacterias no patógenas y de rápido crecimiento como huéspedes alternativos para estudiar los genes involucrados en el metabolismo y regulación de fosfato de *M. tuberculosis*. Se estableció que ambas bacterias regulan la captación de fosfato ya que la actividad de la fosfatasa alcalina fue detectada únicamente en limitación de fosfato.

A partir de una genoteca de *M. tuberculosis* que construimos en el cósmido pYUB328, se obtuvo el probable operón *pst*. Se construyeron fusiones traduccionales de diferentes regiones del operón con el gen reportero *lacZ* de *E. coli*. A través de la cuantificación de la actividad de la beta-galactosidasa en *M. smegmatis* transformadas con las diferentes fusiones traduccionales, se mostró que las proteínas PstB, PstS-1, PstC-1, PstA incrementan su expresión en escasez de fosfato y la disminuyen considerablemente en alto fosfato. Así mismo se estableció que la expresión de estos genes fue dirigida por dos probables regiones promotoras, una arriba del codón de inicio del gen *pstB* y la otra arriba del gen *pstS-1*. Por otra parte, se determinó que la proteína recombinante PstS-1 es muy similar a la proteína nativa en cuanto a su antigenicidad y propiedades bioquímicas como glicosilación y secreción.

Los resultados obtenidos en este trabajo abren perspectivas importantes en el uso de micobacterias saprófitas para el estudio de la regulación de los sistemas genéticos potencialmente importantes en la interacción de la relación huésped-bacteria.

SUMMARY

The PstS-1 protein coded by the *pstS-1* gene is one of the most immunodominant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* with a very high relevancy in immunoprophylaxis and immunodiagnosis of tuberculosis. The PstS-1 showed 30 percent of identity with PstS protein of *Escherichia coli*. In the *M. tuberculosis* genome different analogues genes to the *E. coli pst* (phosphate specific transport) operon (*pstS/pstC/pstA/pstB/phoU*), have been identified. These genes are organized in the putative *pst* operon of *M. tuberculosis* (*pstB/pstS-1/pstC-1/pstA*).

The main goal of this work was to begin the study of the mechanisms involved in the survival of *M. tuberculosis* in phosphate starvation conditions and in addition to establish the possible participation of the involved proteins in the host-bacteria relationship. Since the *pstS-1* gene was only detected in *M. bovis* and *M. tuberculosis*, *M. smegmatis* and *M. vaccae*, the fast growth and non-pathogenic mycobacteria, they were chosen as a potential surrogates host to study the *M. tuberculosis* genes involved in metabolism and phosphate regulation because, the alkaline phosphatase activity was only detected in bacteria grew in phosphate starvation conditions.

A genomic library of *M. tuberculosis* was made in pYUB328 cosmid. The *pst* was cloned and different translational fusion of the operon regions were carried out with the *E. coli* structural *lacZ* reporter gene. The beta-galactosidase activity in transformed *M. smegmatis* showed that the PstB, PstS-1, PstC-1, PstA proteins increased their expression in phosphate starvation. It was also defined that the expression of the *pst* genes are probably driving by two promoter regions one upstream of the start codon of the *pstB* gene and the other upstream of the *pstS-1* gen. In the other hand, it was determined that the recombinant PstS-1 was very similar to the native protein in both antigenic and biochemical properties. As native protein the recombinant was glycosilated and secreted to the culture medium and it was recognized by tuberculosis patient's sera.

Taken together these results, they open possibilities to study the regulation and expression of *M. tuberculosis* genes in non-pathogenic mycobacteria.

C O N T E N I D O.

Página

I.- INTRODUCCION.....	1
1.- Patogénesis de <i>M. tuberculosis</i> .	2
2.- Avances biotecnológicos para para el estudio de los microorganismos	2
3.- Estudios realizados con la proteína PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> .	3
4.- El regulón de fosfato en <i>E. coli</i> .	6
A.- La porina de membrana externa, PhoE, permite la entrada del fosfato orgánico.	7
B.- La fosfatasa alcalina (PhoA), hidroliza el enlace ester P-O presente en los órganofosfatos	7
C.- El sistema de transporte del fosfato inorgánico, Pst, es activo en limitaciones de fosfato.	7
D.- Los genes del regulón <i>pho</i> son regulados por las proteínas PhoB y PhoR.	10
5.- Implicación del regulón <i>pho</i> en la virulencia.	11
6.- El regulón de fosfato en <i>M. tuberculosis</i> .	11
II.- JUSTIFICACION.	12
III.- ANTECEDENTES.	13
1.- Clonación del gene <i>pstS-1</i> (38KDa, 36KDa, Pab, antígeno 5, anígeno 78).	13
IV.- OBJETIVOS GENERALES.	16
V .- OBJETIVOS ESPECIFICOS	16
VI.- MATERIALES Y METODOS.	17
1.- Crecimiento de micobacterias.	17
2.- Obtención del ADN de las micobacterias.	20
3.- Generación de los plásmidos pAT95, pAT51 pAT96 y pAT97.	20
4.- Preparación de células competentes.	21
5.- Condiciones de electroporación.	23
6.- Construcción de la genoteca de <i>M. tuberculosis</i> en el cósmido pYÜB328	23
7 - Identificación de los cósmidos recombinantes conteniendo el operón <i>pst</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	28
8.- Construcción de las fusiones traduccorales.	29

9.- Condiciones de crecimiento bacteriano con y sin fosfato.	36
10.- Medición de las actividades enzimáticas	39
11.- Extractos bacterianos	40
12.- Western blot.	41
13.- Separación de las proteínas por electroforesis de Doble Dimensión	42
14.- Otros reactivos.	42
VII.- RESULTADOS.	43
1.- Análisis del gen <i>pstS-1</i> en el género <i>Mycobacterium</i> .	43
2.- Expresión de la fosfatasa alcalina en <i>M. smegmatis</i> y <i>M. vaccae</i>	43
3.- Expresión de la proteína PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> en <i>E. coli</i>	45
4.- Secuencia nucleotídica de las 650 b arriba del codón de inicio del gen <i>pstS-1</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	49
5.- Estudios de complementación para analizar si la proteína PhoB de <i>E. coli</i> reconoce alguna región promotora del locus <i>pst</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	49
6.- Análisis de las fusiones traduccionales.	50
7.- Expresión de la proteína recombinante PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> en <i>M. smegmans</i>	54
8.- Características de la proteína PstS-1 de <i>M. tuberculosis</i> expresada en <i>M. smegmatis</i> .	55
VIII.- DISCUSION.	58
IX.- CONCLUSIONES.	66
X.- PERSPECTIVAS.	67
XI.- BIBLIOGRAFIA.	69
XII.- ANEXO.....	82
<p>Apéndice I Molecular analysis of <i>Mycobacterium tuberculosis</i> phosphate specific transport system in <i>Mycobacterium smegmatis</i>. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1) Ascención Torres, María Dolores Juárez, Rafael Cervantes & Clara Espitia. Microbial Pathogenesis 2001, 30: 289-297</p>	

I.- INTRODUCCION.

Las enfermedades infecciosas continúan siendo un problema de salud a nivel mundial, principalmente en los países subdesarrollados y recientemente en los países económicamente estables. Algunos de los factores que repercuten en el incremento de estas enfermedades son: las migraciones de población, hacinamiento, condiciones de vida deficientes de ciertos grupos de la sociedad, desnutrición, programas sanitarios mal planeados y ejecutados, el uso indiscriminado de antibióticos y por lo tanto, la aparición de nuevas cepas resistentes.

Una de las enfermedades con mayor índice de morbilidad y mortalidad en el mundo relacionada con los problemas anteriores es la tuberculosis, causada por el bacilo ácido-alcohol resistente, *Mycobacterium tuberculosis*, que fue una de las primeras bacterias identificadas como agente etiológico de una enfermedad. A pesar de esto y de contar con una vacuna y una quimioprofilaxis adecuada para tratar la enfermedad, se ha reportado por estudios realizados en 212 países que el 32% del total de la población está infectada con *Mycobacterium tuberculosis* y que el 23% de esta población muere a consecuencia de la tuberculosis. En 1999 se reportaron 8.4 millones de nuevos casos a nivel mundial y se estiman 10.2 millones para el año 2005 (Dye *et al.*, 1999; WHO reporte del 2001). Los resultados de la vacunación a nivel mundial no han sido reproducibles, la eficacia de la vacunación ha variado desde un 90% en Gran Bretaña, hasta 0% de protección en la India (Bloom, 1994; Andersen P, 2001). El abandono y descuido de la profilaxis con drogas por los pacientes con tuberculosis, también ha provocado el surgimiento de cepas multirresistentes a diferentes antibióticos. El incremento de esta enfermedad obedece además a que los pacientes con el virus de la inmunodeficiencia adquirida son blancos para diferentes agentes infecciosos incluyendo las micobacterias (Dye *et al.*, 1999; WHO reporte del 2001).

Basándose en estas observaciones, la Organización Mundial de Salud estableció que la caracterización funcional e inmunológica de los compuestos micobacterianos es

una prioridad en el programa de control y erradicación de la tuberculosis. Esto con el objetivo de identificar antígenos o moléculas con un uso potencial para el inmunodiagnóstico y generación de nuevas vacunas (Harboe and Wiker, 1992).

1.- Patogénesis de *M. tuberculosis*.

La infección por *M. tuberculosis* se lleva a cabo principalmente a través de las vías respiratorias (por aerosoles), esta bacteria se aloja en los pulmones, siendo fagocitada por los macrófagos alveolares. La interacción de *M. tuberculosis* con el sistema inmune del huésped y su sobrevivencia dentro del macrófago son críticas para el desarrollo de la enfermedad o eliminación de la bacteria. La sobrevivencia dependerá de la activación o represión de los sistemas genéticos de *M. tuberculosis* para inhibir la actividad bactericida del macrófago (Silva *et al.*, 2001).

2.- Avances biotecnológicos para el estudio de los microorganismos.

Los avances inmunológicos han permitido la identificación de antígenos de *M. tuberculosis* que son objeto de evaluación en la búsqueda de nuevas técnicas de inmunodiagnóstico y control de esta enfermedad. Por otra parte, el desarrollo de nuevas herramientas moleculares (transferencia génica, técnicas de mutagénesis, bancos genómicos, amplificación del ácido desoxirribonucleico, ADN, por la reacción en cadena de la enzima DNA polimerasa, secuenciación del ADN) aplicadas al género *Mycobacterium*, han permitido iniciar el estudio de factores de virulencia y otros aspectos de la patogenia de esta bacteria (Halfull y Jacobs, 2000).

En los últimos años, las investigaciones en el área biomédica, biotecnológica e informática, también han contribuido al desarrollo de nuevas técnicas y establecimiento de nuevas estrategias para estudiar a los microorganismos patógenos. Por ejemplo la manipulación del ADN recombinante y el desarrollo de la secuenciación automática a gran escala, han permitido la secuenciación completa del genoma de varias bacterias y

avanzar en la del genoma humano. Esto ha brindando la oportunidad de estudiar específicamente y con una perspectiva global, la regulación genética mediante otras metodologías novedosas aplicadas a diferentes organismos, como el análisis global de proteínas a través de geles desnaturizantes de poliacrilamida de doble dimensión (preotome) (Van Bogelen *et al.*, 1996; Antelmann *et al.*, 2000) y las micro-agrupaciones genómicas en portaobjetos (microarrays). Esta última metodología abre la posibilidad de identificar mediante la fijación del ADN en portaobjetos y su posterior hibridación con el ácido ribonucleico mensajero ARNm o ADN complementario (que son las moléculas blanco obtenidas bajo las condiciones específicas en estudio), genes involucrados en diferentes condiciones de estrés, o caracterizar vías metabólicas esenciales para los diferentes microorganismos, lo que posiblemente permitirá generar nuevas drogas para inhibir o bloquear vías esenciales para el crecimiento de los microorganismos in vivo (Sчена *et al.*, 1995; Sचना *et al.*, 1996; Lipshutz *et al.*, 1995; de Saizieu *et al.*, 1998; DeRisi *et al.*, 1997; Lyons *et al.*, 2000).

3.- Estudios realizados con la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*.

Entre los antígenos más ampliamente estudiados de *M. tuberculosis* está una proteína de 38 kDa. Esta proteína ha sido caracterizada independientemente por varios grupos de investigación, quienes la designaron con diferentes nombres, dependiendo del sistema que utilizaron para identificarla: antígeno 5 (por electroforesis); antígeno 78 (por inmunoelectroforesis cruzada); proteína de 38 kDa (con anticuerpos monoclonales, TB71 y TB72); proteína antigénica b. Pab, (por la identificación y clasificación de los diferentes bacteriófagos recombinantes aislados) (Daniel *et al.*, 1979; Andersen *et al.*, 1988; Harboe and Wiker, 1992). Actualmente se le ha renombrado como la proteína PstS-1 (Braibant *et al.*, 1996a).

Otros grupos de investigadores que también han aportado conocimientos esenciales a nivel inmunológico, bioquímico y molecular sobre el antígeno PstS-1 son los siguientes:

A).- Andersen y Hansen, (1989), aislaron, clonaron y secuenciaron el gen que codifica para la proteína de 38 kDa, determinaron que contiene 374 aminoácidos, con un peso molecular aproximado de 38.2 kDa. Se observó que esta proteína tiene un 30% de identidad con la proteína PstS o PiBP (Pst, Phosphate specific transport o PiBP, Phosphate Inorganic Binding Protein) de *E. coli*, codificada por el gen *pstS*, la cual forma parte del operón *pst*, integrado por los siguientes genes: *pstS-pstA-pstC-pstB-phoU*.

B).- Espitia *et al.*, (1989a), observaron por ELISA que los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, reconocieron principalmente a la proteína de 38 kDa, a diferencia de los sueros de los individuos sanos. Esto los llevó a sugerir que el antígeno de 38 kDa, es un antígeno inmunodominante, asociado con la enfermedad.

C).- Espitia y Mancilla, (1989b), reportaron que la proteína de 38 kDa es una glicoproteína, debido a que se une específicamente a concanavalina A, se marca con biotina-hidrazida y la digestión con alfa-manosidasa, ocasiona la reducción de su peso molecular, inhibiéndose la unión de la concanavalina A.

D).- Andersen *et al.*, (1990), observaron que la proteína Pab contiene una secuencia señal en su región amino terminal y demostraron que esta proteína es secretada; también determinaron un incremento en la expresión de esta proteína cuando crecieron a la micobacteria en concentraciones bajas de fosfato.

E).-Young y Garbe, (1991), demostraron que la proteína de 38 kDa, es una lipoproteína y determinaron que el péptido señal de la proteína de 38 kDa es de 23 aminoácidos.

F).- Espitia *et al.*, (1992), también observaron un incremento en la expresión de la proteína de 38 kDa al crecer *M. tuberculosis* en un medio mínimo de fosfato. Esto se determinó por Inmunoblot e Inmunoelectromicroscopia con la utilización de un suero policlonal y un anticuerpo monoclonal (1B71) dirigidos contra la proteína de 38 kDa. Los

resultados demostraron también que la proteína además de ser secretada, puede localizarse en la superficie de la micobacteria.

G).- Singh *et al.*, (1992), expresaron la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* en *E. coli* fusionando el gen estructural de la proteína de 38 kDa con una región traduccional del gen *atpE* de *E. coli*, bajo el control de dos promotores P_L y P_R del bacteriófago λ colocados uno tras otro en el plásmido pJLA603. La proteína recombinante, se hiperexpresó en *E. coli* formando cuerpos de inclusión.

H).- Chang *et al.*, (1994) purificaron el antígeno de 38 kDa de *M. tuberculosis* y realizaron estudios cinéticos de la constante de disociación por columnas, las cuales tenían acopladas complejos de sulfato o fosfato. Observaron afinidad de esta proteína para la columna con los complejos de fosfato, siendo la constante de disociación similar a la de la proteína PstS de *E. coli*, más no así para la columna de sulfatos.

I).- Vordermeier *et al.*, (1995), evaluaron las propiedades inmunológicas de la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* conjugada con micropartículas biodegradables de poli DL-lactido co-glicolido, observando que estas micropartículas biodegradables podrían actuar como un sistema de dosificación, pero los resultados de la inmunoprotección con la proteína de 38 kDa no fueron satisfactorios.

J).- Braibant *et al.*, (1996a), aislaron y secuenciaron los fragmentos de ADN que flanquean al gen *pstS-1* de la genoteca de expresión de *M. tuberculosis*, construida en el bacteriófago λ gt11; identificaron, 5' arriba del gen *pstS-1* un gen homólogo al *pstB* de *E. coli* y 3' abajo a los genes *pstC* y *pstA*. Con estos estudios preliminares se sugirió que el gen *pstS-1* de *M. tuberculosis* es el segundo gen de un posible sistema ABC transportador de fosfato, integrado en el siguiente orden. *pstB*, *pstS-1*, *pstC* y *pstA-2*.

K).- Braibant *et al.*, (1996b); Lefèvre *et al.*, (1997), identificaron y caracterizaron otros dos genes que codifican para proteínas análogas a PstS-1. Por su localización y organización es probable que ambas genes sean transcritos independientemente en diferentes operones. Estos genes se localizan en dirección 5' al gen *pstS-1*. Por esta

razón, la proteína de 38 kDa fue renombrada como PstS-1. El gen que codifica para la proteína designada PstS-2 es transcrito con otro gen que codifica para una cinasa de serina/treonina (PknD) y el gen que codifica para la proteína PstS-3 también forma parte de un operón, siendo probablemente *pstS-3* el primer gen seguido por el gen *pstC-2* y después por el gen *pstA-1*.

A pesar de que los trabajos anteriores demuestran que la proteína de 38 kDa de *M. tuberculosis* es una proteína análoga a la proteína PstS de *E. coli*, aún no está definido si la función y la regulación de la expresión de esta proteína es similar o diferente a la proteína PstS de *E. coli*.

De esta manera, el estudio de la proteína de PstS-1 no solo es importante por su uso potencial en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis, sino también en el conocimiento de los mecanismos de regulación molecular que utiliza *M. tuberculosis* para metabolizar el fosfato. A mediano plazo, la mutagénesis de algunos de los genes involucrados en esta vía metabólica nos ayudará a profundizar en la comprensión de los mecanismos moleculares de regulación que *M. tuberculosis* utiliza para sobrevivir *in vivo* y posteriormente aplicar estos conocimientos para la generación de nuevas vacunas atenuadas contra la tuberculosis.

4.- El regulón de fosfato en *E. coli*.

Se ha observado que cuando *E. coli* es sometida a crecer en condiciones de limitación de fosfato, la bacteria activa la síntesis de varias proteínas las cuales permiten la entrada, transporte y regulación de fosfato del medio externo hacia el citoplasma. El fosfato es un componente integral del metabolismo celular general para cualquier ser vivo, es indispensable para el aporte de energía, la síntesis del ADN y del ARN así como para la regulación genética (señales transduccionales entre proteínas sensoras de estímulos y proteínas activadoras transcripcionales).

Se han identificado aproximadamente 400 proteínas involucradas en la regulación por fosfato en *E. coli*. Alrededor de 200 proteínas son reprimidas y el resto son inducidas en escasez de fosfato. Algunas de las proteínas más estudiadas y caracterizadas hasta el momento son: PhoE, PhoA, PiBP-PstACB-PhoU, PhoB-PhoR, los genes que codifican para estas proteínas, se localizan en diferentes partes del cromosoma de *E. coli*. A este sistema se le ha llamado regulón *pho* (de phosphate "regulón de fosfato") (figura 1) (Rao y Torriani, 1990; Wanner, 1993; VanBogelen *et al.*, 1996).

A.- La porina de membrana externa, PhoE, permite la entrada del fosfato orgánico.

Cuando *E. coli* crece en limitaciones de fosfato, es inducida la síntesis de una porina de membrana externa nombrada PhoE, ésta permite la entrada de fosfato orgánico del medio externo hacia el periplasma de la bacteria (Tommasen y Lugtenberg, 1980).

B.- La fosfatasa alcalina (PhoA), hidroliza el enlace éster P-O presente en los organofosfatos.

En el espacio periplásmico se localiza la fosfatasa alcalina (PhoA), esta enzima hidroliza el enlace éster P-O presente en los organofosfatos, liberando el Pi (Pi, "inorganic phosphate" fosfato inorgánico), siendo la molécula metabolizable por la bacteria (Agrawal *et al.*, 1990). También existen otras fosfatasas que hidrolizan organofosfatos pero no pertenecen al regulón *pho* (Wanner, 1993).

C.- El sistema de transporte del fosfato inorgánico, Pst, es activo en limitaciones de fosfato.

Se ha observado que *E. coli* utiliza dos mecanismos para asimilar el fosfato: En concentraciones de alto fosfato, un sistema constitutivo de baja afinidad, Pit (Pit, "phosphate inorganic transport": transporte de fosfato inorgánico) transporta el fosfato del exterior al interior de la bacteria. Hasta este momento se ha identificado sólo una

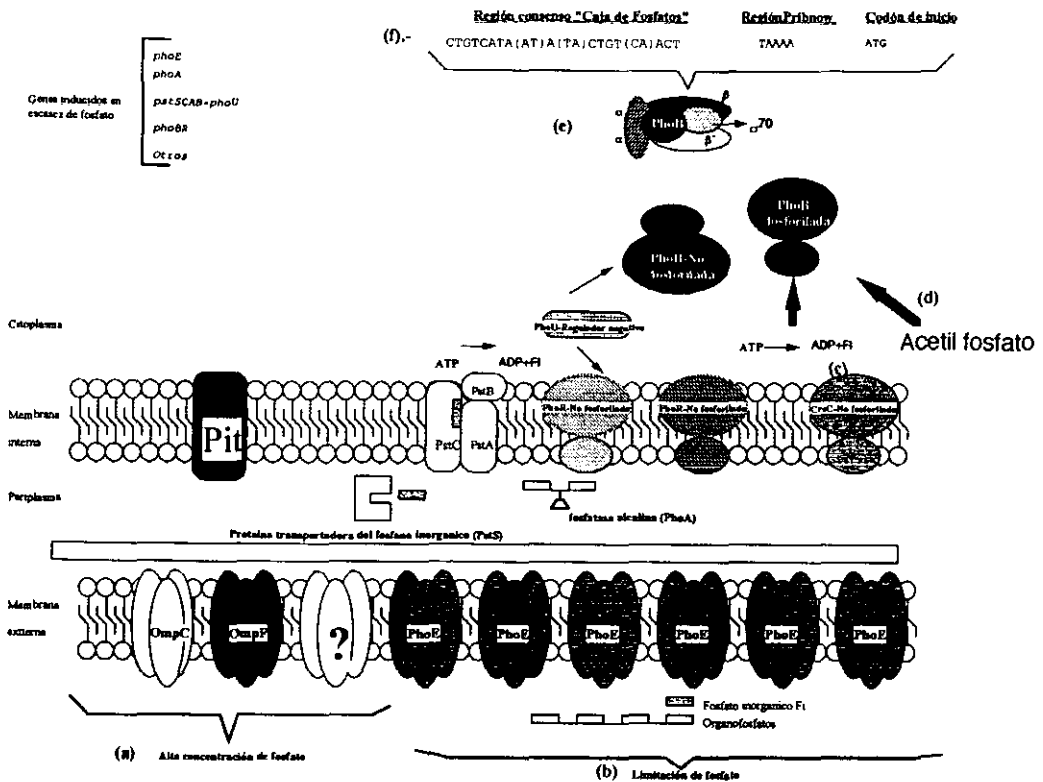


Figura 1.- Esquema de las vías de entrada del fosfato hacia el interior de la bacteria y los tres sistemas que fosforilan a la proteína PhoB de *E. coli*.

- (a).- En condiciones altas de fosfato, posiblemente el fosfato del exterior pasa a través de las porinas OmpC, OmpF u otra (s) proteínas hacia el periplasma, después es transportado hacia el citoplasma, por el sistema constitutivo de baja afinidad, Pit (Pit, "phosphate inorganic transport" transportador del fosfato inorgánico). Se ha identificado hasta el momento una proteína en este sistema que se localiza en la membrana interna y no forma parte del regulón *pho*.
- (b).- El sistema dependiente de las concentraciones de fosfato es activado por la proteína PhoB. Cuando *E. coli* crece en limitaciones de fosfato, la porina de la membrana externa PhoE es inducida permitiendo el paso de las moléculas de fosfato orgánico hacia el periplasma, en este lugar se localiza la fosfatasa alcalina (PhoA), enzima que hidroliza el fosfato orgánico a fosfato inorgánico, Pi, que es la molécula metabolizable por la bacteria, éste es acarreado por la proteína periplasmática acarreadora de fosfato, PstS, hacia el citoplasma, a través de un complejo multiproteico, PstC-PstA-PstB. Las dos primeras proteínas forman un canal transmembranales en la membrana interna, la tercera proteína se localiza en el citoplasma y es la responsable de aportar energía a este sistema activo específico para el transporte del Pi. Posteriormente la proteína sensora de la membrana interna PhoR, se autofosforila (aún se desconoce como es este mecanismo) y a su vez fosforila a la proteína citoplasmática PhoB. Esta última se une a la región denominada caja de fosfatos y junto con el factor sigma de la RNA polimerasa activan la transcripción de los genes del regulón *pho*.
- (c).- Otra proteína de la membrana interna de la clase histidina cinasa, CreC (PhoM), también fosforila a la proteína PhoB y por lo tanto activan el regulón de fosfato, pero este mecanismo es independiente de las concentraciones de fosfato y no es regulado por el regulón *pho*.
- (d).- El acetyl fosfato, es un intermediario en el metabolismo del carbono, también activa a la proteína PhoB, aún se desconoce si esta molécula interactúa directamente con la proteína PhoB o es indirectamente a través de otra molécula. Esta interacción también es independiente de la concentración de fosfato y no es regulado por el regulón *pho*.
- (e).- Se esquematiza la interacción de la RNA polimerasa con la proteína PhoB en la región consenso, caja de fosfatos y la caja Pribnow.
- (f).- Se muestra la secuencia de bases de la región consenso "caja de fosfatos", donde se une la proteína PhoB, así como la secuencia consenso de la caja Pribnow.

proteína involucrada en este sistema, localizada en la membrana interna y se ha demostrado que no forma parte del regulón *pho* (Rosenberg *et al.*, 1977; Willsky y Malamy, 1980; Wanner, 1993). Cuando los niveles externos de F_i son menores a $20 \mu\text{M}$, el sistema multiproteico, Pst (Pst, Phosphate specific transport": transporte específico de fosfato) se activa. A diferencia del anterior, este sistema forma parte del regulón *pho*. Los genes que codifican para este complejo multiprotéico están agrupados en un operón integrado por *pstSCAB-phoU* (Surin *et al.*, 1985; Amemura *et al.*, 1985).

La proteína PstS [nombrada PstS-1 en *M. tuberculosis*], se localiza en el espacio periplásmico, es codificada por el gen *pstS*. Esta proteína probablemente transporta el fosfato del periplasma hacia los canales transmembranales PstA y PstC, las cuales se localizan en la membrana interna (M.I.). Por mutagénesis dirigida se demostró que los aminoácidos que interactúan con las moléculas de fosfato son la arginina 237, el ácido glutámico 241 de PstC y la arginina 220 de PstA. Con el análisis de la secuencia de aminoácidos de ambas proteínas se observó, que posiblemente contienen de 5 a 6 hélices transmembranales (Cox *et al.*, 1988; Cox *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 1992).

En el citoplasma, se localiza la proteína PstB, ésta contiene un dominio para la unión e hidrólisis del adenosin trifosfato (ATP) produciendo adenosin difosfato (ADP), PstB es la proteína responsable de aportar la energía para la entrada de fosfato inorgánico hacia el citoplasma (Cox *et al.*, 1989; Webb *et al.*, 1992; Chan y Torriani *et al.*, 1996).

Se ha demostrado que el sistema Pst tienen dos funciones en *E. coli*: transportar el fosfato inorgánico (PstSACB) y regular negativamente el regulón de fosfato en condiciones de alto fosfato, siendo la proteína PhoU la responsable de esta función, el gen que codifica para esta proteína se localiza en la parte distal del operón *pst* (Wanner, 1993). Aún existen controversias acerca de la posible participación de esta proteína en el transporte de F_i . (Muda *et al.*, 1992; Steed and Wanner, 1993).

D.- Los genes del regulón *pho* son regulados por las proteínas PhoB y PhoR.

La regulación de los genes *phoE*, *phoA* y de los operones *pstSACB-phoU*, *phoB-phoR* y otros genes aún no caracterizados del regulón *pho*, es dependiente de las proteínas reguladoras PhoB y PhoR (Wanner *et al.*, 1987a; Kimura *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1989), éstas últimas codificadas por los genes del operón *phoB-phoR*. PhoR es una proteína sensora integrada en la membrana interna (Yamada *et al.*, 1990) y PhoB es una proteína efectora, soluble en el citoplasma, ésta se une a una región promotora denominada caja de fosfatos en los genes que pertenecen al regulón *pho* (Makino *et al.*, 1986).

PhoR actúa como un sensor de la concentración de fosfato (Yamada *et al.*, 1990; Scholten y Tomasen, 1993). Cuando sensa niveles bajos de Pi, PhoR se autofosforila, trans-fosforilando a su vez a PhoB (Makino *et al.*, 1989). PhoB fosforilada se une al ADN en el sitio denominado caja de fosfatos y al interaccionar con el factor sigma de la RNA polimerasa, activa la transcripción de los genes del regulón *pho* (Aoyama y Oka, 1989; Stock *et al.*, 1989). La proteína producto del gen *phoB* estimula su propia síntesis (Guan *et al.*, 1983).

También se han descrito dos vías independientes de la concentración de fosfato, que activan a la proteína efectora PhoB, en *E. coli* (Lee *et al.*, 1990; Amemura *et al.*, 1990; Wanner y Riesenber, 1992). Uno de estos vías está regulado por la proteína CreC (PhoM) (Wanner *et al.*, 1988a; Wanner *et al.*, 1988b). No ha sido posible detectar el fenotipo de CreC en presencia de PhoR (Wanner, 1987b). Usando una fusión transcripcional entre los genes *creC-lacZ*, se mostró que el promotor de *creC* no es regulado por el regulón *pho*. (Wanner y McSharry, 1982).

La tercera vía que activa el regulón *pho*, independiente de la concentración de fosfato, es el acetil fosfato. Esta es una molécula intermediaria en el metabolismo de la glucosa y se ha demostrado que también tiene la capacidad de fosforilar a PhoB, activando así al regulón *pho* (Wanner, 1992; McCleary *et al.*, 1993; McCleary, 1996).

5.- Implicación del regulón *pho* en la virulencia.

La primera evidencia de que los genes regulados por el regulón de fosfato, están involucrados en los procesos de invasión, fue la reportada por Sinai y Bavoil, (1993), quienes utilizaron transposones para mutagenizar una cepa entero-invasiva de *E. coli* y aislaron dos mutantes con un fenotipo hiper-invasivo al ensayarse en cultivos celulares, identificando la inserción del transposon en el operón *pstSCAB-phoU*. Daigle *et al.*, (1995) usaron también transposones para mutagenizar una cepa de *E. coli* que provoca septicemia en becerros y lechones, con el objetivo de identificar los factores de virulencia; con esta estrategia aislaron una mutante que provocó la atenuación de la cepa, identificando la inserción del transposón en el gen *pstC*. Además, Janssen *et al.*, (1995) a través de la incorporación de metionina marcada radioactivamente con azufre (^{35}S) y con la utilización de un anticuerpo monoclonal anti-PhoE, observaron la expresión de la porina PhoE de *Salmonella typhimurium*, únicamente en los extractos protéicos de las bacterias que habían invadido las células eucariotas y no en los extractos protéicos de las bacterias extracelulares.

6.- El regulón de fosfato en *M. tuberculosis*.

El primer reporte sobre la expresión de la fosfatasa alcalina (enzima activada en condiciones de bajo fosfato en *E. coli*) en el género *Mycobacterium* fue el trabajo de David HL, (1977). El detectó la actividad de esta enzima en cultivos de *M. smegmatis* crecido en condiciones limitantes de fosfato. Casal M y Linares MJ, (1984) también detectaron actividad de la fosfatasa alcalina en *M. tuberculosis*. Otros reportes son los ya descritos previamente con la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*. Thangaraj *et al.*, (1996), identificaron, clonaron y secuenciaron el probable operón *pst* de *M. intracellulare*, observando también otros genes análogos al gen *pstS-1*. Considerando los resultados mencionados, es poco lo que se conoce acerca de la regulación de fosfato en *M. tuberculosis* y prácticamente nada en las otras micobacterias.

II.- JUSTIFICACION.

La caracterización molecular de la proteína de 38 kDa (PstS-1) de *M. tuberculosis* nos permitirá establecer la posible participación de ésta en la asimilación de fosfato, así como los mecanismos implicados en la activación o represión de su expresión génica. Los conocimientos que se deriven de esta área, nos serán de gran utilidad para comprender los mecanismos fisiológicos y moleculares que le permiten a *M. tuberculosis* sobrevivir en condiciones de limitación de fosfato.

Es claro que existen diferencias notables entre *E. coli* y *M. tuberculosis*, por ejemplo a nivel de sus envolturas celulares. *E. coli* es una bacteria Gram-negativa (Farmer III, 1995), mientras que *M. tuberculosis* es considerada una bacteria Gram-positiva (Nolte y Metchock, 1995). A nivel génico el porcentaje de bases nucleotídicas también es diferente, las micobacterias tienen un 65-70 % de guanina-citocinas y *E. coli* tiene del 45-55%. La comparación del genoma de *M. tuberculosis* con otros genomas de microorganismos ya secuenciados revela una preferencia significativa estadísticamente por aminoácidos codificados por codones con mayor contenido en G + C como alanina, glicina, prolina, arginina y triptofano que por aminoácidos codificados por codones con mayor contenido en A + T como asparagina, isoleucina, lisina, fenilalanina y tirosina (Cole *et al.*, 1998). Por ésto la homología entre proteínas análogas entre *M. tuberculosis* y *E. coli* es alrededor del 30-40 %. Desde este punto de vista biológico, el estudio de la regulación de fosfato en dos bacterias estructural y evolutivamente diferentes resulta interesante.

III.- ANTECEDENTES.

1.- Clonación del gen *pstS-1* (38kDa, 36kDa, Pab, antígeno 5, antígeno 78).

Andersen *et al.*, (1988), con un complejo de anticuerpos monoclonales producidos contra diferentes antígenos de *M. tuberculosis*, identificaron 12 bacteriófagos recombinantes de una genoteca de expresión de *M. tuberculosis* construida en el bacteriófago λ gt11. Las proteínas expresadas por los bacteriófagos recombinantes, fueron designadas como proteínas antigénicas a, b, c d (Paa, Pab, Pac y Pad), dependiendo del reconocimiento de los anticuerpos. Los que presentaron reconocimiento cruzado entre éstos, fueron nombrados como PaeF y PaeB así como PafA y PafB. Dentro del grupo Pab se identificaron tres bacteriófagos recombinantes que expresaban la proteína de 38 kDa, los cuales fueron nombrados como AAA59, AAA60 y AAA71. El análisis posterior del perfil protéico de los bacteriófagos, por inmunoblot mostró que los bacteriófagos AAA59 y AAA71 expresaban una proteína de 160 kDa (probablemente producto de la fusión traduccional entre el gen *lacZ* de *E. coli* y la región arriba del gen *pab* [*pstS-1*]) y otra de 36 kDa. El bacteriófago AAA60 únicamente expresó la proteína de 36 kDa independientemente de la adición del isopropil- β -D-thiogalactósido. Usando diferentes enzimas de restricción se determinó que el bacteriófago AAA71 contenía aproximadamente 4 kpb, el bacteriófago AAA60 3 kpb y el bacteriófago AAA59 2 kpb. La secuencia del bacteriófago AAA59 mostró un frente de lectura abierto que codificaba para una proteína de 374 aminoácidos. El estudio comparativo a nivel de DNA y de proteína con la base de datos de secuencias reportadas hasta ese momento, mostró que el producto protéico del gen *pab* expresado por el bacteriófago AAA59, tenía un 30% de homología con la proteína PstS de *E. coli*.

Por otra parte, el fragmento de ADN conteniendo el gen *pab* y parte del gen *lacZ* del bacteriófago AAA59, fue liberado digiriéndolo con las endonucleasas *HindIII-SmaI* y fue subclonado en el plásmido pBR322 digerido con *HindIII* y *EcoRV*, nombrando al plásmido resultante pAA26 (figura 2). Posteriormente, la cepa de *E. coli* DH5 α fue

transformada con este plásmido y se analizó su perfil protéico por inmunoblot, detectándose aún la proteína de 160 kDa y la proteína de 36 kDa. Eliminaciones en dirección 3'al gen *pab* con la exonucleasa *Bal31* no afectó la expresión de la proteína de 160 kDa y la de 36 kDa.

Estos resultados, no lograron definir si la expresión de la proteína de 36 kDa por el bacteriófago AAA59 y el plásmido pAA26, era debida al reconocimiento de alguna probable región promotora localizada dentro de los 150 pb arriba del codon de inicio del gen *pab* de *M. tuberculosis*, por el sistema regulador de fosfatos de *E. coli*, o si el sistema postraduccionaI de *E. coli* reconoció al péptido señal de la proteína Pab, produciéndose así la forma madura de la proteína de 36 kDa.

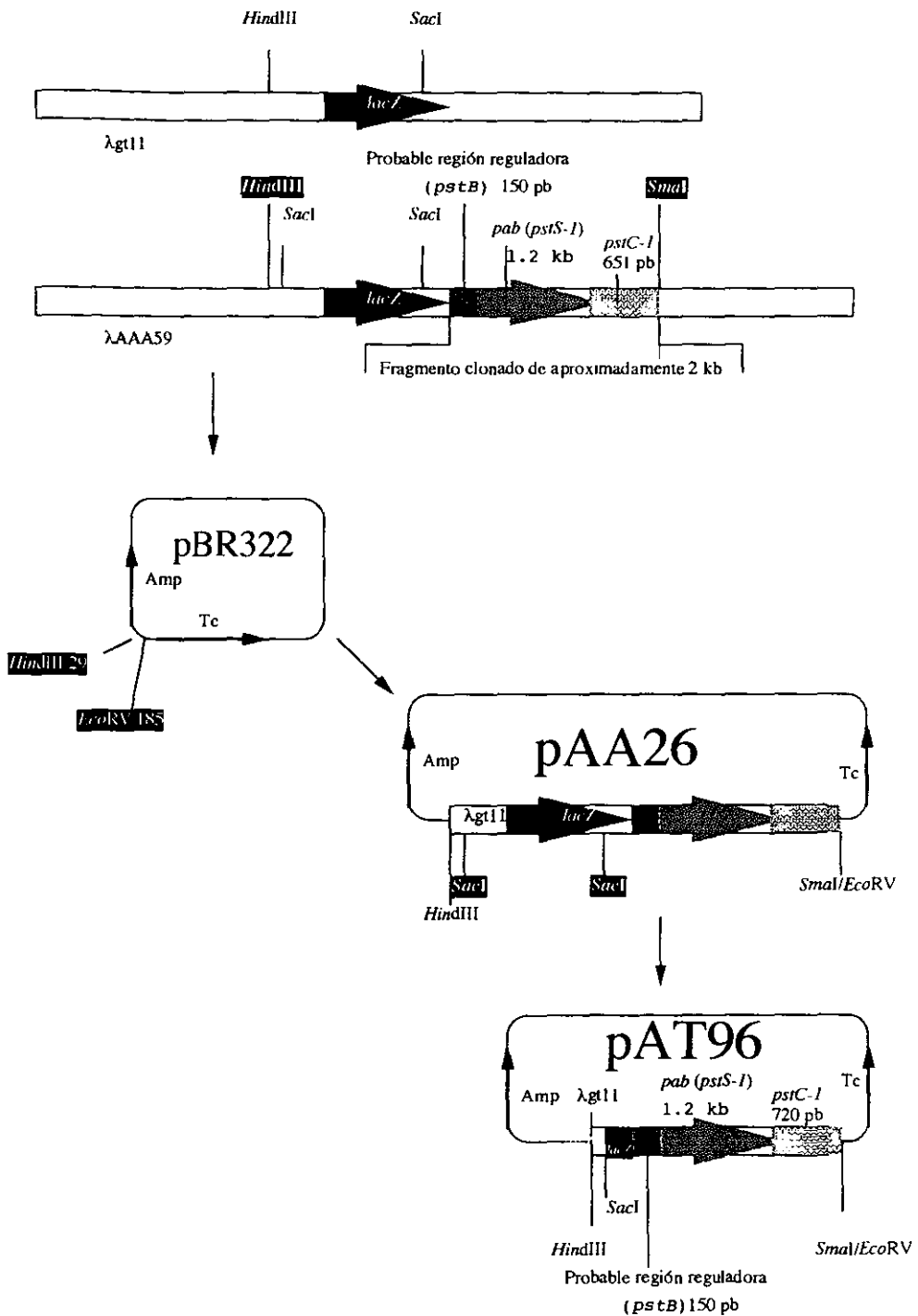


Figura 2.- Esquema de la construcción del plásmido pAT96. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

IV.- OBJETIVOS GENERALES.

- 1).- Caracterizar molecularmente el gen que codifica la proteína PstS-I de *M. tuberculosis*.
- 2).- Iniciar el estudio de la regulación de fosfatos en *M. tuberculosis* y en las micobacterias no patógenas, *M. vaccae* y *M. smegmatis*.

V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1).- Determinar si el sistema de regulación de fosfatos (PhoB) de *E.coli* reconoce los promotores de los genes involucrados en el metabolismo de fosfatos de *M. tuberculosis*.
- 2).- Determinar la presencia del locus *pstS-1* en otras micobacterias.
- 3).- Evaluar la expresión de la fosfatasa alcalina en las micobacterias no patógenas, *M. vaccae* y *M. smegmatis*.

IV.- OBJETIVOS GENERALES.

- 1).- Caracterizar molecularmente el gen que codifica la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*.
- 2).- Iniciar el estudio de la regulación de fosfatos en *M. tuberculosis* y en las micobacterias no patógenas, *M. vaccae* y *M. smegmatis*.

V.- OBJETIVOS ESPECIFICOS.

- 1).- Determinar si el sistema de regulación de fosfatos (PhoB) de *E.coli* reconoce los promotores de los genes involucrados en el metabolismo de fosfatos de *M. tuberculosis*.
- 2).- Determinar la presencia del *locus pstS-1* en otras micobacterias.
- 3).- Evaluar la expresión de la fosfatasa alcalina en las micobacterias no patógenas, *M. vaccae* y *M. smegmatis*.

VI.- MATERIALES Y METODOS.

Las cepas de *E. coli*, micobacterias, bacteriófagos, plásmidos y construcciones utilizadas y generadas en este trabajo están descritas en la tabla 1. La metodología de Southern blot, las técnicas básicas de clonación e hibridación en placa y colonia, así como las soluciones y amortiguadores fueron elaboradas de acuerdo al manual de Sambrook *et al.*, 1989.

1.- Crecimiento de micobacterias.

El crecimiento y la manipulación de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, H37Ra, *Mycobacterium bovis* BCG y las patógenas potenciales u oportunistas para el hombre como *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium avium* y *Mycobacterium intracellulare* fueron llevadas a cabo en un laboratorio de seguridad de nivel 3, ubicado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas. *M. smegmatis* y *M. vaccae* fueron manipuladas en el laboratorio de nivel 2.

Las diferentes cepas de micobacterias fueron crecidas en los medios de cultivo Sauton, pH 7.2 (contiene por litro: 0.05 g de citrato de fierro y amonio, 0.5 g de MgSO₄, 0.5 g de NaH₂PO₄, 2.0 g de ácido cítrico, 4.0 g asparagina y 60.0 g de glicerol), Middlebrook 7H9 y 7H11 agar (Difco Laboratorios, Detroit, MI). *M. phlei*, *M. avium*, *M. intracellulare*, *M. smegmatis* y *M. vaccae*, fueron crecidas en el medio líquido Middlebrook 7H9. *M. tuberculosis* H37Rv, *M. tuberculosis* H37Ra, *M. bovis* BCG, *M. kansasii* y *M. phlei* fueron crecidas en el medio líquido Sauton y 7H11 agar. *M. bovis* y *M. intracellulare* fueron crecidas en el medio 7H11.

Tabla 1. Cepas, bacteriófagos, plásmidos y cósmidos usados o construídos en este trabajo.

Cepas	Características	Referencia
Micobacterias		
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 27294 H37Rv	
<i>M. tuberculosis</i>	ATCC 25177 H37Ra	
<i>M. bovis</i>	BCG (Glaxo strain)	
<i>M. intracellulare</i>	ATCC 13950	
<i>M. avium</i>	ATCC 25291	
<i>M. kansasii</i>	ATCC 12478	
<i>M. phlei</i>	sp.	
<i>M. smegmatis</i>	mc ² 155	W. Jacobs, HHMI, USA.
<i>M. vaccae</i>	sp	
Escherichia coli		
DH5 α Q		Km ^r J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
CE12-48	(PC2929) Δ (<i>phoE</i>) <i>phoR69</i>	Es ^r J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
CE1224	(PC2914) Δ (<i>phoE</i>)	Es ^r J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
CE1197	(PC2902) <i>pstS201</i>	Es ^r J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
CE1108	(PC2416) <i>pstS201</i>	Es ^r J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
AT854	K10 Δ <i>phoU</i> <i>pit-10</i>	Km ^r A. Torriani, Inst. Tecnológico de Massachusetts, USA.
ANCC22	<i>phoR68</i> <i>phoM453</i>	Es ^r H. Hirdeumi, Univ. de Nagoya, Japon.
ANCL1	<i>phoB23</i>	Km ^r H. Hirdeumi, Univ. de Nagoya, Japon.
ANCU18	<i>phoA</i>	Es ^r H. Hirdeumi, Univ. de Nagoya, Japon.
BW13713	<i>phoR68</i>	Tc ^r B. Wanner, Univ. de Pardue, USA.
BW13736	<i>phoR68</i> Δ (<i>creABCD</i>)	Km ^r B. Wanner, Univ. de Pardue, USA.
BW16469	<i>phoR68</i> Δ (<i>creABCD</i>) <i>ackA200</i>	Tc ^r B. Wanner, Univ. de Pardue, USA.
BW16470	<i>phoR68</i> Δ (<i>creABCD</i>) Δ (<i>pta</i> <i>ackA</i> <i>hisQP</i>)	Tc ^r B. Wanner, Univ. de Pardue, USA.
BW16546	<i>phoR68</i> Δ (<i>creABCD</i>) <i>pta-200</i>	Tc ^r B. Wanner, Univ. de Pardue, USA.
x2764	F λ (<i>c1857</i> <i>b2</i> <i>redβ3</i> <i>S7</i>) Δ (<i>gpt-proA</i>)62 <i>leuB1</i> <i>glnV44</i> <i>ara-14</i> <i>galK2</i> <i>lacY1</i> <i>hsdS20</i> <i>rpsL20</i> <i>xyt-5</i> <i>mil-1</i> <i>recA13</i>	Es ^r W. Jacobs, HHMI, USA.

Bacteriófagos recombinantes.

AAA59	Derivado del λ gt11, <i>pstS-1</i>		A. Andersen, Univ. de Denmark, Dmk.
AAA60	Derivado del λ gt11, <i>pstS-1</i>		A. Andersen, Univ. de Denmark, Dmk.

Cósmidos

pYUB328	Vector	Ap ^r	W. Jacobs, HHMI, USA.
pJT4COS	Banco genómico de <i>M. tuberculosis</i> construido en pYUB328	Ap ^r	Construido en este trabajo
pJT46COS	Derivado del pJT4COS contiene el locus <i>pst</i> de <i>M. tuberculosis</i>	Ap ^r	Construido en este trabajo

Plásmidos

pSN507	Derivado del pBR322, <i>pstSCABphoU</i>	Ap ^r Tc ^r	B. Wanner, Univ. de Purdue, USA.
pAN36	Derivado del pACYC184, <i>pstSCABphoU</i>	Cm ^r	A. Torriani, Inst. Tecnológico de Massachusetts, USA.
pJP50	Derivado de pACYC184, <i>pholphoR</i>	Cm ^r	J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
pJP14	Derivado del pACYC184, <i>E. coli phoE</i>	Cm ^r	J. Tommassen, Univ. de Utrecht, Ntds.
pAA26	Derivado del pBR322, <i>pstBS-1C-1</i>	Ap ^r	Andersen et al., (1989)
pUC18	Vector	Ap ^r	Yanich-Perron et al., (1985)
pBR322	Vector	Ap ^r Tc ^r	Bolivar et al., (1977)
pAT95	Derivado del pUC18, <i>pstBS-1C-1A-2</i>	Ap ^r	Construido en este trabajo
pAT951	Derivado del pUC18, <i>pstB</i>	Ap ^r	Construido en este trabajo
pAT96	Derivado del pBR322, <i>pstBS-1C-1</i>	Ap ^r	Construido en este trabajo
pAT97	Derivado del pBR322, <i>pstBS-1C-1A-2</i>	Tc ^r	Construido en este trabajo
pMC1871	Derivado del pBR322, contiene el gene <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> sin promotor	Tc ^r	Shapira et al., (1983)
pMV261	Vector intercambiable (shuttle)	Km ^r	Stover et al., (1991)
pJT19971	Derivado del pMV261, <i>pstBS-1C-1A-2lacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo
pJT19972	Derivado del pMV261, <i>pstS-1C-1A-2lacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo
pJT19973	Derivado del pMV261, <i>pstC-1A-2lacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo
pJT19974	Derivado del pMV261, <i>pstBlacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo
pJT19975	Derivado del pMV261, <i>pstBlacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo
pJT19976	Derivado del pMV261, <i>pstB S-1C-1 lacZ</i>	Km ^r	Construido en este trabajo

Ap^r resistencia para la ampicilina, Cm^r resistencia para el cloramfenicol, Es^r resistencia para la estreptomina,

Km^r resistencia para la kanamicina, Tc^r resistencia para la tetraciclina

2.- Obtención del ADN de las micobacterias.

Las micobacterias fueron muertas con azida de sodio al 2%. El ADN de las micobacterias fue obtenido por la técnica de van Soolingen *et al.*, (1994). Brevemente del cultivo en agar 7H11, la masa bacteriana se obtuvo raspando con una asa bacteriológica la caja y después se depositó en un tubo de 1.5 ml. De las bacterias crecidas en el medio líquido la masa bacteriana se obtuvo por centrifugación en tubos de 1.5 ml. Posteriormente se adicionaron 300 µl de amortiguador TE 1x y 50 µl de lisozima a 10 mg/ml a cada tubo y se incubó a 37 °C de 1 a 24 horas. Después se agregaron 70 µl de sulfato dodecil de sodio (SDS) al 10% y 5 µl de proteinasa K a 10 mg/ml, se mezcló vigorosamente e incubó a 65 °C por 10 minutos, posteriormente se adicionaron 100 µl de NaCl 5M y 100 µl de N-cetil-N,N,N,-trimetil bromido de sodio (CTAB) al 10% disuelto en una solución de NaCl al 0.7%. se mezcló vigorosamente e incubó a 65 °C por 10 minutos; luego se agregaron 500 µl de cloroformo; después de una fuerte agitación las muestras se centrifugaron a 14 K rpm por 5 minutos. Este paso de extracción se repitió por 5 veces. El sobrenadante se recuperó en otro tubo de 1.5 ml y se adicionaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ADN. La muestra se mantuvo a temperatura ambiente de 10-30 minutos o se dejó a -70 °C hasta su uso. Finalmente el ADN obtenido se lavó con 1 ml de etanol al 70%, se centrifugó a 14 K rpm a 4 °C por 15 minutos y se resuspendió con 50 µl de agua grado milliQ-ultra filtrada.

3.- Generación de los plásmidos pAT95, pAT51, pAT96 y pAT97.

Con la endonucleasa *SacI*, se eliminó un fragmento de 4.5 kb del plásmido pAA26, que contenía parte del bacteriofago λ gt11 y parte de la región reguladora del gen *lacZ* de *E. coli*, generándose el plásmido pAT96 (figura 2). Por otra parte, con *SacI-KpnI* se liberó

un fragmento de aproximadamente 4 kb del bacteriófago AAA60 que contenía parte del gen estructural *lacZ*, aproximadamente 650 b arriba del codón de inicio del gen *pab*, el gen estructural *pab* y aproximadamente 1.3 kb después del codón de término de este gen. Este fragmento fue subclonado en el pUC18 digerido con *SacI-KpnI*, generándose el plásmido pAT95. Con esta subclonación se ganaron sitios de restricción y el plásmido se digirió con *EcoRI* y *PstI*; así el fragmento de 4 kb se subclonó en el pBR322 generándose el plásmido pAT97 (figura 3). Esta última subclonación se realizó con el objetivo de evitar diferencias en la expresión debido al uso de plásmidos con diferente número de copias por célula. Para secuenciar los 650 pb localizados arriba del codón de inicio del gen *pab*, el plásmido pAT95 fue digerido con la enzima *PvuII*, liberándose el fragmento de 650 pb, el cual fue subclonado en el sitio de *SmaI* del pUC18, generando el plásmido pAT95I (figura 3). Los fragmentos de ADN clonados fueron purificados con perlas de vidrio (Gene clean, Bio101) cortando los fragmentos deseados de geles de agarosa al 0.8% (Biorad).

4.- Preparación de células competentes.

Una colonia de la cepa de *E. coli* crecida en LB agar (GibcoBRL) o una colonia de *M. smegmatis* crecida en 7H11 agar, fueron cultivadas en un litro de caldo de Luria o 7H9 respectivamente con agitación a 200 rpm a 37 °C, hasta llegar a una D.O.₆₀₀ de 0.5. Después cada cultivo fue centrifugado en botellas de 500 ml a 4 °C a 6 k rpm, las pastillas fueron lavadas con un litro y medio de agua bidestilada y centrifugadas a 6 k rpm, los botones celulares fueron resuspendidos con 100 ml de glicerol al 10% y centrifugados a 6 k rpm. la pastilla bacteriana de las *E. coli* fue resuspendida con 1 ml de glicerol al 10% y alicuotadas en tubos de 0.5 ml con 50 µl de la suspensión. La pastilla de las micobacterias

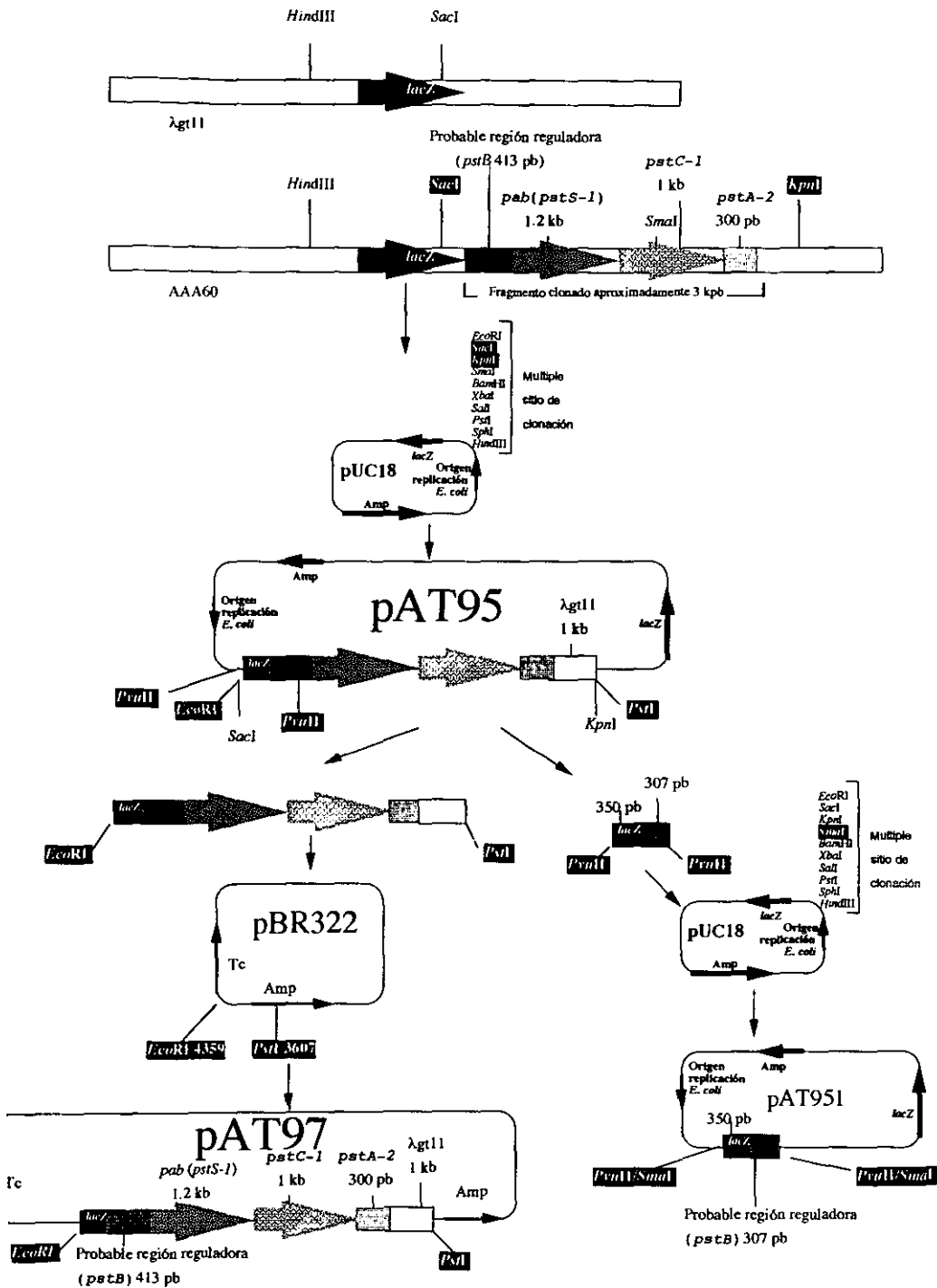


Figura 3.- Esquema de la construcción de los plásmido pJT95, pAT951 y pAT97. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

fue resuspendida con 10 ml de glicerol al 10% y alicuotadas en tubos de 1.5 ml con 500 μ l. Finalmente los tubos con las alicuotas de bacterias fueron primero congelas en hielo seco y posteriormente se guardaron en un ultracongelador a -70 °C por un periodo de 3 meses.

5.- Condiciones de electroporación.

Se utilizó el electroporador BTX modelo ECM600 y las condiciones para electroporar *E. coli* y *M. smegmatis* fueron 1.4 Kv, 25 μ F y 1000 Ohms.

6.- Construcción de la genoteca de *M. tuberculosis* en el cósmido pYUB328.

Doce μ g de DNA genómico de *M. tuberculosis* contenidos en 7 μ l de agua. fueron mezclados con 135.5 μ l de amortiguador 1 x (proporcionado por la compañía) para ser digeridos parcialmente con la enzima *Sau3AI*. La digestión se realizó en cinco tubos de 0.5 μ l, al primero se le adicionó 47.5 μ l del amortiguador con el DNA y en los otros cuatro tubos se alicuotaron 25 μ l de esta misma solución. Posteriormente al primero se le adicionaron 2.5 μ l de *Sau3AI* para quedar a una concentración de 0.025 unidades/ μ g de ADN. Este tubo se mezcló y el 50 % del contenido de éste, se transfirió al tubo dos quedando la concentración de la enzima 0.0125 unidades/ μ g de ADN. El mismo procedimiento se siguió para los tres tubos restantes. La reacción se incubó a 37 °C por 30 minutos y la reacción de digestión parcial se detuvo adicionando EDTA a una concentración final de 20 mM por cada tubo. La digestión parcial de cada tubo se analizó en un gel de agarosa al 0.4 % y se corrió a 20 Volts toda la noche. observando que la mayor cantidad de fragmentos entre 35 y 40 kb se generaron en el tubo de reacción dos.

La cantidad total de DNA de *M. tuberculosis* digerido parcialmente con la condición del tubo dos fue de 200 µg.

El vector utilizado para construir la genoteca fue el cósmido pYUB328, obsequiado gentilmente por El Dr. WR Jacobs del Howard Hughes Medical Institute, Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY. Ocho µg de este cósmido fueron digeridos con la enzima *Xba*I y luego desfosforilados con 0.5 U de fosfatasa alcalina incubándose a 37 °C por 2 horas. El ADN desfosforilado fue extraído con fenol:cloroformo (1:1), después con cloroformo y luego se precipitó con 2 volúmenes de etanol absoluto y se lavó con etanol al 70%, posteriormente fue resuspendido con H₂O. Finalmente este DNA fue digerido con *Bam*HI e incubado a 37 °C por 2 horas, después fue sometido a electroforesis en un gel de agarosa al 0.8 %.

Los fragmentos de entre 35-40 kb de *M. tuberculosis* generados con *Sau*3AI y los fragmentos de 1.16 kb y 3.78 kb del pYUB328 generados con un extremo *Xba*I-desfosforilado y otro con *Bam*HI-cohesivo fueron obtenidos al sustraerlos de un gel de agarosa al 0.8 % y purificados con perlas de vidrio (matriz de sílice, el principio en el que se basa, es que los ácidos nucleicos se unen a las partículas de la matriz en presencia de sales caotrópicas, después de lavar la matriz se eluye el ácido nucleico utilizando amortiguadores bajos en sales) siguiendo el protocolo de la compañía Bio101 (Gene Clean) (figura 4).

La reacción de ligación se hizo con 1 µg de los fragmentos de entre 35-40 kb de *M. tuberculosis* y con 145 ng del fragmento de 1.16 kb y 472 ng del fragmento de 3.78 kb del pYUB328. La relación molar vector-inserto fue de 5:1, respectivamente y después se adicionaron 400 unidades de T4 DNA ligasa en un volumen de 20 µl y se incubó a 4 °C por

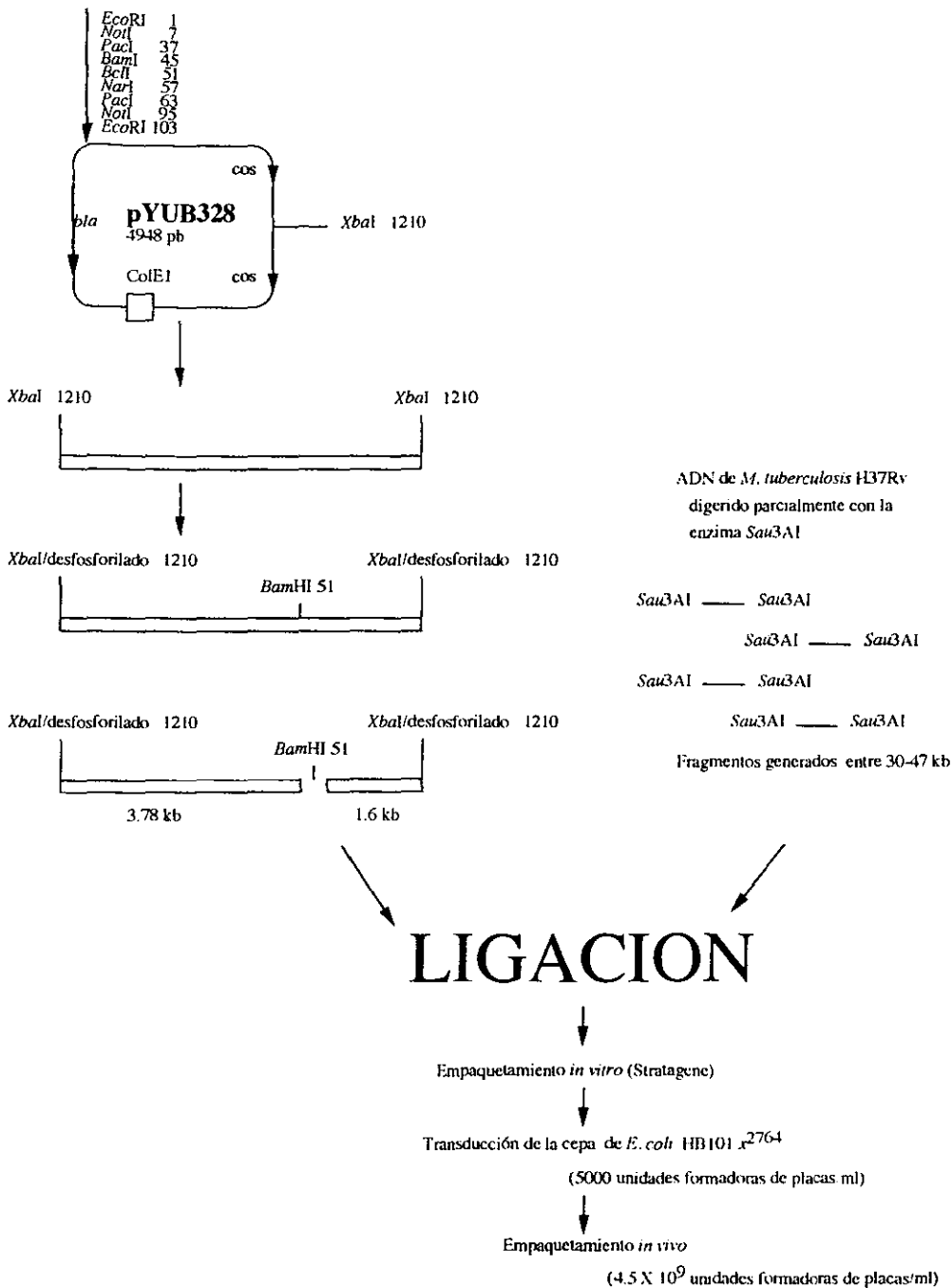


Figura 4.- Esquema donde se muestra cómo se construyó la genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en el plásmido pYUB328.

48 horas. Cuatro μl de la reacción de ligación se empaquetaron *in vitro* con el estuche de empaquetamiento GigapaK^R II XL, siguiendo el protocolo del proveedor (Stratagene).

Quinientos μl de las partículas resultantes del empaquetamiento *in vitro*, se usaron para transducir 1 ml de la *E. coli* HB101 (χ^{2764}), crecidas previamente en LB suplementado con 10 mM de MgSO_4 , 0.4% de maltosa e incubadas a 30 °C a una DO_{600} de 1. Estas bacterias y las partículas transductantes se incubaron a 30 °C por 45 minutos para permitir la adsorción. Después se añadieron 600 μl de LB a la suspensión celular-partículas transductantes y se incubó a 30 °C por 1 hora con agitación para permitir la expresión del gen de resistencia a ampicilina. Las clonas recombinantes se seleccionaron en cajas de LB agar suplementado con ampicilina a 300 $\mu\text{g/ml}$ y estreptomycin a 100 $\mu\text{g/ml}$ y se incubaron toda la noche. La estimación de número de clonas para tener representado el genoma se realizó utilizando la ecuación matemática $N = \ln(1-P) / \ln[1-(I/G)]$ (Ausbel *et al.*, 1987). N es el número de clonas recombinantes necesario para tener representado el genoma con una probabilidad (P) del 99%. I es el tamaño de los fragmentos clonados en bases y G es el tamaño del genoma en bases. La estimación del número mínimo de clonas recombinantes requeridas fue de 577. El número de clonas obtenido fue de 5000, estimándose con una probabilidad del 99 % que se tenía representado el genoma de *M. tuberculosis* 8.6 veces. Considerando que el tamaño del vector con el inserto para poder ser empaquetado dentro de una cabeza del bacteriófago λ debe tener cierto tamaño que oscila entre el 78 % a un 105 % con respecto al genoma del bacteriófago λ silvestre, se asumió que en todos los cósmidos recombinantes obtenidos contienen un inserto promedio entre 35 kb a 45 kb.

La amplificación de los cósmidos recombinantes se llevó a cabo raspando de las cajas las 5000 clonas recombinantes con las que se hizo una suspensión celular homogénea contenida en 10 ml de LB. Posteriormente se inoculó un matraz con 500 ml de LB suplementado con 0.4 % de glucosa, 300 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina y 100 $\mu\text{g/ml}$ estreptomycinina con 1 ml de la suspensión celular anterior y se incubó a 30 °C con agitación moderada hasta llegar a una DO_{600} de 0.3.

La inducción del profago se hizo incubando el cultivo anterior en baño maría a 45°C por 14 minutos y luego se incubó con agitación vigorosa a 37 °C por 3 horas. Después, las células fueron centrifugadas a 10 k rpm por 20 minutos y la pastilla celular fue resuspendida en 7 ml de amortiguador SM (10 mM MgSO_4 , 100 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7.5) y se lisó con 2 % de cloroformo e incubó a 37 °C con agitación por 15 minutos. El lisado resultante fue tratado con 100 μl de DNasa I (10 mg/ml) y se incubó a 37 °C por 30 minutos. Los restos celulares fueron removidos por centrifugación a 10 k rpm y al sobrenadante con los cósmidos recombinantes empaquetados *in vivo*, se le adicionó cloroformo a una concentración final del 0.3 % (v/v) y se almacenó a 4 °C.

El título de los cósmidos recombinantes reempaquetados se calculó mediante diluciones seriadas del banco amplificado, desde 10^{-2} hasta 10^{-10} . Diez μl de cada una de las diluciones se emplearon para transducir 200 μl de células DH5 α IQ crecidas en LB suplementado con 10 mM MgSO_4 . La suspensión de células-partículas transductantes fue incubada a 37 °C por 20 minutos para permitir la adsorción, posteriormente se adicionaron 300 ml de LB y se incubaron a 37 °C por una hora, para permitir la expresión de los genes de resistencia a los antibióticos. Finalmente cada dilución de partículas transductantes-células bacterianas fue crecidas sobre cajas de LB con 300 $\mu\text{g/ml}$ de ampicilina .

El título del banco reamplificado fue de 4.5×10^9 partículas transducentes/ml. A la genoteca obtenida constituida por las 5.000 clonas se le designó como pJT4COS.

7.- Identificación de los cósmidos recombinantes conteniendo el locus *pst* de *M. tuberculosis*.

Por medio de la técnica de hibridación en colonia se identificaron de la genoteca reamplificada pJT4COS de *M. tuberculosis*, 23 cósmidos recombinantes que conteniendo el locus *pst*, utilizando como detector homólogo el fragmento de 2.1 kb *PvuII* del bacteriófago λ AAA60 conteniendo el extremo 3' del gen *pstB* y el gen *pstS-1* completo y el extremo 5' del gen *pstC-1*. Brevemente, la búsqueda del locus *pst* se hizo en un total de 2000 colonias crecidas en 10 cajas petri de 8 centímetros de diámetro con de LB agar, las cuales fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad número de catálogo 162-0196). Con el objetivo de lisar las colonias y exponer su ADN para la hibridación posterior, las membranas con las colonias adheridas hacia arriba fueron colocadas en un papel Watman 3 mm humedecido con una solución de SDS al 10 % por 5 minutos, posteriormente se transfirieron a otro papel Watman humedecido con la solución de desnaturalización (NaOH al 0.5 N y NaCl al 1.5 M) por 5 minutos, después se transfirió a otro papel Watman humedecido con la solución de neutralización (NaCl al 1.5 M y Tris-HCl 0.5 M) por 5 minutos y finalmente se transfirió a una membrana humedecida con el amortiguador de SSC 2x por 5 minutos preparado como lo describe Sambrook *et al.*, 1989. El ADN de las colonias fue fijado a la membrana con luz ultravioleta y posteriormente las membranas fueron hibridadas con el detector homólogo de 2.1 kb marcado con digoxigenina, con 50 % de formamida, las soluciones y condiciones de revelado por

quimioluminiscencia fueron realizadas de acuerdo al protocolo de la compañía de Roche (antes Boehringer lakeside).

8.- Construcción de las fusiones traduccionales.

Construcción del plásmido pJT19971.

Con las enzimas *NotI*-*BaII* se obtuvo un fragmento de 4.62 kb del cósmido seleccionado pJT46COS. Este contiene 1.3 kb arriba del codón de inicio del gen *pstB*, el gen *pstB*, *pstS-1*, *pstC-1* y 262 b del gen *pstA-1*. Los extremos 5' salientes generados con *NotI* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa generando extremos rasurados. Este fragmento se subclonó en el vector intercambiable pMV261 en el sitio de *HpaI*, creando el plásmido pJT199701. Este fue digerido con *Clal* y los extremos 5' salientes generados fueron rellenados con nucleótidos con la enzima T4 DNA polimerasa. En esta construcción se adicionaron 15 pb (AA CTA CGT CGA CAT C) al final del gen *pstA-2* provenientes del pMV261. Por otra parte, el gen *lacZ* de *E. coli* fue obtenido con la enzima *SaII* del plásmidos pMC1871 y los extremos 5' salientes fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa; este fragmento de 3.1 kb se subclonó en el plásmido pJT199701 digerido con *Clal*/T4 DNA polimerasa más nucleótidos, obteniéndose finalmente el plásmido pJT19971, el cual contiene la fusión traduccional del locus *pst-lacZ* (figura 5).

El oligonucleótido LACZ1 (5' GGCCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGG 3') fue diseñado de la secuencia del gen *lacZ* de *E. coli* y fue sintetizado en el Instituto de Biotecnología, Cuernavaca Morelos, Universidad Nacional Autónoma de México. Este oligonucleótido fue utilizado para secuenciar y verificar el frente de lectura de la

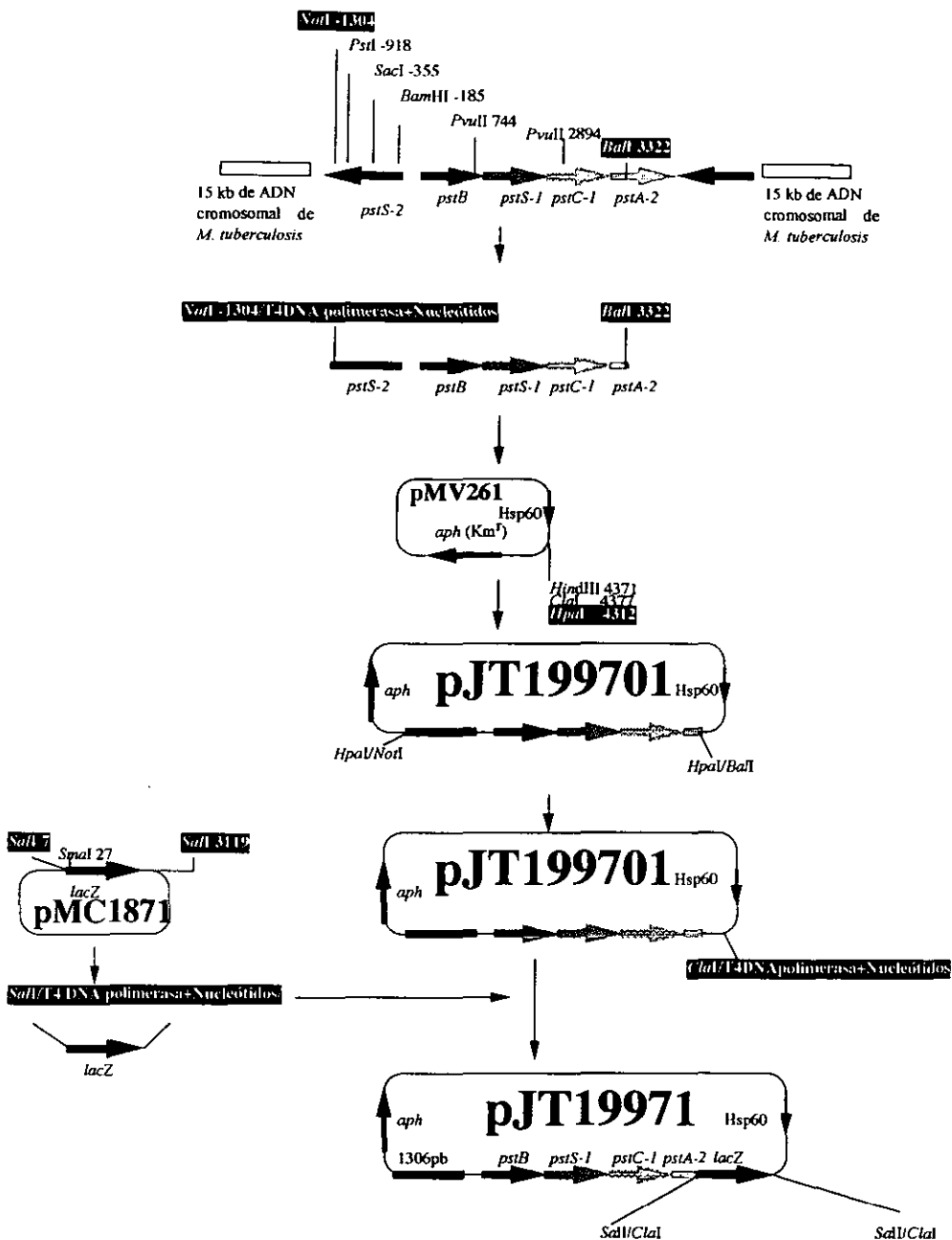


Figura 5.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19971. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están señalados con un cuadro negro.

construcción traduccional con el gen *lacZ*, pJT19971 y de las construcciones descritas a continuación (pJT19974, pJT19975 y pJT19976). La secuencia nucleotídica se hizo usando la técnica de Sanger *et al.*, (1977), utilizando el estuche de secuenciación Termosequenasa (Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.)

Construcción del plásmido pJT19972.

El plásmido pJT19971 fue digerido con las enzimas *XbaI-HindIII*, eliminándose un fragmento de 418 pb que contenía el promotor del gen de choque de calor de *M. tuberculosis* (*hsp60*). Los extremos 5' salientes generados con *XbaI-HindIII* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa. El plásmido linearizado fue ligado sobre si mismo, creando el plásmido pJT199702. Este plásmido fue digerido parcialmente con *EcoRI-PstI*, eliminando un fragmento de 1.3 kb que contenía 702 pb del gen *pstS-2*, 402 pb del gen *pstB* y 214 pb de la región intergenica entre ambos genes, los extremos 3' salientes generados con *PstI* fueron eliminados con la enzima T4 DNA polimerasa y los extremos 5' salientes generados con *EcoRI* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa y después fue ligado sobre si mismo, generándose el plásmido pJT19972. La fusión traduccional contenía 406 pb del gen estructural *pstB*, los genes *pstS-1 pstC-1* y 267 pb del gen *pstA-2* fusionados en fase con el gen *lacZ* (figura 6).

Construcción del plásmido pJT19973.

El plásmido pJT19971 fue digerido con *PstI*, generándose dos fragmentos, uno de 4.9 kb y otro de 7.35 kb. Este último contenía la fusión traduccional que se subclonó en el sitio *PstI* del pUC18, generándose el plásmido pJT199703. posteriormente este plásmido

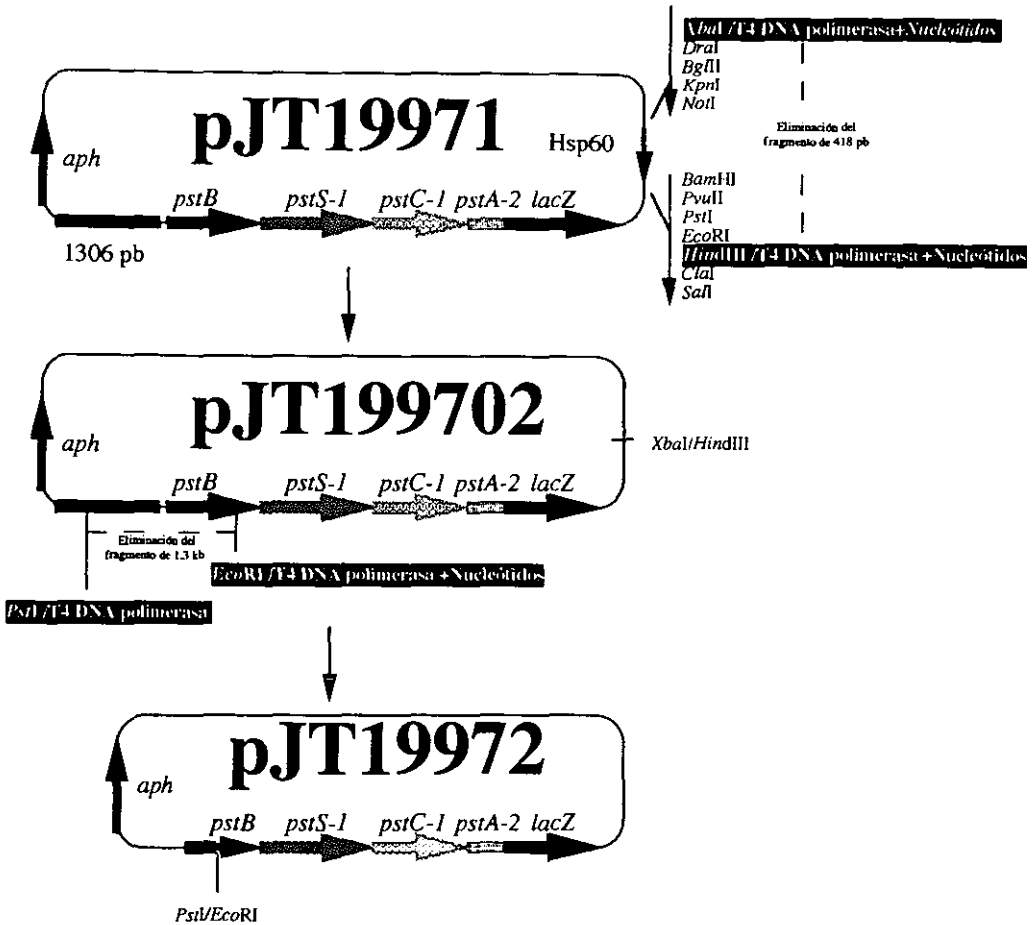


Figura 6.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19972. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

fue digerido con *NcoI* generándose dos fragmentos, uno de 3.2 kb y otro de 6.9 kb, los extremos 5' *NcoI* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa, después fue digerido con *PstI*, liberándose del fragmento de 6.9 kb un fragmento 3.6 kb, el cual se subclonó en el pMV261 digerido con *HpaI-PstI*, creándose el plásmido pJT19973. Este plásmido contenía 244 pb del gen *pstC* y 267 pb del gen *pstA-2* fusionado en fase con *lacZ* (figura 7).

Construcción del plásmido pJT19974.

Un fragmento de 2049 pb, que contenía 1304 pb antes del inicio del gen *pstB* y 744 pb del gen *pstB*, fue obtenido con *NotI-PvuII* del cósmido pJT46COS. Los extremos 5' salientes generados con *NotI* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa, posteriormente este fragmento se subclonó en el sitio de *SmaI* del pMC1871, generándose el plásmido pJT199704, el cual se digirió con *PstI* generándose dos fragmentos uno de 4.75 kb y otro de 4.7 kb, éste último contenía los 918 pb antes del inicio del gen *pstB* y 744 pb del gen *pstB* fusionado con *lacZ*, fue subclonado en el pMV261 digerido con *PstI*, obteniéndose así el plásmido pJT19974 (figura 8).

Construcción del plásmido pJT19975.

Un fragmento de 929 pb, que contenía 185 pb arriba del codón de inicio del gen *pstB* y 744 pb del gen *pstB* fue obtenido con *BamHI-PvuII* del cósmido pJT46COS. Los extremos 5' salientes generados con *BamHI* fueron rellenados con nucleótidos y con la enzima T4 DNA polimerasa y posteriormente subclonado al pMC1871 digerido con *SmaI*, generándose el plásmido pJT199705. Este último plásmido se digirió con *PstI* generándose dos fragmento uno de 4.3 kb y otro de 4 kb, éste último contenía los 185 pb antes del inicio

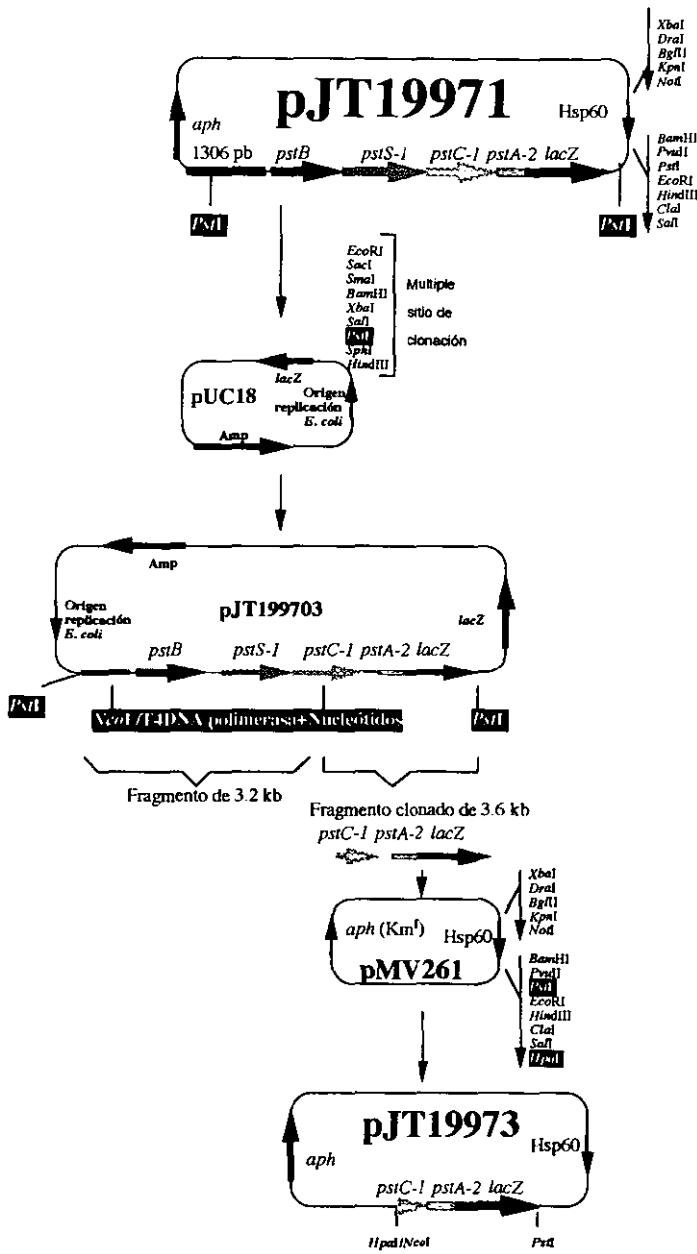


Figura 7.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19973. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

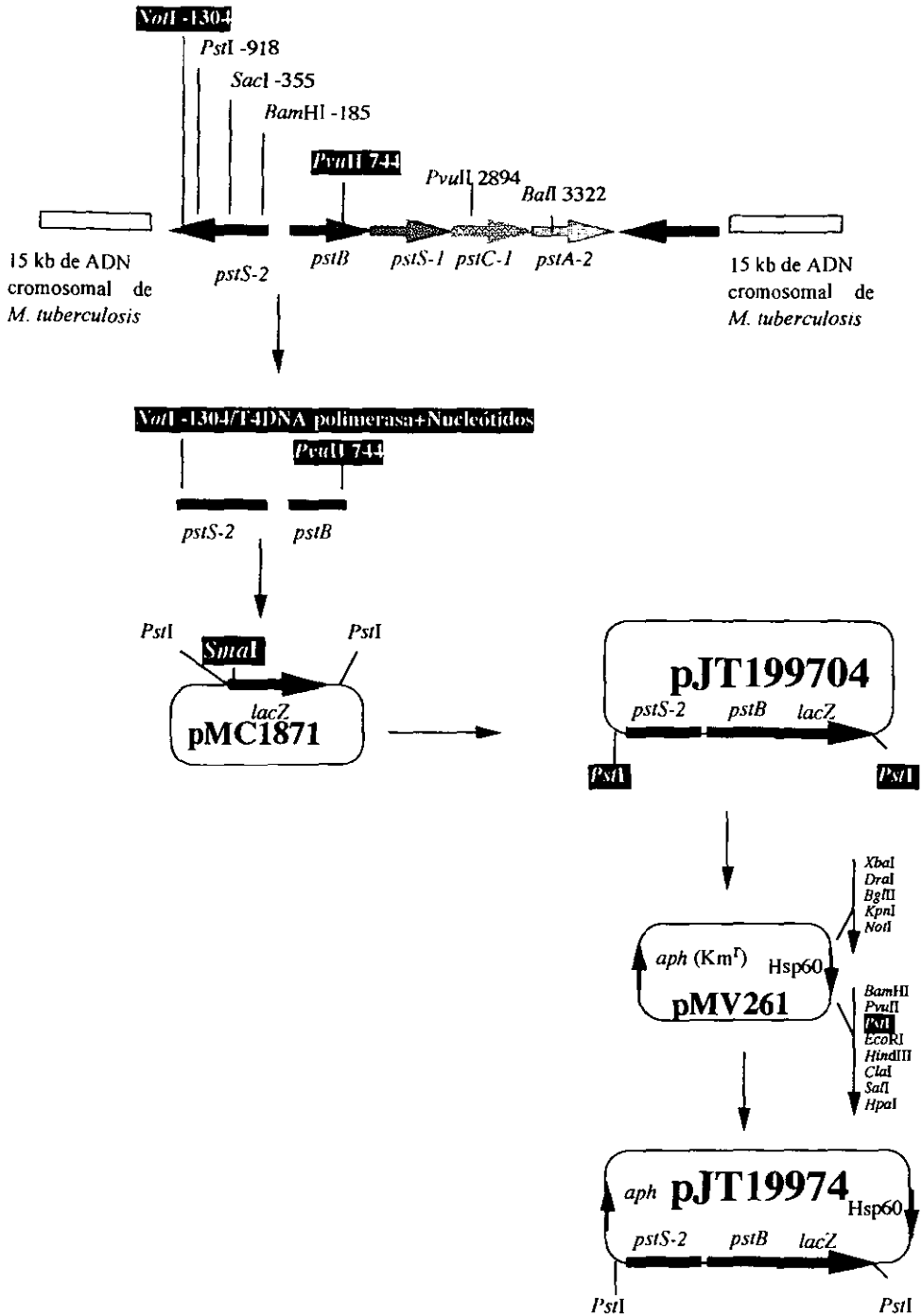


Figura 8.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19974. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

del gen *pstB* y 744 pb del gen *pstB* fusionado con *lacZ*. finalmente éste fue subclonado en el pMV261 digerido con *PstI*, obteniéndose el plásmido pJT19975 (figura 9).

Construcción del plásmido pJT19976.

Se obtuvo un fragmento de 2.1 kb del pJT46COS con *PvuII*, éste contenía 104 pb del gen estructural *pstB*, el gen *pstS-1* y 858 pb del gen *pstC-1*. éste se subclonó en el sitio de *SmaI* del pMC1871, generando el plásmido pJT199706, éste contiene la fusión traduccional de los genes mencionados previamente con el gen *lacZ*. Finalmente éste se digirió con *PstI* generándose dos fragmentos uno de 4.3 kb y otro de 5 kb, éste último fragmento se subclonó en el sitio *PstI* del pMV261 para generar el plásmido pJT19976 (figura 10).

Con el objetivo de evitar alguna influencia del promotor del gen del choque de calor (*hsp60*) y del promotor del gen *aph* de *M. tuberculosis* sobre los genes del locus *pst* de *M. tuberculosis* fusionados con el gen *lacZ* de *E. coli* (previamente descritos), por el patrón de restricción, se verificó que al ser clonadas en el plásmido pMV261 quedarán en sentido divergente a mencionados promotores.

9.- Condiciones del crecimiento bacteriano con y sin fosfato.

M. smegmatis transformada con las diferentes construcciones fue crecida en agar 7H11. Posteriormente una colonia de cada transformante fue inoculada en 100 ml de 7H9. Las bacterias fueron crecidas a 37 °C en agitación a 200 rpm, hasta alcanzar una D.O. ₆₀₀ de 0.5. Después, el cultivo fue centrifugado a 15 k rpm y la masa bacteriana fue lavada con 150 ml de medio Tris Glucosa (TG) pH 7.5 (20 mM de NH₄Cl, 3 mM de Na₂SO₄, 1 mM de MgCl₂, 0.2 mM de CaCl₂, 80 mM de NaCl, 20 mM de KCl, 0.002 mM de ZnCl₂, 120 mM

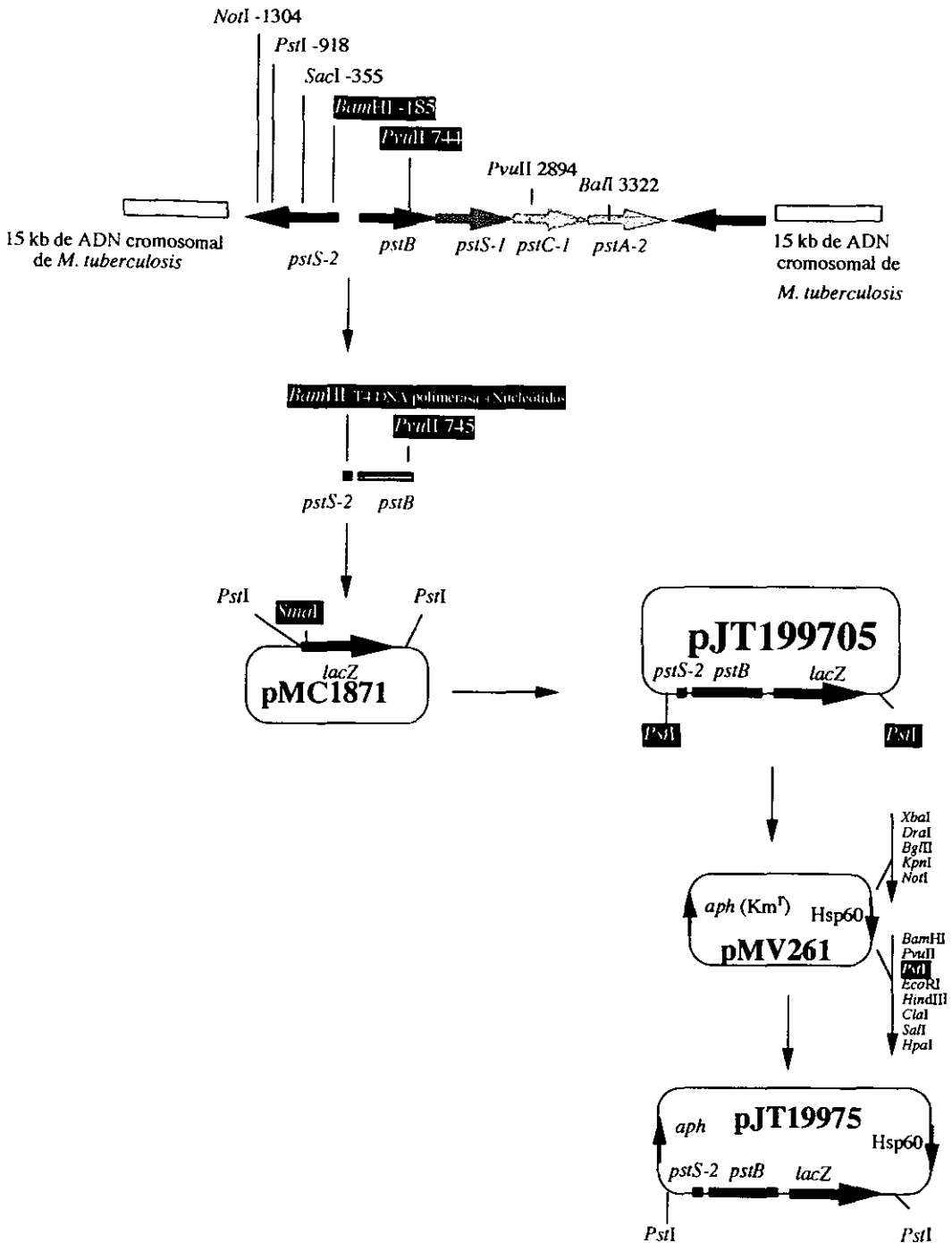


Figura 9.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19975. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

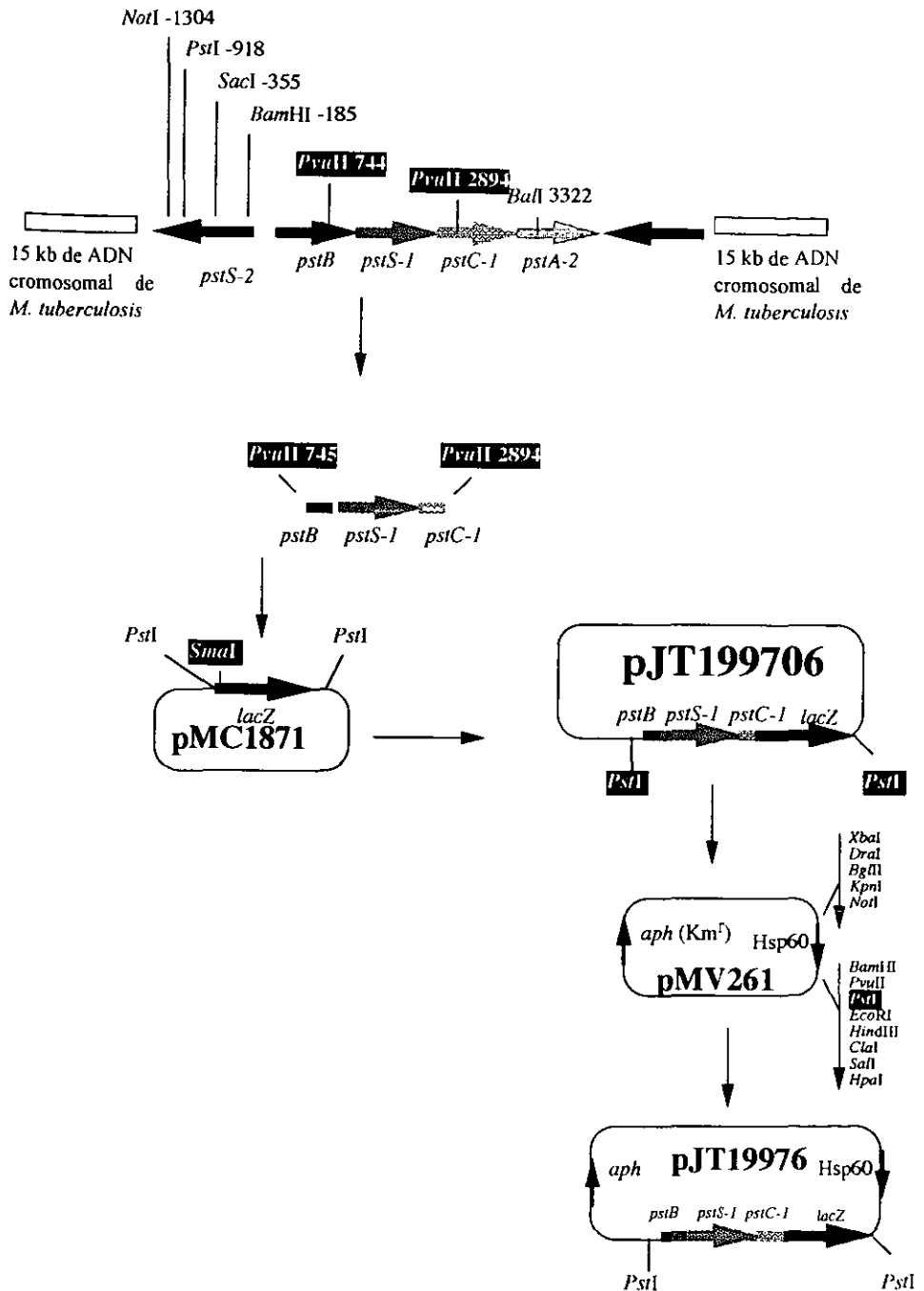


Figura 10.- Esquema de la construcción del plásmido pJT19976. Los sitios de las enzimas de restricción donde se llevó a cabo la clonación están indicados con un cuadro negro.

de Trizma base) y centrifugada a 15 k rpm. La masa bacteriana fue entonces resuspendida en 1 ml del medio TG, de esta muestra se inocularon 400 μ l en 120 ml del medio TG más suplementos (Tween 80 al 0.05%, glucosa al 2%, peptona al 0.01%) y con 64 mM de K_2HPO_4 (condición de alto fosfato), otros 400 μ l fueron inoculados a 120 ml del medio TG más suplementos y sin fosfatos. La kanamicina a 25 μ g/ml fue adicionada cuando *M. smegmaticas* fue transformada con el plásmido control y con los plásmidos que contienen las fusiones traduccionales. Se tomaron 10 ml de cada cultivo, a las 0, 24, 48, 72 y 96 horas de crecimiento. Cada cultivo bacteriano se repitió tres veces.

10.- Medición de las actividades enzimáticas.

Ensayos enzimáticos: Para la cuantificación de proteínas, los ensayos enzimáticos y la lectura de la D.O. a 600nm, se utilizaron 800 μ l de cultivo provenientes de los 10 ml tomados a los diferentes tiempos de cada uno de los cultivos en la condición de alto y bajo fosfato. Se hicieron tres experimentos por cada cultivo.

Para la cuantificación de la β -galactosidasa, a los 800 μ l de cultivo se les adicionaron 200 μ l de amortiguador Z (60 mM Na_2HPO_4 , 40 mM de NaH_2PO_4 , 10 mM KCl, 1 mM de $MgSO_4$, 50 mM de β -mercaptoetanol ajustado a pH 7). Posteriormente se agregaron dos gotas de cloroformo y una de SDS al 0.01%, la muestra se agitó vigorosamente por 30 segundos, y después se le adicionaron 200 μ l de *o*-Nitrofenil- β -D-galactósido a 4 mg/ml (Research Organics, Inc.), disuelto en amortiguador Z. Las muestras se incubaron a 28 °C, hasta observar el cambio de color de blanco a amarillo. La reacción fue parada en hielo y los tubos fueron centrifugados a 14 k rpm por 5 minutos a 4 °C y la lectura a DO_{420} fue determinada del sobrenadante. Las unidades de β -galactosidasa fueron

calculadas de acuerdo a lo establecido por Miller, (1972) usando la siguiente fórmula: $1000 \times DO_{420}/\text{tiempo (minutos)} \times 0.8 \times DO_{600}$.

La actividad de la fosfatasa alcalina se determinó como sigue: a 800 μl de cultivo, se les adicionó 200 μl de amortiguador de Tris-HCl 1 M pH 8. Después se agregaron dos gotas de cloroformo y una gota de SDS al 0.01%, las muestras se agitaron vigorosamente por 30 segundos y posteriormente se les adicionaron 200 μl de 4 nitrofenilfosfato a 2 mg/ml (Boehringer Mannheim Germany) solubilizado en Tris-HCl 1M pH 8. Las muestras se incubaron a 37 °C, hasta obtener un color amarillo. La reacción fue parada agregando a cada tubo 200 μl de Na_2HPO_4 0.5 M. posteriormente los tubos de reacción fueron centrifugados a 14 k rpm por 5 minutos a 4°C y la lectura a DO_{420} fue determinada del sobrenadante. Las unidades de fosfatasa alcalina fueron calculadas de acuerdo a lo establecido por Brickman y Beckwith, (1975) empleando la siguiente fórmula: $1000 \times DO_{420}/\text{tiempo (minutos)} \times 0.8 \times DO_{600}$.

11.- Extractos bacterianos.

Las proteínas del filtrado del cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv crecido en el medio Proskauer y Beck modificado por Youmans (PBY) por 4 y 5 semanas fueron obtenidas como lo describió Espitia *et al.*, (1989). Las proteínas del filtrado del cultivo de la cepa de *M. smegmatis* transformada con el plásmido pJT19971 crecida en 7H9/glucosa 2% y kanamicina (25 $\mu\text{g/ml}$) en agitación a 37 °C, fueron obtenidas por centrifugación del medio y precipitación del mismo con el 73 % de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Las proteínas obtenidas fueron dializadas con agua bidestilada. El filtrado de cultivo enriquecido de las proteínas PstS-I

nativa y recombinante fueron obtenidas después del tratamiento con ácido-alcohol como lo describió Espitia *et al.*, (1989).

12.- Western blot.

La separación electroforetica de las proteínas en geles de poliacridamida-SDS y la inmunodetección de las mismas fueron llevadas a cabo de acuerdo a los protocolos descritos por Laemli, (1970) y Towbin *et al.*, (1979), respectivamente. Los cultivos de *M. smegmatis* transformada con cada una de las diferentes construcciones y con la misma D.O.₆₀₀, fueron centrifugadas y la pastilla bacteriana de cada cultivo fue resuspendida en amortiguador de electroforesis, al igual que 5 µg de las proteínas del filtrado de cultivo enriquecido en la PstS-1 de *M. tuberculosis* y de *M. smegmatis* transformada. Todas las muestras fueron hervidas por 5 minutos y separadas en un SDS-PAGE al 12% con un gel separador del 5%. Las proteínas fueron posteriormente transferidas a una membra de Nylon (Millipore CO., Bedford, MA) e incubadas por 1 hora a temperatura ambiente con concanavalina A-peroxidasa (Sigma Chemical CO., St Louis, MO) o con una dilución de 1/1000 del anticuerpo monoclonal anti-PstS-1 diluido en PBS al 1x (13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM Na₂HPO₄.7H₂O y 0.14 mM KH₂PO₄ pH 7.4) con 3 % de BSA-Tween 20 al 0.3 % (v/v). Después, las membranas se lavaron con PBS-Tween 20. La membrana con el anticuerpo se incubó con la proteína A conjugada con peroxidasa. La actividad de la peroxidasa fue revelada adicionando 50 mg de Cloruro de 3,3-diaminobenzidina-HCl disuelto en 25 ml de PBS-Tween 20, añadiendo al final a esta solución 25 ml de peróxido de hidrógeno al 30 %.

13.- Separación de las proteínas por electroforesis de Doble Dimensión.

La electroforesis en doble dimensión se llevó a cabo como se describe a continuación. A 10 µg de la fracción enriquecida de los filtrados del cultivo de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* transformada con pJT19971, se les adicionó 9 M de urea más amortiguador de lisis, éste contenía urea y el detergente Nonidet-P40 (O' Farrel *et al.*, 1975). Para la primera dimensión las muestras fueron separadas por su punto isoeléctrico en capilares que contenían geles con 4 % de anfólitos con un intervalo de pH de 3.5 a 5 (Pharmacia Biotech, Herts, United Kingdom) previamente recorridos con 5 µl del amortiguador de la muestra por 10 minutos a 200, 500 y 400 volts al finalizar los 30 minutos de recorrida el amperaje casi fue de cero, después se separaron en PAGE-SDS (segunda dimensión). Posteriormente las proteínas fueron transferidas a membranas de Nylon y los antígenos fueron incubados con una dilución 1/2000 del anticuerpo monoclonal TB71 y revelados con un anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa como se describió previamente.

14.- Otros reactivos.

Las endonucleasas de restricción, T4 DNA polimerasa, *Taq* DNA polimerasa, estuche de marcaje para ADN por digoxigenina, lizosima, proteinasa K, SDS, CTAB, antibióticos (kanamicina, ampicilina, estreptomycin y cloranfenicol) fueron obtenidos de Roche.

La membrana de nitrocelulosa para el Southern blot y los nucleótidos marcados radioactivamente α -[32]-dATP, γ -[33]-dATP fueron obtenidos de Amersham Pharmacia Biotech UK Ltd.

VII.- RESULTADOS.

1.- Análisis del gen *pstS-1* en el género *Mycobacterium*.

Debido al lento crecimiento y al nivel de bioseguridad que se requiere para manipular a el *M. tuberculosis*, se evaluaron otras micobacterias con el fin de eventualmente estudiar la expresión de algunos genes de este patógeno. Se empezó por determinar mediante la técnica de Southern blot, la existencia del gen *pstS-1* en las micobacterias no patógenas de rápido crecimiento y en las micobacterias potencialmente patógenas. El ADN cromosomal de nueve micobacterias (ver materiales y métodos) fue digerido con la enzima *PvuII* y los fragmentos separados por electroforesis en geles de agarosa al 1% y posteriormente transferidos a una membrana de nitrocelulosa. La hibridación se llevó a cabo a 42 °C con 50% de formamida, utilizando como detector el gen *pstS-1* de *M. tuberculosis* (figura 14, parte b). Únicamente las cepas de *M. bovis* BCG, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. tuberculosis* H37Ra fueron positivas (figura 11, carril 4, 5 y 10). Cuando la hibridación se llevó a cabo sin formamida a 42 °C, *M. intracellulare* fue también positiva (dato no mostrado).

2.- Expresión de la fosfatasa alcalina en *M. smegmatis* y *M. vaccae*.

Considerando utilizar como sistema modelo a las micobacterias no patógenas y de rápido crecimiento como *M. smegmatis* y *M. vaccae*, para estudiar algunos genes involucrados en el metabolismo y en la regulación de fosfato de *M. tuberculosis*, evaluamos la cinética de crecimiento de ambas bacterias en el medio TG. Este medio nos permitió controlar las concentraciones de fosfato. El crecimiento de las micobacterias en este medio fue similar al crecimiento en el medio 7H9. La actividad de la fosfatasa alcalina

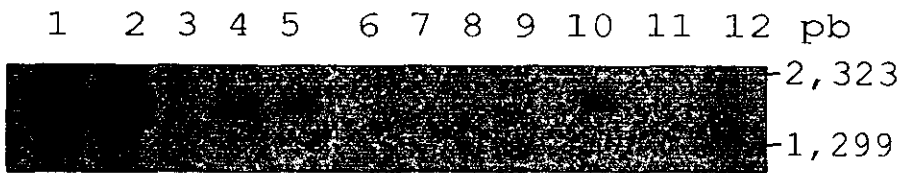


Figura 11.- Southern blot. El ADN cromosomal de 9 micobacterias y de los plásmidos pAT96 y pAT97, fueron digeridos con *PvuII* y separados en un gel de agarosa al 1%. 1.- plásmidos pAT96; 2.- pAT97; 3.- *M. vaccae*; 4.- *M. tuberculosis* H37Ra; 5.- *M. tuberculosis* H37Rv; 6.- *M. smegmatis*; 7.- *M. phlei*; 8.- *M. kansasii*; 9.- *M. intracellulare*; 10.- *M. bovis* BCG; 11.- *M. avium*. Se utilizó como detector el gen *pstS-1* de *M. tuberculosis*, contenido en un fragmento de *PvuII* de 2.1 kb

únicamente se detectó cuando las micobacterias crecieron en el medio TG sin fosfato (figura 11, parte c). No se detectó ninguna actividad al crecerlas con 64 mM de fosfato o al crecerlas en el medio 7H9. Estos resultados muestran que ambas bacterias son potencialmente útiles para estudiar la expresión de los genes de *M. tuberculosis* regulados por fosfatos.

3.- Expresión de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* en *E.coli*.

Con el objetivo de definir si la expresión de la proteína de 36 kDa (PstS-1) de *M. tuberculosis* expresada por el bacteriófago AAA59, el plásmido pAA26 y el bacteriófago AAA60 era debido al reconocimiento de una supuesta región promotora identificada por Dale y Patky (1990) localizada entre los 150 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* por el activador transcripcional PhoB de *E. coli* o si la expresión de esta proteína fue producto de una fusión transcripcional o traduccional generada entre la región reguladora o el gen estructural *lacZ* de *E. coli* con el gen *pstS-1*, se eliminó con la endonucleasa *SacI* un fragmento de 4.5 kb del plásmido pAA26, que contenía parte del bacteriófago λ gt11, el promotor y parte de la región reguladora del gen *lacZ*, generándose el plásmido pAT96 (figura 2). Por otra parte, para analizar si la región reguladora del gen *pstS-1* estaba más allá de los 150 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*, se subclonó un fragmento de 4 kb del bacteriófago AAA60, en el que se localizan aproximadamente 650 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*, creándose el plásmido pAT97 (figura 3). El plásmido pAT97 contiene con respecto al codón de paro del gen *pstS-1*, una región de 1.3 kb en dirección 3' a diferencia con los plásmidos pAA26 y pAT96, los cuales contienen 720 pb con respecto al codón de paro del gen *pstS-1*. Las diferencias en la región 3' de estos

plásmidos no se consideraron que influyeran para los estudios de expresión de la proteína de 160 kDa y 36 kDa, porque Andersen y Hansen (1989), realizaron eliminaciones en dirección 3' al gen *pstS-1* con la exonucleasa *Bal31* en el plásmido pAA26 y no observaron algún efecto en la expresión de la proteína de 160 kDa y en la de 36 kDa (PstS-1) expresadas por este plásmido. Estos resultados preliminares les permitieron a estos autores sugerir que la proteína de 160 kDa expresada fue el producto de una fusión traduccional entre el gen estructural *lacZ* de *E. coli* y el gen *pstS-1* y la expresión de la proteína de 36 kDa, fue probablemente debida a que la proteína PhoB de *E. coli* reconoció algún promotor localizado entre los 650 pb arriba del gen *pstS-1* de *M. tuberculosis*.

Así para reafirmar o descartar estas hipótesis, los plásmidos pAT96, pAA26, pAT97 y pBR322 fueron utilizados para transformar independientemente a las cepas de *E. coli* CE1248 y CE1224 (ver tabla 1), la primera expresa constitutivamente el regulón de fosfato debido a una mutación en el gen sensor *phoR*. La segunda a pesar de tener eliminado el gen que codifica para la porina PhoE, regula de manera silvestre el regulón de fosfato. Las bacterias transformadas fueron crecidas individualmente en el medio TG con y sin fosfato. Posteriormente se analizó el perfil de proteínas utilizando un anticuerpo policlonal anti-PstS-1.

Por inmunoblot se detectó en la transformante CE1248/pAA26 la expresión constitutiva de una proteína de 160 kDa y otra de 36 kDa (PstS-1) tanto en alta y baja concentración de fosfato (datos no mostrados). En la transformante CE1248/pAT96 (el plásmido pAT96 se originó al eliminar la región promotora y parte del gen estructural *lacZ* del plásmido pAA26), no fue detectada la expresión de alguna de las proteínas citadas (datos no mostrados). En la transformante CE1248/pAT97 (este plásmido contiene 650 pb antes del codón de inicio del gen *pstS-1*), no fue detectada la proteína de 160 kDa y la de

36 kDa, tampoco fueron detectadas estas proteínas en la cepa CE1248 transformada con el vector pBR322.

Los resultados antes descritos también fueron observados en la cepa de *E. coli* CE1224, la cual contiene eliminado el gen que codifica para la proteína de membrana externa PhoE, pero regula la entrada de fosfato de igual manera que una cepa de *E. coli* silvestre. La transformante CE1224/pAA26, expresó constitutivamente la proteína de 160 kDa y la proteína PstS-1, independientemente de la concentración de fosfato (figura 12, carril 3 y 8). En la transformante CE1224/pAT96, CE1224/pAT97 y CE1224/pBR322, no se observó la expresión de alguna de las proteínas en condiciones de alto y bajo fosfato (figura 12). Estos resultados sugirieron que entre los 150 pb y 650 pb hacia arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* no hubo alguna región consenso que fuera reconocida por la proteína activadora PhoB de *E. coli*. Posteriormente se determinó que la secuencia 5' arriba del gen *pstS-1* codifica para una proteína homóloga a la proteína PstB de *E. coli*. Estos resultados permitieron suponer que la expresión de la proteína de 160 kDa fue probablemente inducida por el promotor del gen *lacZ* y fue el producto de la fusión entre el gen estructural *lacZ* con un frente de lectura abierto generado con la secuencia del gen *pstB* de *M. tuberculosis* que se continuó hasta el gen *pstS-1* y la proteína de 36 kDa (PstS-1) expresada posiblemente fue liberada de la proteína de 160 kDa por la acción de alguna peptidasa de *E. coli* que reconoció el péptido señal de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*, generándose la forma madura de 36 kDa.

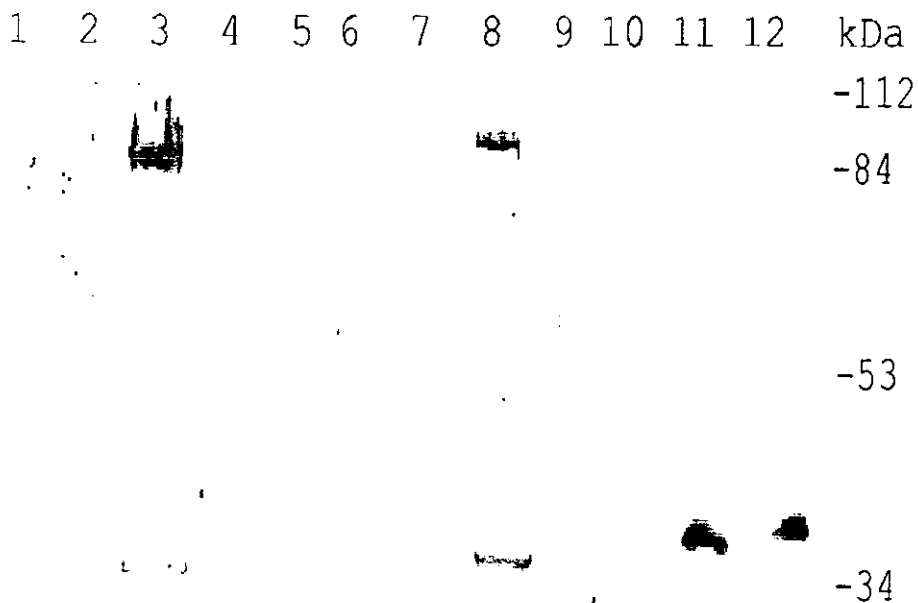


Figura 12.- Inmunodetección de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* con el anticuerpo policlonal anti PstS-1 en el extracto protéico total (11) y filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (12). En el extracto total de la cepa de *E. coli* CE1224 (5 y 10) y transformada con el plásmido pAT97 (1 y 6); pAT96 (2 y 7); pAA26 (3 y 8); pBR322 (4 y 9). Los extractos protéicos de los carriles 1-5 fueron obtenidos de la cepa CE1224 crecida con concentraciones altas de fosfato y los extractos protéicos de los carriles 6-10 fueron obtenidos al crecer la cepa en escasez de fosfato.

4.- Secuencia nucleotídica de las 650 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* de *M. tuberculosis*.

Con el objetivo de analizar los 650 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* de *M. tuberculosis*, el fragmento de DNA conteniendo esta región fue subclonado y secuenciado en el plásmido pAT951 (figura 3). Al compararse estas 650 pb con el gen *lacZ* y los genes del operón *pst* de *E. coli*, se determinó que 350 pb codificaban para la región carboxilo del gen *lacZ* y los restantes 307 codifican para la región carboxilo terminal de una proteína con homología del 60% con el gen *pstB* de *E. coli*. Braibant *et al.*, (1996a), Braibant *et al.*, (1996b), Peirs *et al.*, (19997) identificaron varios genes de *M. tuberculosis* que contenían homología con los genes del operón *pst* de *E. coli* (*pstS*, *pstA* y *pstC*). También reportaron una secuencia nucleotídica que mostró una identidad del 60% con el gen *pstB* de *E. coli*. Al comparar esta última secuencia de *M. tuberculosis* con las 307 pb que previamente habíamos secuenciado de la región arriba del gen *pstS-1*, se observó una identidad del 100 % entre ambas secuencias (dato no mostrado).

5.- Estudios de complementación para analizar si la proteína PhoB de *E. coli* reconoce alguna región promotora del locus *pst* de *M. tuberculosis*.

Con los resultados anteriores se observó que probablemente la proteína de 160 kDa es producto de la fusión traduccional entre los genes *lacZpstBpstS-1* siendo esta activada por el sistema regulador del gen *lacZ* de *E. coli*. Además, los resultados sugirieron que el péptido señal de la proteína PstS-I de *M. tuberculosis* fue reconocido y procesado por alguna peptidasa del sistema de secreción de *E. coli*. Sin embargo, con estos resultados aún no se determinaba, si el sistema regulador de fosfato de *E. coli* reconocía o no algunos promotores de los genes que regulan el metabolismo de fosfato en *M. tuberculosis*. Con el

fin de aclarar este punto se diseñaron los experimentos de complementación, esperando que si el sistema regulador por fosfatos de *E. coli* reconocía los promotores de *M. tuberculosis*, sería posible complementar varias mutantes en los genes del regulón de fosfatos de *E. coli* y mediante esta metodología podrían aislarse eventualmente algunos genes de *M. tuberculosis* involucrados en el metabolismo de fosfato. Para este propósito se construyó una genoteca de *M. tuberculosis* en el cósmido pYUB328 (ver materiales y métodos).

Con el banco de los cósmidos recombinantes de la genoteca pJT4COS construida en este trabajo, se electroporaron diferentes mutantes en el sistema de regulación de fosfato de *E. coli*, en ningún caso se observó complementación o reversión del fenotipo de estas mutantes. Estos resultados sugirieron que el sistema regulador de fosfato (PhoB) de *E. coli* no reconoce los promotores de *M. tuberculosis* (datos no mostrados).

6.- Análisis de las fusiones traduccionales.

Con el objetivo de estudiar el efecto de la concentración de fosfato en la expresión de las proteínas codificadas por los genes del locus *pst* (*pstB*, *pstS-1*, *pstC1* y *pstA2*) de *M. tuberculosis*, se construyeron varias fusiones traduccionales de este locus con el gen estructural *lacZ* de *E. coli*.

Usando como detector homólogo el fragmento de 2.1 kb (figura 14, parte b), que contiene 104 pb del gen *pstB*, el gen *pstS-1* y 858 pb del gen *pstC*, se identificaron en la genoteca pJT4COS de *M. tuberculosis*. 23 cósmidos recombinantes que contenían los genes que conforman el locus *pst* (*pstB*, *pstS-1*, *pstC-1*, *pstA-2*). El patrón de restricción generado con cada uno de estos cósmidos mostró que éstos poseían un fragmento de

aproximadamente 30 a 45 kb. Para realizar las fusiones traduccionales se seleccionó el cósmido recombinante pJT46COS, el cual contenía aproximadamente 40 kb del genoma de *M. tuberculosis*. Los genes que conforman el locus *pst* se localizan en la parte central de este fragmento.

Las diferentes fusiones traduccionales *pst-lacZ* fueron construidas como se describió en materiales y métodos y cada una de éstas fue electroporada independientemente en la cepa de alta eficiencia de transformación de *M. smegmatis* mc²155.

La cepa de *M. smegmatis* mc²155 se utilizó porque ésta es una bacteria del género *Mycobacteria*, es de rápido crecimiento, no es patógena y además no tiene actividad de β -galactosidasa y no contiene el gen *pstS-1* (figura 11, carril 3 y 6) y tampoco expresa su producto protéico, el cual no fue inmunodetectado con el suero policlonal dirigido en contra de la proteína PstS-1 (figura 13, carril 2 y 4). Iniciándose con esta alternativa de expresión, la caracterización molecular del locus *pst* de *M. tuberculosis*, en *M. smegmatis*. Sin embargo, no podemos descartar de antemano las posibles diferencias en la regulación del fosfato entre ambas micobacterias.

La actividad de la fosfatasa alcalina se detectó en todas las *M. smegmatis* transformantes y *M. smegmatis* sin transformar crecidas sin fosfato, pero la actividad disminuyó considerablemente en las bacterias crecidas con 64 mM de KH₂PO₄ (figura 14, parte c). Con respecto a la expresión de la β -galactosidasa, se detectó mayor actividad en las transformantes *M. smegmatis*/pJT19971 y *M. smegmatis*/pJT19974 crecidas sin fosfato (figura 14, parte c). Al eliminar las 918 pb arriba del codón de inicio del gen *pstB* y 402 pb del gen estructural (pJT19972), la actividad de β -galactosidasa se redujó a la mitad

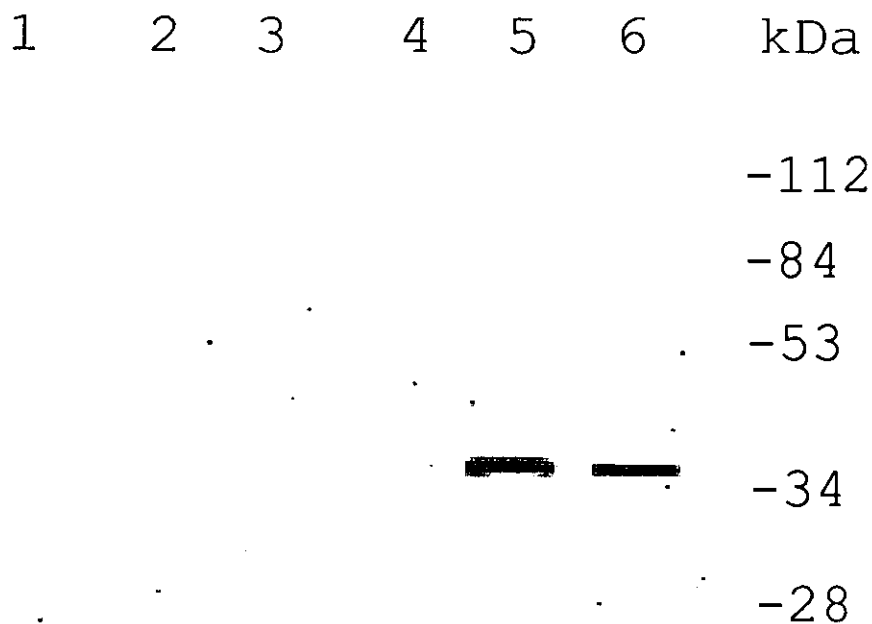


Figura 13.- Inmunodetección de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* con el anticuerpo policlonal anti PstS-1 en el extracto protéico total (5) y filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv (6), en el extracto total de *M. vaccae* (1 y 3) y de *M. smegmatis* (2 y 4). Los extractos protéicos de las carriles 1 y 2 fueron obtenidos al crecer las micobacterias con concentraciones altas de fosfato y los extractos protéicos de los carriles 3 y 4 fueron obtenidos al crecerlas en escasez de fosfato.

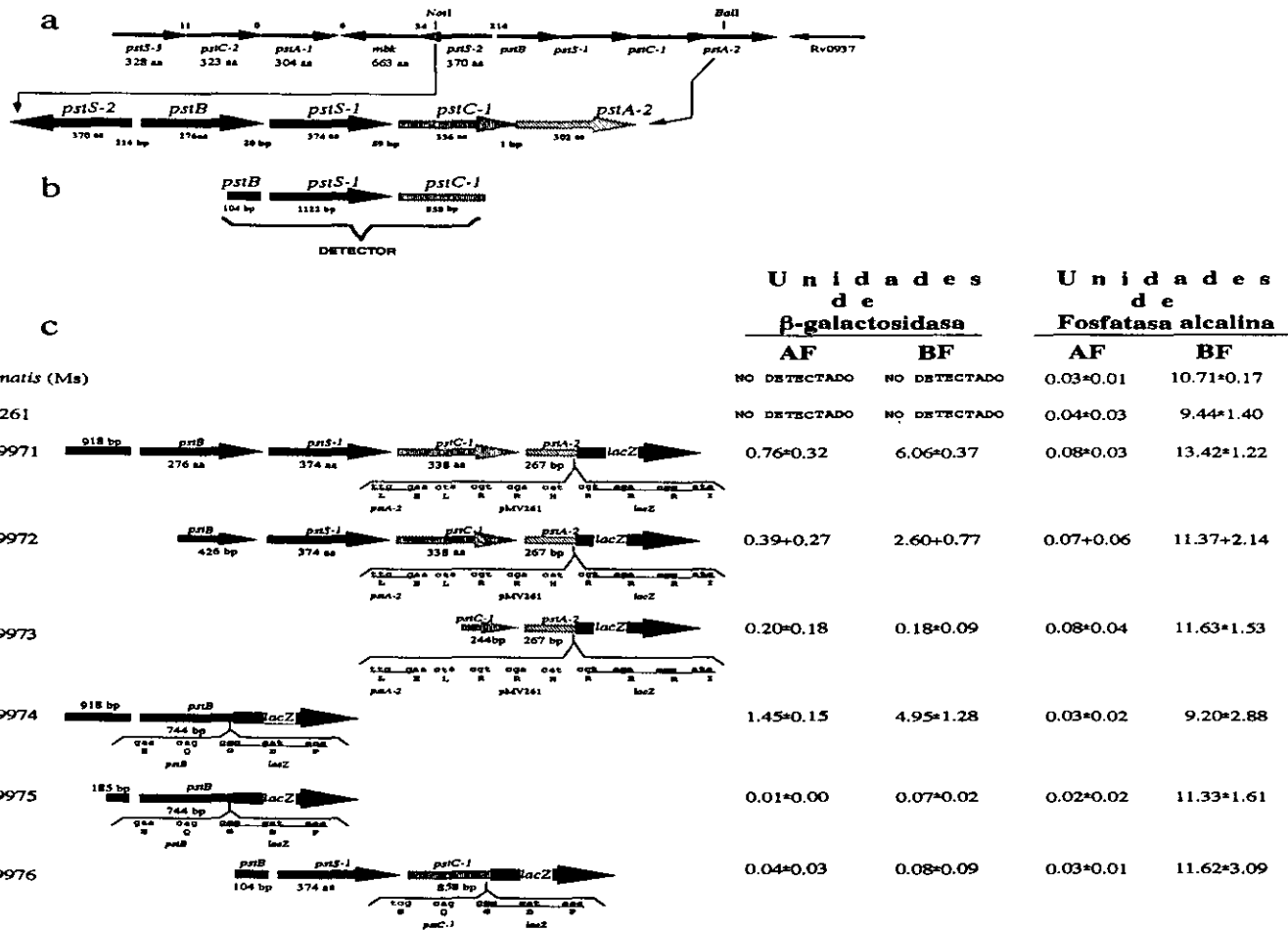


Figura 14.- (a) Esquema de la región cromosomal que contiene el operón *pst* de *M. tuberculosis* H37Rv. La orientación de la transcripción de cada gene está indicado con las flechas. El fragmento de ADN digerido con *Pvu*I utilizado como detector homólogo está indicado en la parte (b). Las fusiones traduccionales de los diferentes fragmentos del operón *pst* de *M. tuberculosis* con el gene estructural *lacZ* de *E. coli*, se muestran en la parte (c). Las actividades de β -galactosidasa y fosfatasa alcalina (FA) fueron cuantificadas en *M. smegmatis* transformada con cada una de las fusiones traduccionales, las cuales fueron crecidas en el medio TG con alta concentración de fosfato (AF) y en limitación de fosfato (LF).

comparada con la actividad obtenida con la transformante pJT19971. Sin embargo, al eliminar las 918 pb arriba del codón de inicio de *pstB*, *pstB*, *pstS-1* y parte de *pstC-1* (pJT19973), la actividad de la β -galactosidasa se redujo considerablemente, también disminuyó drásticamente la actividad de β -galactosidasa al eliminar 733 pb de los 918 pb arriba del codón de inicio del gen *pstB* (pJT19975). La actividad de β -galactosidasa disminuyó considerablemente en las transformantes crecidas con fosfato, exceptuando en la transformante *M. smegmatis*/pJT19974, en la cual se detectó mayor actividad. En la transformante *M. smegmatis*/pJT19976 disminuyó drásticamente la actividad de β -galactosidasa en baja y alta concentración de fosfato, probablemente esta disminución en la actividad fue debido a que la región del gen *pstC-1* de *M. tuberculosis* que se fusionó con el gen *lacZ* se localizó extracitoplasmáticamente, lugar donde la β -galactosidasa no es activa.

Mediante estas fusiones traduccionales, se observó que los genes que codifican para las proteínas PstB, PstS-1 PstC-1 y PstA-2 respectivamente (pJT19971 y pJT19972, son activados por la concentración de fosfato, además se identificó y delimitó indirectamente con estas fusiones traduccionales, una probable región promotora arriba del codón de inicio del gen *pstB* (pJT19974 y pJT19975), y otra probable región promotora entre los 426 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* (pJT19972), la cual también es activada por la concentración de fosfato.

7.- Expresión de la proteína recombinante PstS-1 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*.

La proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* fue inmunodetectada con el anticuerpo monoclonal TB71 anti-PstS-1 en extractos protéicos de las transformantes de *M.*

smegmatis/ pJT19971 y *M. smegmatis*/pJT19972, crecidas con y sin fosfato (figura 15, carril 1-4). Estos resultados también permitieron sugerir que además de la región promotora identificada arriba del codón de inicio del gen *pstB*, existe otra probable región promotora localizada arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*. Resultados similares también fueron observados con la transformante de *M. smegmatis*/pJT19976. El plásmido pJT19976 contiene 104 pb del gen *pstB*, todo el gen *pstS-1* y 858 pb del gen *pstC-1*. La región del gen *pstC-1* fusionada en fase con el gen *lacZ* de *E. coli*, codifica para una región de la proteína PstC-1 probablemente localizada extracitoplasmáticamente, lugar donde la β -galactosidasa no es activa. Para predecir la orientación de esta región en la membrana citoplasmática se utilizó el programa TMPred (disponible en <http://www.ch.embnet.org/software/TMPred>). No obstante que con esta construcción no se detectó actividad de la β -galactosidasa en condiciones de crecimiento con y sin fosfato, si fue posible inmunodetectar la proteína recombinante PstS-1 (resultados no mostrados).

8.- Características de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis*.

Observamos que esta proteína recombinante es secretada al medio de cultivo y se une a ConA (figura 16, parte b), al igual que la proteína nativa de *M. tuberculosis* como lo observó Espitia *et al.*, (1989b). Además en geles de doble dimensión la proteína nativa como la recombinante, presentaron tres puntos isoeléctricos (figura 16, parte a). Finalmente observamos la misma intensidad de reacción de ambas proteínas con sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar (resultados no mostrados).

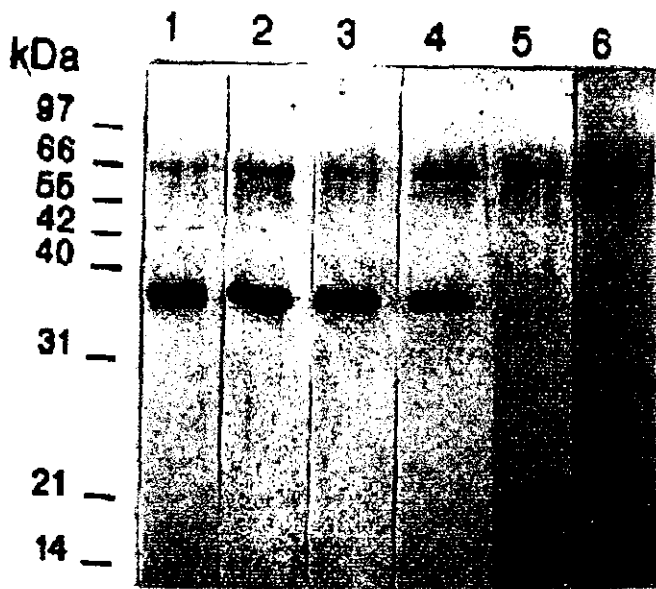


Figura 15.- Inmunodetección de la proteína PstS-1 con el anticuerpo policlonal anti PstS-1 en el extracto protéico total de *M. smegmatis* (6) y *M. smegmatis* transformada con el plásmido pJT19971 (1 y 2); pJT19972 (3 y 4); pJT19973 (5). Los extractos protéicos de las carriles 1 y 3 fueron obtenidos al crecer *M. smegmatis* con concentraciones altas de fosfato y los extractos protéicos de los carriles 2, 4, 5 y 6 fueron obtenidos al crecerla en escasez de fosfato.

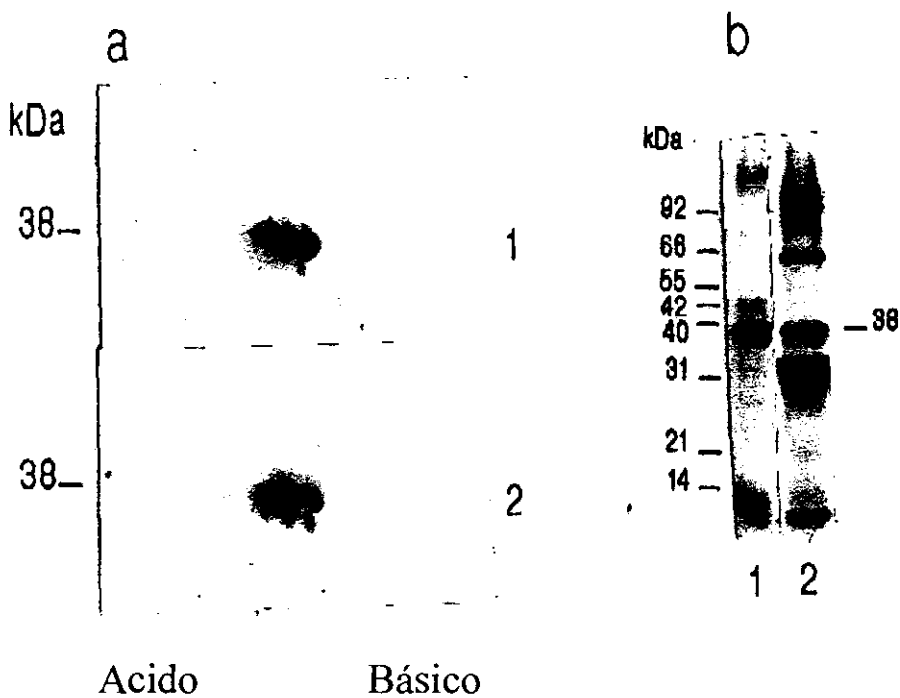


Figura 16.- En la parte (a) se muestra la inmunodetección de la proteína PstS-1 con el anticuerpo policlonal anti PstS-1 en una electroforesis de doble dimensión de la proteína nativa de *M. tuberculosis* H37Rv (1) y de la proteína recombinante PstS-1 de *M. tuberculosis* expresada en *M. smegmatis* (2). En la parte (b) se muestra la detección por inmuno-blot de la unión de la concanavalina A con la proteína PstS-1 de una fracción enriquecida del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* (carril 1) y de una fracción enriquecida del filtrado de cultivo de *M. smegmatis* trasformada con el plásmido pJT19971.

VIII.- DISCUSION.

En el presente trabajo se estudió la expresión de los genes que codifican para las proteínas que probablemente están involucradas en el transporte de fosfatos de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*, en condiciones de crecimiento con fosfato y/o deprivación del mismo.

El estudio del metabolismo de fosfatos en *E. coli* y otras bacterias ha sido abordado principalmente mediante la utilización de mutantes en los genes de interés. La observación de que mutantes de *E. coli* en los genes que codifican para el activador transcripcional PhoB y la fosfatasa alcalina, fueron complementadas con los genes *phoB* y *phoA* de *Pseudomona aeruginosa* (esta bacteria posee una proporción de guanina y citocinas en su genoma similar a la de *M. tuberculosis*), nos dió la pauta para utilizar esta estrategia con *M. tuberculosis* a fin de identificar los genes de la bacteria involucrados en el metabolismo de fosfato, (Filloux *et al* 1988; Anba *et al.*, 1990; Cole *et al.*, 1998; Stover *et al.*, 2000). Sin embargo, en ningún caso fue posible complementar las mutantes de *E. coli* en los genes *phoE*, *phoA*, *phoB-phoR* *pstSCAB-phoU* con el banco genómico de *M. tuberculosis* (pJT4COS). Los resultados sugieren que la RNA polimerasa y el activador transcripcional PhoB de *E. coli* no reconoce los promotores de los genes involucrados en la asimilación de fosfato de *M. tuberculosis*. Se ha observado que algunos genes de *M. tuberculosis* pueden complementar mutantes de *E. coli* solo a través de fusiones transcripcionales entre la regiones promotora de *E. coli* y el gen estructural de *M. tuberculosis* (Garbe *et al.*, 1990; Andersen y Hansen *et al.*, 1993). Respecto a la expresión de la proteína PstS-1 (36 kDa) de *M. tuberculosis* en *E. coli* es posible que esta proteína haya sido el producto de una

fusión traduccional con *lacZ* y que alguna peptidasa de esta bacteria haya reconocido el péptido señal de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis*.

El uso de bacterias no patógenas que sustituyan a las patógenas en el estudio de regulación y expresión de genes es una herramienta muy importante y de gran significancia, especialmente cuando se trata de patógenos de crecimiento lento como *M. tuberculosis* (tiempo de generación aproximadamente de 20 horas), el cual además requiere para su manipulación de un laboratorio de alta seguridad (nivel 3). Dentro del género *Mycobacterium* existen miembros no patógenos de crecimiento rápido como *M. vaccae* y *M. smegmatis* (tiempo de generación 2 horas), que han demostrado ser una alternativa para la expresión de genes de *M. tuberculosis*, así como en la caracterización molecular de algunos sistemas genéticos (Garbe *et al.*, 1993; Harth *et al.*, 1997). En el presente trabajo se utilizó a *M. smegmatis* como bacteria modelo para estudiar los genes que participan en la captación y transporte de fosfato en *M. tuberculosis*. A diferencia de *E. coli*, la cepa de *M. smegmatis* mc²155 de alta frecuencia de transformación nos permitió caracterizar los genes del locus *pst* de *M. tuberculosis* (*pstB*, *pstS-1*, *pstC-1*, *pstA-2*). Se eligió *M. smegmatis* mc²155 debido a que esta bacteria no tiene actividad de β-galactosidasa y posiblemente no contiene los genes análogos al locus *pst* de *M. tuberculosis*, además se observó en este trabajo que la expresión de la fosfatasa alcalina en *M. smegmatis* es activada o reprimida por la concentración de fosfato en el medio de cultivo; resultados similares fueron reportados previamente por David, (1977). En *M. tuberculosis* Casal y Linares, (1984), detectaron actividad de esta enzima, sin embargo no se ha encontrado alguna secuencia análoga al gen *phoA* de *E. coli* en el genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1988).

Con los resultado de las fusiones traduccionales se observó un incremento en la expresión de la actividad de la β -galactosidasa en escasez de fosfato en *M. smegmatis* transformada con el plásmido, pJT19971, pJT19972 y pJT19974. Con las construcciones pJT19974 y pJT19975 se delimitó una probable región promotora localizada hacia arriba del codón de inicio del gen *pstB*. También se identificó otra probable región promotora arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*, con la construcción pJT19972, en la cual se eliminaron 918 b arriba del codón de inicio del gen *pstB* y 402 b del gen estructural. En contraste, la actividad de β -galactosidasa disminuyó considerablemente cuando se eliminaron ambas regiones promotoras arriba de los genes *pstB* y *pstS-1*, respectivamente (pJT19975 y pJT19973). El análisis de la estructura secundaria de las proteína PstC y PstA de *E. coli* así como de las proteínas PstC-1 y PstA-2 de *M. tuberculosis* revela que posiblemente tienen de 5 a 6 hélices transmembranales. En la transformante *M. smegmatis*/pJT19976 no se observó un incremento en la expresión de la β -galactosidasa en escasez y alta concentración de fosfato, una explicación probable a este resultado es que la parte del *pstC-1* que se fusionó con el gen *lacZ* codifica para una región de la proteína PstC-1 queda expuesta hipotéticamente hacia el periplasma, lugar donde la β -galactosidasa no es activa. La detección de la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* en los extractos protéicos y filtrados de cultivo de la transformante *M. smegmatis*/pJT1996 es debida probablemente a la existencia de alguna región promotora entre las 426 b antes del codón de inicio del gen *pstS-1* y su activación depende de un sistema regulador de fosfatos de *M. smegmatis*.

El análisis de la actividad de la β -galactosidasa de las fusiones traduccionales de los genes que integran el locus *pst* de *M. tuberculosis* con el gen estructural *lacZ* de *E. coli*, en

M. smegmatis transformada con cada una de éstas y crecida en un medio en escasez de fosfato y otro con alta concentración de fosfato, permitió sugerir que la expresión de las proteínas codificadas por los genes *pstB*, *pstS-1*, *pstC-1* y *pstA-2*, es regulada por la concentración de fosfato, incrementando su expresión en escasez de fosfato y disminuyendo su expresión con alto fosfato. Además, con estas construcciones se identificó indirectamente una región promotora arriba del codón de inicio del gen *pstB* y otra entre las 426 pb arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*. Ambas regiones promotoras son activadas por la concentración de fosfato en el medio de cultivo.

Dale y Patky, (1990) previamente reportaron la presencia de una región consenso (caja de fosfatos) arriba del codón de inicio del gen *pstS-1* de *M. tuberculosis* similar a la caja de fosfatos de *E. coli*. Analizando la secuencia de la probable región promotora localizada arriba del codón de inicio del gen *pstB*, se identificó también una probable caja de fosfatos. La identificación de la región -10 del gen *pstB* se hizo por comparación de la secuencia nucleotídica arriba del codón de inicio de este gen con las regiones -10 que previamente describieron Bashyam *et al.*, (1996) (tabla 2). Los genes del locus *pst* de *M. tuberculosis* codifican para proteínas homólogas a las del operón *pst* de *E. coli*. Una de las diferencias notables con el operón *pst* de *E. coli*, es el orden de los genes, además de la ausencia del gen *phoU* en el locus *pst* de *M. tuberculosis*. Se ha demostrado que la proteína PhoU regula negativamente el regulón de fosfatos en *E. coli*. Aún se desconoce como se lleva a cabo esta regulación negativa, no se ha establecido si se debe a la interacción molecular de la proteína PhoU con la proteína activadora transcripcional PhoB o con la proteína sensora PhoR. Sin embargo, en el genoma de *M. tuberculosis* se han identificado dos proteínas, PhoY1 [Rv3301c] y PhoY2 [Rv0821c] con homología a la proteína PhoU.

Gene	Caja de fosfatos dos	Distancia número de bases	Caja de fosfatos uno	Distancia número de bases	Región -10	Distancia número de bases	Shine Dalgaro	Distancia número de bases	Codón de inicio de la traducción
<i>Ec phoA</i>			<u>CTGTCATAAAGTTGTCAC</u>	10	TATAGT	33	GGAG	8 b	GTG
<i>Ec phoB</i>			<u>TITTCATAAATCTGTCAT</u>	10	CATAAT	37	AGG	7 b	ATG
<i>Ec phoZ</i>			<u>CTGTAATATATCTTTAAC</u>	10	TAAAAA	55	AGGA	6 b	ATG
<i>Ec pstS</i>	<u>CTGTCATAAAACTGTCAT</u>	4	<u>CITACATATAACTGTCAC</u>	10	TATTTT	40	AGGAG	5 b	ATG
<i>Mt pstS-1</i>			<u>CTGTCGGGGGAC</u> <u>GTCA</u>	15	<u>GAAATT</u>	10	GAAAGG	5 pb	GTG
<i>Mt pstB</i>			<u>CTCTCGAGGGGGTCGTGG</u>	100	<u>GAAATC</u>	64	AAGG	21 pb	ATG

Tabla 2. Comparación de las probables cajas de fosfatos de los genes *pstB* y *pstS-1* de *M. tuberculosis* (Mt) con las cajas de fosfato de los genes involucrados en el metabolismo de fosfato de *E. coli* (Ec).

Igualmente, se han identificado otras proteínas reguladoras, PhoR/PhoP [Rv0758/Rv0757] con homología a proteínas involucradas en la regulación de fosfato de *B. subtilis* (Cole *et al.*, 1998).

Otras proteínas homólogas a la PstS-1, PstS-2 y PstS-3 han sido descritas en *M. tuberculosis* (Lefevre *et al.*, 1997). Los genes que codifican para estas proteínas probablemente son transcritos en operones y se localizan arriba del locus *pst* caracterizado en este trabajo. El gen que codifica para la proteína PstS-3 es posiblemente el primer gen del transcrito, seguido por los genes *pstC-2* y *pstA-1*. El gen que codifica para la proteína PstS-2 es probablemente también el primer gen del transcrito seguido por el gen que codifica para una proteína cinasa de serina-treonina (Mbk o PknD). La duplicación de los genes PstS también ha sido reportada en *M. intracellulare* y en *M. leprae* (Thangaraj *et al.*, 1996; Cole *et al.*, 2001).

La caracterización molecular del gen que codifica para la proteína PstS-1 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* nos permitió reafirmar el uso potencial de esta bacteria en el estudio de algunos genes involucrados en el metabolismo del fosfato. Por otro lado, observamos una reacción con los sueros de los pacientes con tuberculosis pulmonar similar entre la proteína nativa y la proteína recombinante. Además, la proteína recombinante fue glicosilada y secretada en el medio de cultivo, confirmando los resultados previamente observados con la proteína nativa por Espitia *et al.*, (1989). El análisis del punto isoeléctrico entre ambas proteínas fue similar.

El estudio de la regulación génica para el metabolismo de fosfatos en diferentes bacterias, ha permitido comparar diversos sistemas génicos y determinar variaciones entre éstos. Por ejemplo, en el grupo de las enterobacterias como *Salmonella typhi* y *Salmonella typhimurium* no se ha detectado expresión de la fosfatasa alcalina cuando éstas son

crecidas en condiciones limitantes de fosfato (Schlesinger y Olsen 1968). Aparentemente el género *Salmonella* no contiene el gen *phoA*. No se ha encontrado en el genoma de *S. typhi* alguna secuencia homóloga al gen *phoA* de *E. coli*, pero sí contiene los otros genes del regulón como *phoBR*, *phoE*, *pstSCAB-phoU* (Jiang et al., 1995). En *Shigella flexneri* se ha demostrado que la leucina en la posición 172 de la proteína transcripcional PhoB (arginina en *E. coli*), es la responsable de la ausencia de actividad de la fosfatasa alcalina y la ausencia de expresión de la porina PhoE; no obstante ambos genes han sido identificados en esta bacteria (Scholten et al., 1994). En la bacteria Gram-positiva *Bacillus subtilis*, a diferencia de *E. coli*, el sistema Pst solo participa en el transporte de fosfato pero no en la regulación génica negativa (Sun et al., 1996; Qi et al., 1997). En *Pseudomonas aeruginosa* recientemente se caracterizó el operón *pst* y no se identificó el gen homólogo *pstS* (Nikata et al., 1996)

Recientemente, Peirs et al., (2000) observaron en dos cepas de *M. bovis* virulentas y en cuatro *M. bovis* BGC, una adenina adicional en la posición 829 del frente de lectura abierto del gen que codifica para la proteína, MbK (o PkND), ocasionando esta inserción la pérdida del frente de lectura abierto, resultando en la codificación de una proteína truncada de 30 KDa en lugar de una de 70 kDa. El gen que codifica para esta proteína es cotranscrito con el gen *pstS-2* en *M. tuberculosis*. Por otra parte, Braibant y Content, (2001) observaron que contrario a lo reportado en otros microorganismos, en *M. bovis* BCG no se identificó alguna fosfatasa que fuera regulada por la concentración de fosfato en el medio de cultivo. En *M. leprae*, se han encontrado cuatro probables genes *pstS*, los cuales se localizan en diferentes posiciones en el genoma con respecto a lo observado en *M. tuberculosis*. La secuenciación del genoma *M. leprae* ha sido concluida y se ha observado que la mayoría de los genes de esta bacteria son probablemente no funcionales

(pseudogenes). Dentro de este grupos de genes se encuentran los genes análogos al probable operón *pstS-3/pstC-2/pstA-1* y al probable operón *pstS-2/mbk* de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 2001).

El estudio de la expresión y regulación de los genes que participan en el metabolismo de fosfatos de *M. tuberculosis* es importante desde el punto de vista de la biología de la micobacteria así como en la participación de sus productos en la relación huésped-bacteria.

IX.- CONCLUSIONES.

- 1).- El sistema regulador de fosfato (PhoB) de *E. coli* no reconoce algún promotor del locus *pst* de *M. tuberculosis*.
- 2).- *M. smegmatis* y *M. vaccae* son potencialmente útiles para estudiar la regulación genética por fosfato en las micobacterias y posiblemente también permitirán caracterizar la expresión y regulación de los genes de *M. tuberculosis* regulados por fosfatos.
- 3).- El análisis de la actividad de la β -galactosidasa de las fusiones traduccionales de los genes que integran el locus *pst* de *M. tuberculosis* con el gen estructural *lacZ* de *E. coli*, en *M. smegmatis* transformada con cada una de éstas y crecida en un medio en escasez de fosfato y otro con alta concentración de fosfato, permitió sugerir que la expresión de las proteínas codificadas por los genes *pstB*, *pstS-1*, *pstC-1* y *pstA-2*, es regulada por la concentración de fosfato, incrementando su expresión en escasez de fosfato y disminuyendo su expresión con alto fosfato. Además, con estas construcciones se identificó indirectamente una región promotora arriba del codón de inicio del gen *pstB* y otra entre las 426 b arriba del codón de inicio del gen *pstS-1*. Ambas regiones promotoras son activadas por la concentración de fosfato en el medio de cultivo.

X.- PERSPECTIVAS.

El estudio de los mecanismos moleculares que utiliza *Mycobacterium tuberculosis* para metabolizar el fosfato tiene dos perspectivas: la primera es estudiar la regulación molecular que lleva a cabo esta bacteria para asimilar el fosfato; la segunda es dilucidar los mecanismos mediante los cuales, *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir en condiciones limitantes de fosfato y establecer la posible participación e interacción de las proteínas involucradas en la relación huésped-bacteria.

Debido a su lento crecimiento y al alto nivel de bioseguridad que se requiere para manipular al bacilo de la *tuberculosis*, en el presente trabajo se evaluó el uso de micobacterias no patógenas y de rápido crecimiento como *M. smegmatis* para estudiar la expresión de genes de *M. tuberculosis*. Los resultados obtenidos hasta ahora muestran que *M. smegmatis* podría ser de gran utilidad para estudiar la regulación por fosfatos en las micobacterias, así como en la caracterización de la expresión y la regulación de algunos genes de *M. tuberculosis*.

La caracterización molecular del locus *pst* de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* a través de la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa, nos permitió establecer las condiciones de escasez y de alta concentración de fosfato en el medio de cultivo para iniciar el estudio de la regulación de fosfato por las micobacterias.

A través de la mutagenesis sitio dirigida de las dos probables regiones promotoras identificadas en el locus *pst* de *M. tuberculosis* y mediante la generación de mutantes de *M. smegmatis* y de la complementación de éstas con un banco genómico de *M. smegmatis* o *M. tuberculosis*, se podrá identificar, aislar y caracterizar los genes que codifican para las

proteínas involucradas en la regulación de fosfatos. Además la generación de fusiones transcripcionales o traduccionales de los otros genes *pstS* identificados en *M. tuberculosis* con un gen reportero, permitiran definir su participación en el metabolismo de fosfato.

La secuenciación del genoma de *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis BCG*, *M. leprae* y *M. smegmatis*; las micro-agrupaciones genómicas en portaobjetos (microarrays); el análisis global de la expresión de proteínas en geles desnaturalizantes de poliacrilamida a través del uso del sistema de doble dimensión (proteomics); la utilización de genes reporteros fluorescentes y los ensayos de invasión con diferentes líneas celulares abren la posibilidad de comprender de una forma integral las diferencias entre las micobacterias.

XI.- BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Ausbel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, Struhl K. Current protocols in molecular biology. USA. *Greene & Wiley*. 1987. Volumen 1.
- 2.- Agrawal DK, Wanner BL. A *phoA* structural gene mutation that conditionally affects formation of the enzyme bacterial alkaline phosphatase. *J Bacteriol* 1990; 172: 3180-3190.
- 3.- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Bacteriol* 1985; 184: 241-250.
- 4.- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein. PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol* 1990; 172: 6300-6307.
- 5.- Anba J, Bidaud M, Vasil ML, Lazdunski A. Nucleotide sequence of the *Pseudomonas aeruginosa phoB* gene, the regulatory gene for the phosphate regulon. *J Bacteriol* 1990; 172(8):4685-9.
- 6.- Andersen AB, Worsaae A, Chaparas SD. Isolation and characterization of recombinant lambda gt11 bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. *Infect Immun* 1988; 56: 1344-1351.
- 7.- Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989; 57: 2481-2488.

- 8.- Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 477-480.
- 9.- Andersen AB, Hansen EB. Cloning of the *lysA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene* 1993; 124(1):105-9.
- 10.- Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol* 2001; 22:160-8.
- 11.- Antelmann H, Scharf C, Hecker M. Phosphate starvation-inducible proteins of *Bacillus subtilis*: proteomics and transcriptional analysis. *J Bacteriol* 2000; 182: 4478-90.
- 12.- Aoyama T, Oka A. A common mechanism of transcriptional activation by the three positive regulators, VirG, PhoB, and OmpR. *FEBS* 1990; 263: 1-4.
- 13.- 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: 4847-4853.
- 14.- Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom B Ed. Tuberculosis: pathogenesis, protection and control. Washington, DC: ASM press 1994; 531-557.
- 15.- Bolivar F, Rodriguez RL, Greene PJ, Betlach MC, Heyneker HL, Boyer HW. Construction and characterization of new cloning vehicles. II. A multipurpose cloning system. *Gene* 1977; 2(2):95-113.
- 16.- Braibant M, Lefèvre P, de Wit L, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Andersen AB, Content J. A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding protein of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* 1996a; 176: 171-176.

- 17.- Braibant M, Lefèvre P, de Wit L, Ooms J, Peirs P, Huygen K, Wattiez R, Content J. Identification of a second *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding protein of an ABC phosphate transporter. *FEBS Letters* 1996b; 394: 206-212.
- 18.- Braibant M, Content J. The cell surface associated phosphatase activity of *Mycobacterium bovis* BCG is not regulated by environmental inorganic phosphate. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 195: 121-6.
- 19.- Brickman E, Beckwith, J. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing phages. *J Mol Biol* 1975; 96: 307-316.
- 20.- Casal RM, Linares SMJ. Preliminary investigation of *Mycobacterium tuberculosis* biovars. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1015-1016.
- 21.- Chan FY, Torriani A. PstB protein of the phosphate-specific transport system of *Escherichia coli* is an ATPase. *J Bacteriol* 1996; 178: 3974-7.
- 22.- Chang Z., Choudhary A, Lathigra R, Quiococho F. The immunodominant 38KDa lipoprotein antigen of *M. tuberculosis* is a phosphate-binding protein. *J Biol Chem* 1994; 269: 1956-1958.
- 23.- 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 S, Squares R, Sulston JE, Taylor K, Whitehead S, Barrell BG. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.

- 24.- Cole ST, Eiglmeier K, Parkhill J, James KD, Thomson NR, Wheeler PR, Honore N, Garnier T, Churcher C, Harris D, Mungall K, Basham D, Brown D, Chillingworth T, Connor R, Davies RM, Devlin K, Duthoy S, Feltwell T, Fraser A, Hamlin N, Holroyd S, Hornsby T, Jagels K, Lacroix C, Maclean J, Moule S, Murphy L, Oliver K, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, Rutter S, Seeger K, Simon S, Simmonds M, Skelton J, Squares R, Squares S, Stevens K, Taylor K, Whitehead S, Woodward JR, Barrell BG. Massive gene decay in the leprosy bacillus. *Nature* 2001; 409: 1007-11.
- 25.- Cox GB, Webb D, Godovac-Zimmermann J, Rosenberg H. Arg-220 of the PstA protein is required for phosphate transport through the phosphate-specific transport system in *Escherichia coli* but not for alkaline phosphatase repression. *J Bacteriol* 1988; 170: 2283-6.
- 26.- Cox GB, Webb D, Rosenberg H. Specific amino acid residues in both the PstB and PstC protein are required for phosphate transport by the *E. coli* Pst system. *J Bacteriol* 1989; 171: 1531-1534.
- 27.- Daigle F, Fairbrother JM, Harel J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* 1995; 63: 4924-4927.
- 28.- Dale WJ, Patki A. Mycobacterial gene expression and regulation. In McFadden J, De. *Molecular Biology of mycobacteria* London: Surrey University press. 1990:173-198.
- 29.- Daniel TM, Ellner JJ, Todd LS *et al.* Immunobiology and species distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5. *Infect Immun* 1979; 24: 77-82.
- 30.- David HL. Alkaline phosphatases from *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol* 1977; 101: 99-102.

- 31.- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 1997; 278: 680-6.
- 32.- de Saizieu A, Certa U, Warrington J, Gray C, Keck W, Mous J. Bacterial transcript imaging by hybridization of total RNA to oligonucleotide arrays. *Nat Biotechnol* 1998; 16: 45-8.
- 33.- Dye C, Scheele S, Dolin P, Pathania V, Raviglione MC. Global burden of tuberculosis, estimated incidence, prevalence, and mortality by Country: for the WHO global surveillance and monitoring project. *JAMA* 1999; 282: 677-686.
- 34.- Espitia C, Cervera I, Gonzalez R. A 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* 1989a; 77: 373-377.
- 35.- Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1989b; 77: 378-383.
- 36.- Espitia C, Elinos M, Hernandez-Pando R, Mancilla R. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun* 1992; 60 :2998-3001.
- 37.- Farmer III JJ. *Enterobacteriaceae*: introduction and identification. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH ed. Manual of Clinical Microbiology sixth edition. Washington, D.C. ASM press 1995; 438-49.
- 38.- Filloux A, Bally M, Soscia C, Murgier M, Lazdunski A. Phosphate regulation in *Pseudomonas aeruginosa*: cloning of the alkaline phosphatase gene and identification of *phoB*- and *phoR*-like genes. *Mol Gen Genet* 1988; 212 :510-3.

- 39.- Garbe T, Jones C, Charles I, Dougan G, Young D. Cloning and characterization of the *aroA* gene from *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol* 1990; 172(12):6774-82.
- 40.- Garbe T, Harris D, Vordemeier V, Lathigra M, Ivanyi J, Young D. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: Immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect Immun* 1993; 61:260-267.
- 41.- Guan C, Wanner B, Inouye H. Analysis of regulation of *phoB* expression using a *phoB-cat* fusion. *J Bacteriol* 1983; 156: 710-717.
- 42.- Harboe M, Wiker HG. The 38kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis* 1992; 166: 874-884.
- 43.- Harth G, Lee BL, Horwitz MA. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing nonpathogenic mycobacteria of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular protein considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect Immun* 1997; 65: 2321-2328.
- 44.- Hatfull GF, Jacobs WR Ed. Molecular genetic of mycobacteria. Washington, DC: ASM press 2000.
- 45.- Janssen R, Verjans GM, Kusters JG, Tommassen J. Induction of the *phoE* promoter upon invasion of *Salmonella typhimurium* into eukaryotic cells. *Microbial Pathogen* 1995; 19: 193-201.
- 46.- Jiang W, Metcalf WW, Lee KS, Wanner BL. Molecular cloning, mapping, and regulation of Pho regulon genes for phosphonate breakdown by the phosphonate pathway of *Salmonella typhimurium* LT2. *J Bacteriol* 1995; 177: 6411-21.
- 47.- Kimura S, Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A. Regulation of the phosphate regulon of *E. coli*: characterization of the promoter of the *pstS* gene. *Mol. Gen. Genet* 1989; 215: 374-380.

- 48.- Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-685.
- 49.- Lee Y, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Overproduction of acetate kinase activates the phosphate regulon in the absence of the *phoR* and *phoM* functions in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1990; 172: 2245-2249.
- 50.- Lefèvre P, Braibant M, de Wit L, Kalai M, Roeper D, Grotzinger J, Delville JP, Peirs P, Ooms J, Huygen K, Content J. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 1997; 179: 2900-2906.
- 51.- Lipshutz RJ, Morris D, Chee M, Hubbell E, Kozal MJ, Shah N, Shen N, Yang R, Fodor SP. Using oligonucleotide probe arrays to access genetic diversity. *Biotechniques* 1995; 19: 442-7.
- 52.- Lyons TL, Gasch AP, Gaither LA, Botstein D, Brown PO, Eide DJ. (2000) Genome-wide characterization of the Zap1p zinc-responsive regulon in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 7957-7962.
- 53.- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the *phoB* gene, the positive regulatory gene for the phosphate regulon of *Escherichia coli* K-12. *J. Mol. Biol* 1986; 190: 37-44.
- 54.- Makino K, Shinagawa H, Amemura M, Kawamoto T, Yamada M, Nakata A. Signal transduction in the phosphate regulon of *E. coli* involves phosphotransfer between PhoR and PhoB proteins. *J Mol Biol* 1989; 210: 551-559.

- 55.- Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H. Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 1993; 7: 149-160.
- 56.- McCleary W, Stock J, Ninfa J. Is acetyl phosphate a global signal in *E. coli*?. *J Bacteriol* 1993; 175: 2793-2798.
- 57.- McCleary WR. The activation of PhoB by acetyl phosphate. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1155-1163.
- 58.- Miller JH. Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1972.
- 59.- Muda M, Rao NN, Torriani A. Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *J Bacteriol* 1992; 174: 8057-8064.
- 60.- Nakata A, Amemura M, Shinagawa H. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1984; 159: 979-985.
- 61.- Nikata T, Sakai Y, Shibata K, Kato J, Kuroda A, Ohtake H. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 1996; 250: 692-698.
- 62.- Nolte FS, Metchock B. *Mycobacterium*. In: Murray PR, Baron EJ, Pfaller MA, Tenover FC, Tenover RH ed. Manual of Clinical Microbiology sixth edition. Washington, D.C. ASM press 1995. 400-37.
- 63.- O'Farrell PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-4021.

- 64.- Peirs P, Parmentier B, De Wit L, Content J. The *Mycobacterium bovis* homologous protein of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase Mbk (PknD) is truncated. *FEMS Microbiol Lett* 2000 Jul 15; 188: 135-9.
- 65.- Qi Y, Kobayashi Y, Hulett FM. The *pst* operon of *Bacillus subtilis* has a phosphate-regulated promoter and is involved in phosphate transport but not in regulation of the *pho* regulon. *J Bacteriol* 1997; 179: 2534-9.
- 66.- Rao NN, Torriani A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1083-1090.
- 67.- Rosenberg H, Gerdes RG, Chegwidden K. Two systems for the uptake of phosphate in *E. coli*. *J Bacteriol* 1977; 131:505-511.
- 68.- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. USA. *CSH Lab Press*. 1989.
- 69.- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-5467.
- 70.- Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* 1995; 270: 467-70.
- 71.- Schena M. Genome analysis with gene expression microarrays. *Bioessays* 1996; 18: 427-31
- 72.- Schlesinger M, Olsen R. Expression and localization of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesized in *Salmonella typhimurium* cytoplasm. *J Bacteriol* 1968; 96: 1601-1607.
- 73.- Scholten M, Tommassen J. Topology of the PhoR protein of *Escherichia coli* and functional analysis of internal deletion mutants. *Mol Microbiol* 1993; 8: 269-75.

- 74.- Scholten M., Janssen R, Bogaarts C, Van Strien J, Tommassen J. The *pho* regulon of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1994; 34: 247-254.
- 75.- Shaphira SK, Chou J, Richaud FV, Casadaban MJ. New versatile plasmid vector for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 1983; 25: 71-82.
- 76.- Silva CL, Bonato VL, Lima KM, Coelho-Castelo AA, Faccioli LH, Sartori A, De Souza AO, Leao SC. Cytotoxic T cells and mycobacteria. *FEMS Microbiol Lett* 2001; 197: 11-8.
- 77.- Sinai AP, Bavoil PM. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1993; 10: 1125-1137.
- 78.- Singh M, Andersen AB, McCarthy JE, Rohde M, Schutte H, Sanders E, Timmis KN. The *Mycobacterium tuberculosis* 38-kDa antigen: overproduction in *Escherichia coli*, purification and characterization. *Gene* 1992; 117: 53-60.
- 79.- Steed PM, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in phosphate regulon. *J Bacteriol* 1993; 175: 6797-6809.
- 80.- Stock JB, Ninfa AJ, Stock AM. Protein phosphorylation of adaptive responses in bacteria. *Microbiological Reviews* 1989; 53: 450-490.
- 81.- Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR, *et al.* New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991; 351: 456-460.
- 82.- Stover CK, Pham XQ, Erwin AL, Mizoguchi SD, Warrenner P, Hickey MJ, Brinkman FS, Hufnagle WO, Kowalik DJ, Lagrou M, Garber RL, Goltry L, Tolentino E, Westbrook-Wadman S, Yuan Y, Brody LL, Coulter SN, Folger KR, Kas A, Larbig K, Lim R, Smith K,

- Spencer D, Wong GK, Wu Z, Paulsen IT. Complete genome sequence of *Pseudomonas aeruginosa* PA01, an opportunistic pathogen. *Nature* 2000; 406(6799):959-64.
- 83.- Sun G, Birkey SM, Hulett FM. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1996; 19: 941-948.
- 84.- Surin BP, Rosenberg H, Cox GB. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. *J Bacteriol* 1985; 161: 189-198.
- 85.- Thangaraj HS, Bull TJ, De Smet KA, Hill MK, Rouse DA, Moreno C, Ivanyi J. Duplication of genes encoding the immunodominant 38 kDa antigen in *Mycobacterium intracellulare*. *FEMS Microbiol* 1996; 144: 235-240.
- 86.- Tommassen J, Lugtenberg B. Outer membrane protein e of *Escherichia coli* K-12 is co-regulated with alkaline phosphatase. *J. Bacteriol* 1980; 143: 151-157.
- 87.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1979; 24:145-149.
- 88.- VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4344-66.
- 89.- van Soolingen D, de Haas PE, Hermans PW, van Embden JD. DNA fingerprinting of *Mycobacterium tuberculosis*. *Methods Enzymol.* 1994; 235: 196-205.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA.

- 90.- Vordermeier HM, Coombes AG, Jenkins P, McGee JP, O'Hagan DT, Davis SS, Singh M. Synthetic delivery system for tuberculosis vaccines: immunological evaluation of the *M. tuberculosis* 38 kDa protein entrapped in biodegradable PLG microparticles. *Vaccine* 1995; 13: 1576-82.
- 91.- Wanner BL, McSharry R. Phosphate-controlled gene expression in *Escherichia coli* K-12 using Mud1-directed *lacZ* fusions. *J Mol Biol* 1982 ;158: 347-363.
- 92.- Wanner BL, Chang BD. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1987a; 169: 5569-74.
- 93.- Wanner BL. Control of *phoR*-dependent bacterial alkaline phosphatase clonal variation by *phoM* region. *J Bacteriol* 1987b;169: 900-903.
- 94.- Wanner BL, Wilmes MR, Hunter E. Molecular cloning of the wild-type *phoM* operon in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol* 1988a; 170: 279-288.
- 95.- Wanner BL, Wilmes MR, Young DC. Control of bacterial alkaline phosphatase synthesis and variation in an *Escherichia coli* K-12 *phoR* mutant by adenil cyclase, the cyclic AMP receptor protein, and the *phoM* operon. *J Bacteriol* 1988b; 170: 1092-1102.
- 96.- Wanner BL, Riesenberger MRW. Involved of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate syntesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1992; 174: 2124-2130.
- 97.- Wanner BL. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 1993; 51: 47-54.
- 98.- Webb D, Rosenberg H, Cox, GB. Mutational analysis of *E. coli* phosphate-specific transport system a member of the traffic ATPase (or ABC) family of membrane transporters A role for proline residues in transmembrane helices. *J Biol Chem* 1992; 267: 24661-24668.

- 99.- Wildsmith SE, Elcock FJ. Microarrays under the microscope. *Mol Pathol* 2001;54: 8-16.
- 100.- Willsky G, Malamy M. Characterization of two genetically separable inorganic phosphate transport systems in *E. coli*. *J Bacteriol* 1980; 144: 356-365.
- 101.- World Health Organization. Global tuberculosis control. WHO report 2001. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001.287
- 102.- Yamada M, Makino K, Amemura M, Shinagawa H, Nakata A. (1989). Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: analysis of mutant *phoB* and *phoR* genes causing different phenotypes. *J Bacteriol* 1989; 171: 5601-5606.
- 103.- Yamada M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Regulation of the phosphate regulon of *Escherichia coli*: properties of *phoR* deletion mutants and subcellular localization of PhoR protein. *Mol. Gen. Genet* 1990; 220: 366-372.
- 104.- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 1985; 33: 103-19.
- 105.- Young DB, Garbe TR. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol* 1991; 142 :55-65.



Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1)

Ascención Torres, María Dolores Juárez, Rafael Cervantes & Clara Espitia*

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. México, D. F.

(Received December 9, 1999; accepted in revised form January 13, 2001)

The functionality of the putative *Mycobacterium tuberculosis* phosphate transport operon was studied by operon-*lacZ* promoterless fusions in *Mycobacterium smegmatis*. The expression of the operon genes was evaluated in transformed *M. smegmatis* growing in medium with low and high phosphate concentration. Although the gene fusions expressed β -galactosidase in medium with phosphate, a higher activity was detected in bacteria growing in medium with low phosphate. In contrast, alkaline phosphatase activity from *M. smegmatis* was detected only in bacteria growing in medium with low phosphate. The expression of the operon genes was driven by a promoter located 5' upstream from the start codon of the *pstB* gene. A second putative internal promoter 5' upstream of the *pstS-1* gene was also detected. Furthermore, comparative analysis between the native and recombinant PstS-1 proteins showed that they were very similar. Like the native protein, the recombinant protein was also secreted to the culture medium as a glycosylated band. The results show that *M. smegmatis* recognized phosphate regulatory signals of the *M. tuberculosis* phosphate transport operon genes, and open the possibility to study gene phosphate regulation in mycobacteria.

© 2001 Academic Press

Key words: *Mycobacterium tuberculosis* 38 kDa (PstS-1), phosphate starvation, *pst* operon, alkaline phosphatase, *Mycobacterium smegmatis*.

Introduction

Tuberculosis remains a prominent cause of death in the world. It has been estimated that one-

third of the human population is infected with *Mycobacterium tuberculosis*. A small percentage of infected individuals develop clinical symptoms and succumb to the disease, accounting for three million deaths per annum [1]. In the last years, the emergency of *M. tuberculosis* multidrug-resistant strains has become a serious threat to the

* Author for correspondence.
E-mail: espitia@servidor.unam.mx

population. Moreover, protection by the BCG vaccine against *M. tuberculosis* infections has shown variable efficacy between populations [2].

The identification and functional characterization of those bacterial gene products that are specifically required for infection is essential to understand the mechanisms by which *M. tuberculosis* causes disease.

Non-pathogenic mycobacteria offer several potential advantages for characterization of pathogenic mycobacterial genes; in addition to easy manipulation and faster growth, *Mycobacterium smegmatis* for example, expresses gene products of *M. tuberculosis* with post-translational modifications similar to the native proteins and is able to recognize *M. tuberculosis* regulatory signals [3–5].

It is known that many bacterial virulence genes are expressed under stress conditions [6]. When *Escherichia coli* is deprived of phosphate (a fundamental component in the biochemistry of the microorganisms) the *pho* regulon is turned on and the transcriptional activator PhoB, is phosphorylated by PhoR [7, 8]. Phosphorylated PhoB together with the σ^{70} subunit of the RNA polymerase activates the transcription of *phoE*, *phoA*, *pstSCAB-phoU* and *phoBR*. *phoE* encodes an outer membrane protein PhoE, *phoA* codes for alkaline phosphatase PhoA, *pstSCAB-phoU* codes for the phosphate specific transport system (Pst) and *phoBR* codes for the regulatory proteins [7–9]. When inorganic phosphate is available in the culture medium, PhoR dephosphorylates PhoB and in this form the protein is unable to bind to the phosphate box (*pho* box). The last gene of the *pst* operon, *phoU*, is probably a negative regulator of *pho* regulon [10–12]. PhoB may also be phosphorylated by transmembrane protein CreC, but the gene is not regulated by *pho* regulon [13–15]. Many other proteins seem to be regulated by phosphate in *E. coli* [16].

After invasion of host cells by *Salmonella typhimurium*, the induction of the *pho* regulon has been reported [17]. Moreover, mutations in genes of the *pst* operon can attenuate the virulence of *E. coli* or increase invasiveness [18, 19].

Phosphate regulation in the pathogenic *M. tuberculosis* is not well understood despite one of the most studied antigens of *M. tuberculosis*, the immunodominant 38 kDa protein, (antigen 5, antigen 78, Pab or PstS-1) [20–23], being shown to be involved in phosphate transport [24, 25]. The gene encoding PstS-1, was initially isolated from a λ gt11 *M. tuberculosis* DNA expression library

with a monoclonal antibody [26]. The deduced amino acid sequence showed a high degree of similarity with PstS (PhoS), the phosphate binding protein of *E. coli* which belongs to Pst [27–29]. Since then, other *M. tuberculosis* PstS-like proteins have been identified, such as PstS-2 and PstS-3. PstS-1 belongs to the putative phosphate specific transport operon (*pst*), *pstB*, *pstS-1*, *pstC*- and *pstA-2*. PstS-3 forms part of a second potential operon *pstS-3*, *pstC-2* and *pstA-1* and PstS-2 probably forms an operon together with the *mbk* gene (mycobacterial protein kinase) that is located between the two *pst* potential operons and transcribed in opposite orientation [30–33].

A putative *pst* operon has also been cloned and sequenced from *M. intracellulare* (*mipstS-2*, *mipstB*, *mipstS-1a*, *mipstS1-b* and *mipstC-1*) [34], and four *pst*-like operons have been defined in *M. leprae* [35].

Previous studies have shown that the synthesis of PstS-1 antigen is enhanced when *M. tuberculosis* is grown under phosphate starvation conditions [24, 25]. The same results were demonstrated for the PstS-1, PstS-2 and PstS-3 proteins of *M. bovis* [33].

In this work, we study the expression of the *M. tuberculosis* *pst* operon in *M. smegmatis* grown in high phosphate and phosphate starvation conditions. Our results show the functionality of the *M. tuberculosis* *pst* operon in *M. smegmatis* and demonstrate the importance of the use of the non-pathogenic mycobacteria as surrogate hosts for the expression of *M. tuberculosis* genes.

Results

Cloning of the *pst* operon from *M. tuberculosis* genomic library in pYUB328 cosmids

From 46 cosmid colonies isolated in the first screening of the *M. tuberculosis* cosmid library with the 2.1 kb *PvuII* DNA fragment as a probe [Fig. 1(b)], only 23 gave positive hybridization signals by Southern blot analysis. A clone containing the complete *pst* operon (pJT46COS) was chosen for *lacZ* translational fusions.

Demonstration that the genes of the *pst* operon from *M. tuberculosis* are organized in an operon and determination of the promoter regions

M. tuberculosis *pst* operon-*lacZ* translational fusions were constructed as described and ana-

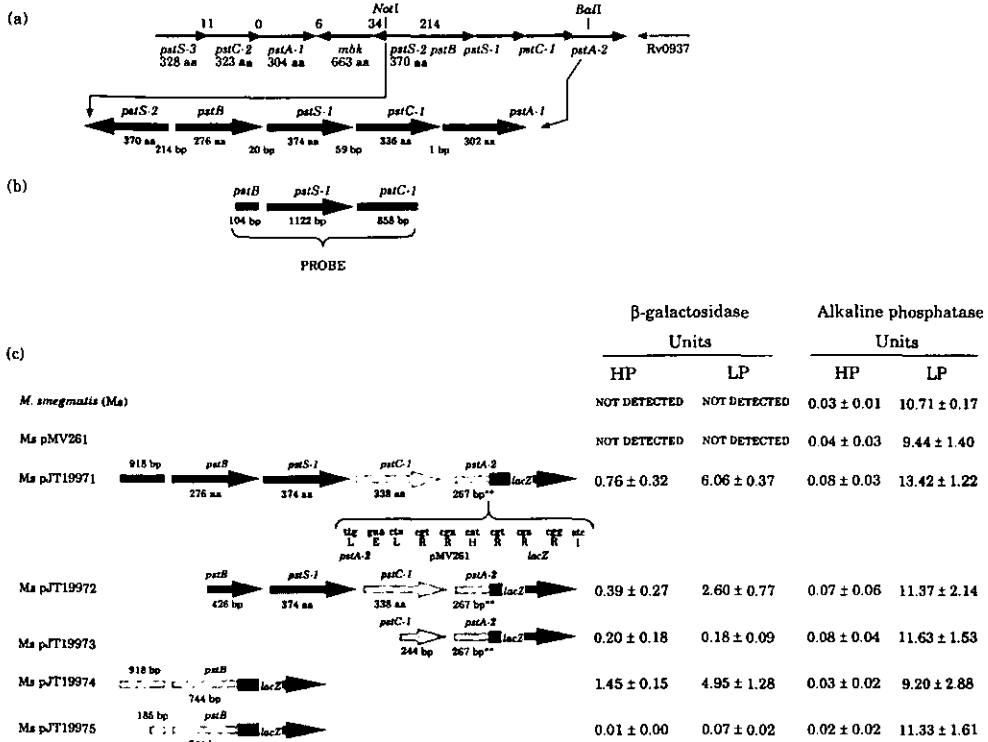


Figure 1. (a) Schematic diagram of the chromosomal region of *M. tuberculosis* H37Rv containing the *pst* putative operons. Orientation of gene transcription is indicated by arrows. (b) DNA probe used for screening of *M. tuberculosis* cosmid DNA library. (c) Translation fusions of different segments of the *M. tuberculosis* *pst* operon with the promoterless *lacZ* gene of *E. coli*. β-gal and alkaline phosphatase (PhoA) activities were measured in *M. smegmatis* transformed with these fusions and grown in medium with low (LP) and high phosphate (HP) concentrations.

lysed in *M. smegmatis* [Fig. 1(c)]. β-galactosidase (β-gal) activity was detected in *M. smegmatis* transformed with pJT19971 when grown in TG medium with phosphate. As expected, alkaline phosphatase activity expressed by *M. smegmatis*, was not detected under those conditions. In contrast, when phosphate was omitted from the TG medium, β-gal activity increased and alkaline phosphatase activity was now detected. Similar results were observed with pJT19972, despite the deletion in this construct of 918 bp of the putative promoter region and 402 bp of the *pstB*. The result showed the presence of promoter activity upstream of *pstS-1*, which is decreased when *pstS-1* was removed as observed with the construct pJT19973. These results were

further confirmed by antibody detection of PstS-1 protein in *M. smegmatis* cell extracts from pJT19971 and pJT19972 grown in medium with high and low phosphate conditions, but not in cell extracts from pJT19973 (Fig. 2). PstS-1 was also undetectable in culture filtrates from untransformed or vector transformed *M. smegmatis* grown in both phosphate conditions (results not shown). The promoter region located upstream of *pstB* gene was then delimited with constructs pJT19974 and pJT19975, the first contains putative 918 bp 5' upstream of *pstB*, when 733 bp were removed (pJT19975) β-gal activity was abolished [Fig. 1(c)]. Taken together, these results indicate that the *pst* genes are part of an operon, and their transcription is driven by two promoter

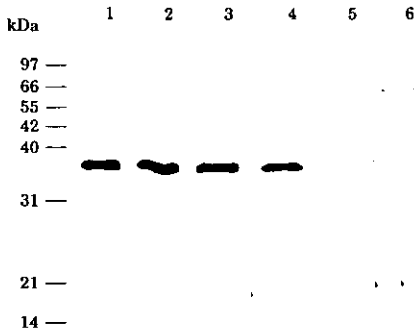


Figure 2. Western blot analysis of *M. smegmatis* recombinant cell extracts from bacteria transformed with pJT19971, pJT19972 and pJT19973. PstS-1 protein was detected with a rabbit polyclonal antibody. *M. smegmatis* transformed with pJT19971 and grown in high (lane 1) and low (lane 2) phosphate concentrations. *M. smegmatis* transformed with pJT19972 and grown in high (lane 3) and low (lane 4) phosphate concentrations. Lane 5, *M. smegmatis* transformed with pJT19973 and grown in low phosphate concentrations. Lane 6, *M. smegmatis* untransformed and grown in low phosphate.

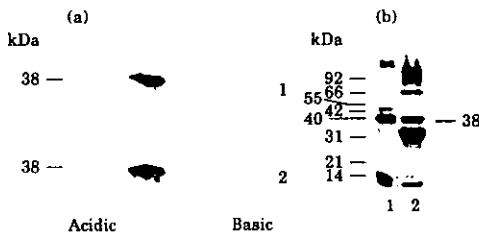


Figure 3. (a) 2D-gel of (1) native and (2) recombinant PstS-1. Three different acidic spots were found to react with monoclonal antibody TB71. (b) Detection of ConA binding by Western blot of *M. tuberculosis* PstS-1 CF enriched fraction (lane 1) and *M. smegmatis* recombinant PstS-1 CF enriched fraction (lane 2).

regions, one located 5' upstream of *pstB* and the other upstream of *pstS-1*.

Expression of *M. tuberculosis* recombinant phosphate transport protein PstS-1

The PstS-1 protein was detected by immunoblot with a rabbit TB71 monoclonal antibody against PstS-1 in culture extracts from *M. smegmatis* transformed with pJT19971 [Fig. 3(a), panel 2].

The recombinant PstS-1 expressed in *M. smegmatis* was secreted into the culture medium and bound ConA [Fig. 3(b)], as previously described for the *M. tuberculosis* native protein [36]. 2D-gel analysis showed that both native and recombinant PstS-1 shared three spots with an isoelectric point which ranged between 4.5 and 5 [Fig. 3(a)]. Finally it is worth pointing out that antibodies from pulmonary tuberculosis patients sera reacted with both the native and the recombinant PstS-1 protein with the same intensity (data not shown).

Discussion

In this work, the expression of the phosphate specific transport genes of *M. tuberculosis* was characterized in the fast-growing *M. smegmatis*. The expression of a set of translational fusions of the *pst* *M. tuberculosis* operon with the structural *E. coli lacZ* gene was analysed by measuring β -gal activity in bacteria growing in high and low phosphate media. Our results confirm that *M. tuberculosis pst* genes are organized in an operon that is regulated by phosphate, and are in agreement with previous observations where an increased PstS-1 expression was detected in bacteria grown in low phosphate conditions [24, 25]. The results also showed that expression of the operon could be driven by two promoters located upstream of the start codon of *pstB* and *pstS-1* and suggest that regulatory signals of the *M. tuberculosis pst* genes are being recognized by *M. smegmatis*. This is in contrast to *E. coli* which did not recognize phosphate regulatory sequences in *M. tuberculosis* as was demonstrated by the failure of *M. tuberculosis* to complement *E. coli pho* mutants (results not shown).

The existence of *pstS-1 pho* box-like (CTGCTCGGGGAC-CTCA) and -10 region (GA-AATT) upstream of *pstS-1* which show similarities with *E. coli pho* box and -10 consensus sequence (identical nucleotides are underlined) has been previously reported [37]. Analysis of putative promoter regions upstream of *pstB* gene also showed a putative *pho* box-like region (CTCTCGAGGGGTC-GTGG) and -10 region (GA-AATC). Comparison of *pstB* and *pstS-1* putative -10 regions with those described previously [38], showed identical bases in positions 2 and 4, in addition *pstS-1* showed an identical base in position 6 of the hexameric *M. smegmatis*

-10 consensus sequence. Four regions distributed in the two *pho* box have been identified that interact with the phosphorylated transcriptional activator *phoB* in *E. coli* under phosphate starvation conditions. Three of them have the sequence TGTC A and one TTACA [39]. In *pho* box-like of *pstS-1* and *pstB* these motif were not found.

It is worth noting that alkaline phosphatase activity could only be detected in *M. smegmatis* when it was grown in culture medium without phosphate. Induction of alkaline phosphomonoesterase of *M. smegmatis* by inorganic phosphate has been reported previously [40]. Alkaline phosphatase activity has been reported in *M. tuberculosis* [41], however homologous sequences to the *phoA* gene have not been identified in the *M. tuberculosis* genome sequence [42].

The *pst* operon of *E. coli* (*pstS-pstC-pstA-pstB-phoU*) and the proposed *pst* operon of *M. tuberculosis* (*pstB/pstS-1/pstC-1/pstA-2*) encode similar proteins [31]. The most notable difference between the two operons is the arrangement of the genes and the absence of *phoU* in the *M. tuberculosis* *pst* operon. This gene is located at the 3' end of the *E. coli* operon and encodes a cytoplasmic protein required for repression of the *pho* regulon but apparently not required for phosphate transport [10-12]. However, in *M. tuberculosis* two *phoU* homologous proteins, PhoY1 (Rv3301c) and PhoY2 (Rv0821c), were identified in the recently sequenced genome [42]. In addition, other phosphate transport system regulatory proteins have been identified, as PhoR/PhoP-like proteins (Rv0758/Rv0757) which are similar to the sensor and transcriptional regulatory proteins from *B. subtilis*, respectively.

Two additional putative PstS proteins, encoded by Rv0928 and Rv0932, were identified forming part of the putative operons, *pstS-3/pstC-2/pstA-1* and *pstS-2/mbk*. In the former there is not a *pstB* gene, while in the latter there are only two genes [32, 43]. Duplication of *pstS* genes has also been described in *Mycobacterium intracellulare* ATCC 35761 and in *M. leprae* [34, 35].

In this work, we also characterized the recombinant PstS-1 expressed in *M. smegmatis*. The PstS-1 protein is one of the most important immunodominant antigens of *M. tuberculosis* and was the first protein shown to be involved in phosphate metabolism. The recombinant PstS-1

protein was recognized in sera from *M. tuberculosis* infected individuals in the same form as the native protein. In addition, both proteins were glycosylated and secreted into the culture medium confirming previous observations [36]. They also showed the same isoelectric point. Together these results indicate that native and recombinant PstS-1 are very similar in expression and biochemical characteristics. All these observations point out the importance of *M. smegmatis* as a surrogate host for studying *M. tuberculosis* gene transcription and regulation.

It should be noted, that phosphate regulatory systems have their own peculiarities depending on the microorganisms. *Salmonella*, for instance, does not have alkaline phosphatase [44]. In *S. flexneri*, a single nucleotide change in *phoB* with regard to *phoB* from *E. coli* is responsible for differences in the expression of *phoE* and *phoA* [45]. The *pho* regulon in *B. subtilis* is positively regulated by a two component transduction system (PhoP/PhoB), and other genes such as *resD* and *resE* are involved in positive regulation of aerobic and anaerobic respiration [46]. The *pst* operon of *Pseudomonas aeruginosa* is the most different from the other bacteria in that it does not have the *pstS* gene [47]. From these comparisons, it is clear that among the prokaryotes, duplication of the *pst* gene has only been documented in the genus, *Mycobacterium*. There are three PstS proteins in *M. tuberculosis*; how these systems are regulated and how they relate to the host-bacterial interaction are very interesting questions to be explored.

Materials and Methods

Bacterial strains and plasmids

E. coli DH5 α IQ were used as a host for the recombinant plasmids. *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv was obtained from ATCC. *Mycobacterium smegmatis* mc²155 was used as the host strain for the shuttle vector pMV261 [48] and their derivatives. The pMC1871 plasmid was used as a source of *E. coli lacZ* gene promoterless [49].

Screening of the cosmid library

The 2.1 kb *PvuII* DNA fragment from λ AA60, containing the 3' end of *pstB* gene, the complete

pstS-1 gene and the 5' end of *pstC-1* was used as a probe for screening a cosmid library of *M. tuberculosis* H37Rv in pYUB328. The probe was labelled with digoxigenin (Boehringer, Mannheim, Germany) and filters were pre-hybridized and probed at 42°C in 6×SSC, 50% formamide, 0.05% skimmed milk overnight. Afterwards, filters were washed twice in 2×SSC, 0.1% SDS for 15 min each, and once in 0.2×SSC, 0.1% SDS, for 15 min and developed. Positive colonies (46) were picked and grown overnight in cultures of LB media with ampicillin (100 µg/ml). Cosmid DNA was isolated by using the Plasmid Isolation Kit (Qiagen, Inc., Valencia, CA, U.S.A.) following the manufacturers instructions. DNA samples were digested with *PvuII*, separated in agarose gels and transferred by blotting onto nylon filters (Amersham Pharmacia Biotech, U.K.). The membrane was probed and developed as described above. From the 23 cosmid samples that were positive and contained similar inserts, one was randomly chosen.

Construction of *M. tuberculosis pst-lacZ* translational fusions

A 4600 bp *NotI*-*BalI* fragment from pJT46COS containing 962 bp upstream from the GTG start codon of the *pstB* gene, the structural *pstB*, *pstS-1*, *pstC-1* and 267 bp of *pstA-2* was filled in the 5' *NotI* overhang using T4 DNA polymerase and inserted in the *HpaI* site of shuttle vector pMV261. The resulting pJT199701 was linearized with *ClaI* and the 5' overhangs generated were filled using T4 DNA polymerase. The *lacZ* gene released from pMC1871 by digestion with *Sall* and the 5' overhangs generated were filled using T4 DNA polymerase. This gene was then subcloned in pJT199701 to obtain the translation fusion pJT19971.

A 418 bp *XbaI*-*HindIII* fragment carrying the *M. tuberculosis* 60 kDa heat shock promoter was deleted from pJT19971, the 5' overhangs generated were filled with T4 DNA polymerase and religated. Then the plasmid was partially digested with *EcoRI*-*PstI* and a clone without 1320 bp was selected by restriction analysis. This construction called pJT1992, contains 426 bp of the structural *pstB* gene *pstS-1*, *pstC-1* and 267 bp of *pstA-2*.

The pJT1993 was made as follows: the pJT19971 was digested with *PstI* and the fragment obtained was subcloned into the pUC18 *PstI* site, then the plasmid was digested with

NcoI, the 5' overhangs generated were filled using the T4 DNA polymerase. A 3.6 kbp fragment was then liberated with *PstI* and subcloned into the *HpaI*-*PstI* site in pMV261. This fragment contains 244 bp of *pstC-1* and 267 bp of *pstA-2* fused to *lacZ*. The pJT19974 was generated as follows: a 1662 bp *NotI*-*PvuII* fragment from pJT46COS was filled using T4 DNA polymerase in the 5' *NotI* overhangs and subcloned to a unique *SmaI* site of the reporter promoterless *lacZ* vector pMC1871. This generated a plasmid which contains a 918 bp upstream from the GTG start codon of the *pstB* gene and 744 bp of this gene. This construct was then digested with *PstI* and the 4 kb liberated fragment was subcloned into the *PstI* site from pMV261.

The pJT19975 was created as follows: a 929 bp *BamHI*-*PvuII* fragment from pJT46COS, carrying 185 bp upstream from the start codon of *pstB* and 744 bp of the same gene was filled in the 5' *BamHI* overhang by using T4 DNA polymerase and inserted in the unique *SmaI* site from pMC1871. The 4044 bp translational fusion insert in the resulting pJT19905 was obtained with *PstI* and subcloned into the unique *PstI* site from pMV261. The correct *pst* operon-*lacZ* translational fusions were verified by DNA sequencing using the dideoxy-chain termination method [50]. Sequencing was carried out with the ThermoSequenase kit (Amersham Pharmacia Biotech) with either [α -33P]-dATP or [γ -33P]-dATP (Amersham Pharmacia Biotech) by using the specific *lacZ* oligonucleotide primer, LACZ1 (5'-GGCCTCTTCGCTATTACGCCAG-3'). Translational fusions were cloned into the pMV261 plasmid in opposite orientation with respect to the heat shock promoter and *aph* gene. The resultant plasmids were then introduced into *M. smegmatis* mc²155 strain by electroporation.

Growth conditions and enzymatic assays

M. smegmatis transformants were grown on 7H11 agar (Difco Laboratories, Detroit, MI, U.S.A.) with 0.05% Tween 80, 0.2% glucose and 0.1% peptone (Difco Laboratories). A single colony was picked up and inoculated in 100 ml of 7H9 medium (Difco Laboratories). Bacteria were grown at 37°C with shaking until the OD₆₀₀ was 0.5 (primary culture). Then, cultures were centrifuged and washed twice with un-supplemented Tris-glucose (TG) media, containing 20 mM NH₄Cl, 3.0 mM Na₂SO₄, 1.0 mM

MgCl₂, 0.2 mM CaCl₂, 80 mM NaCl, 20 mM KCl, 0.002 mM ZnCl₂, 120 mM Tris, and 0.05% Tween 80 pH 7.5. Cells were resuspended in 1 ml of TG supplemented with 0.2% glucose, 0.01% peptone and 25 µg/ml kanamycin. The cell suspension (400 µl) were inoculated in 120 ml of TG with 64 mM K₂HPO₄ (high phosphate) or without phosphate (secondary culture). Bacteria were grown at 37°C with shaking for 48, 72 and 96 h. β-gal activities were measured as follows: to each 800 µl of culture in a 1.5 ml microcentrifuge tube, 200 µl of Z buffer (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM β-mercaptoethanol adjusted to pH 7.0) and two drops of chloroform and one drop of 0.01% SDS were added. After vortexing for 30 s, 200 µl of *o*-Nitrophenyl-β-D-galactosidase (ONPG) (4 mg/ml; Research Organics Inc.) in buffer Z was added to each tube. Samples were then incubated at 28°C for 2–4 h. When a yellow colour appeared in the test tubes, the reaction was stopped in ice water and microcentrifuged for 5 min at 4°C and the OD₄₂₀ of the supernatant was measured. β-gal units were calculated using the formula $1000 \times OD_{420}/\text{time (min)} \times 0.8 \times OD_{600}$ as has been described by Miller [51]. Alkaline phosphatase units was determined as follows: to each 800 µl of culture in 1.5 ml microcentrifuge tube, 200 µl of 1 M of Tris HCl pH 8 and two drops of chloroform and one drop of 0.01% SDS were added. After vortexing for 30 s, 200 µl 4-Nitrophenyl phosphate (2 mg/ml, Boehringer, Mannheim, Germany) in 1 M of Tris HCl pH 8, was added to each tube. Samples were incubated at 37°C 2–4 h, until a yellow colour was observed, the reaction was stopped with 200 µl of 0.5 M Na₂HPO₄. Samples were then centrifuged for 5 min, and the OD₄₂₀ of the supernatant was measured. Alkaline phosphatase units were calculated using the formula $1000 \times OD_{420}/\text{time (min)} \times 0.8 \times OD_{600}$ as has been described previously [52].

Bacterial extracts

M. tuberculosis strains H37Rv was cultured in the Proskauer and Beck synthetic medium for 6 and 4 weeks, respectively. Culture filtrate proteins (CF) were obtained as described elsewhere [36]. *M. smegmatis* transformed with the plasmid containing the complete *pst* operon (pJT19971) was grown in 7H9 medium plus kanamycin (25 µg/ml) and glucose 2% with shaking for 4

days at 37°C. Cells were collected by centrifugation and proteins from culture supernatants were precipitated with 73% (NH₄)₂SO₄. Proteins were centrifuged and the pellet was extensively dialysed against water. An enriched fraction of native and recombinant PstS-1 protein was obtained after acid alcohol fractionation of CF as described elsewhere [36].

Two-dimensional SDS-PAGE and Western blot analysis

Electrophoresis in polyacrylamide gels containing SDS, and subsequent immunoblotting were carried out according to standard procedure [53, 54]. Cultures of *M. smegmatis* with the same OD₆₀₀ were transformed with the different constructs. Samples were centrifuged and the cell bacterial pellet was resuspended in an electrophoresis cocktail and boiled for 5 min. After centrifugation, supernatants were loaded on the gel. Five µg of *M. tuberculosis* and recombinant *M. smegmatis* CF Pst-1 enriched fractions were run on polyacrylamide gels. For carbohydrate and antibody detection, proteins were transferred to nylon membranes (Millipore Co., MA, U.S.A.) and incubated for 1 h at room temperature with ConA-peroxidase (Sigma, MO, U.S.A.) (2.5 µg/ml) or 1/1000 rabbit polyclonal antibody raised against PstS-1 protein, diluted in PBS containing 3% BSA-Tween 20 (0.3% v/v). After washing with PBS Tween 20, the membranes were incubated with antibody and peroxidase conjugated protein A. Peroxidase activity was developed by adding 3,3'-diaminobenzidine HCl and hydrogen peroxide in PBS.

Two-dimensional PAGE were run as follows: urea was added to 10 µg of *M. tuberculosis* and recombinant *M. smegmatis* CF PstS-1 enriched fractions to a final concentration of 9 M, followed by addition of lysis buffer containing urea and Nonidet P-40 as described by O'Farrell *et al.* [55]. Samples were separated initially by isoelectric focusing in tube gels containing 4% ampholytes in the pH range 3.5–5.0 (Amersham Pharmacia Biotech) and then by SDS-PAGE in the second dimension as described above. Proteins were transferred to nylon membranes, and antigens stained by using the monoclonal antibody TB71 diluted 1/2000 and developed with anti-mouse peroxidase conjugate as described above.

Acknowledgements

The pYUB328 cosmid library of *M. tuberculosis*, the mycobacterial shuttle vector pMV261 and *M. smegmatis* mc²155 were kindly provided by W. R. Jacobs J (Albert Einstein College, Bronx, NY, U.S.A.). The monoclonal antibody TB71 by J. Ivanyi (Tuberculosis and Related Infections Unit, Medical Research Council, Clinical Sciences Centre, London, U.K.). Recombinant bacteriophage AAA60 was provided by A. Andersen (University of Denmark, Denmark). We would like to thank L. Camarena and M. Bradbury for critical reading of the manuscript, M. Ortiz, L. Ortiz and M. Baca for technical assistance and A. P. Gaytán and E. Lopez-Bustos for oligo synthesis. This research was supported by grant Conacyt No. 3278P-N and PADEP No. 030324 from Universidad Nacional Automa de México.

References

- Kochi A. Global challenge of tuberculosis. *Lancet* 1994; 344: 608–9.
- Bloom BR, Fine PEM. The BCG experience: implications for future vaccines against tuberculosis. In: Bloom B, Ed. *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1994: 531–57.
- Garbe T, Harris D, Vordemeier V, Lathigra M, Ivanyi J, Young D. Expression of the *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton antigen in *Mycobacterium smegmatis*: immunological analysis and evidence of glycosylation. *Infect Immun* 1993; 61: 260–7.
- Harth G, Lee BL, Horvitz MA. High-level heterologous expression and secretion in rapidly growing non-pathogenic mycobacteri of four major *Mycobacterium tuberculosis* extracellular protein considered to be leading vaccine candidates and drug targets. *Infect Immun* 1997; 65: 2321–8.
- Verma A, Sampla AK, Tyagi JS. *Mycobacterium tuberculosis* *rrn* promoters: differential usage and growth rate-dependent control. *J Bacteriol* 1999; 181: 4326–33.
- Mekalanos JJ. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol* 1992; 174: 1–7.
- Rao NN, Torriani A. Molecular aspects of phosphate transport in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1990; 4: 1083–90.
- Wanner BL. Gene regulation by phosphate in enteric bacteria. *J Cell Biochem* 1993; 51: 47–54.
- Makino K, Amemura M, Kim SK, Nakata A, Shinagawa H. Role of the σ^{70} subunit of RNA polymerase in transcriptional activation by activator protein PhoB in *Escherichia coli*. *Genes & Development* 1993; 7: 149–60.
- Nakata A, Amemura M, Shinagawa H. Regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli* K-12: regulation of the negative regulatory gene *phoU* and identification of the gene product. *J Bacteriol* 1984; 159: 979–85.
- Muda M, Rao NN, Torriani A. Role of PhoU in phosphate transport and alkaline phosphatase regulation. *J Bacteriol* 1992; 174: 8057–64.
- Steed PM, Wanner BL. Use of the *rep* technique for allele replacement to construct mutants with deletions of the *pstSCAB-phoU* operon: evidence of a new role for the PhoU protein in phosphate regulon. *J Bacteriol* 1993; 175: 6797–809.
- Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Cross talk to the phosphate regulon of *Escherichia coli* by PhoM protein PhoM is a histidine protein kinase and catalyzes phosphorylation of PhoB and PhoM-open reading frame 2. *J Bacteriol* 1990; 172: 6300–7.
- McCleary WR. The activation of PhoB by acetyl-phosphate. *Mol Microbiol* 1996; 20: 1155–63.
- Wanner BL, Riesenberg MRW. Involved of phosphotransacetylase, acetate kinase, and acetyl phosphate synthesis in control of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1992; 174: 2124–30.
- VanBogelen RA, Olson ER, Wanner BL, Neidhardt FC. Global analysis of proteins synthesized during phosphorus restriction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1996; 178: 4344–66.
- Janssen R, Verjans GM, Kusters JG, Tommassen J. Induction of the *phoE* promoter upon invasion of *Salmonella typhimurium* into eukaryotic cells. *Microbial Pathogen* 1995; 19: 193–201.
- Sinai AP, Bavoi PM. Hyper-invasive mutants define a novel Pho-regulated invasion pathway in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 1993; 10: 1125–37.
- Daigle F, Fairbrother JM, Harel J. Identification of a mutation in the *pst-phoU* operon that reduces pathogenicity of an *Escherichia coli* strain causing septicemia in pigs. *Infect Immun* 1995; 63: 4924–7.
- Daniel TM, Ellner JJ, Todd LS et al. Immunobiology and species distribution of *Mycobacterium tuberculosis* Antigen 5. *Infect Immun* 1979; 24: 77–82.
- Young D, Kent L, Rees A, Lamb J, Ivanyi J. Immunological activity of a 38-kilodalton protein purified from *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1986; 54: 177–83.
- Espitia C, Cervera I, Gonzalez R. A 38 kDa *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 373–7.
- Harboe M, Wiker HG. The 38 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis*: a review. *J Infect Dis* 1992; 166: 874–84.
- Andersen AB, Ljungqvist L, Olsen M. Evidence that protein antigen b of *Mycobacterium tuberculosis* is involved in phosphate metabolism. *J Gen Microbiol* 1990; 136: 477–80.
- Espitia C, Elinos M, Hernandez-Pando R, Mancilla R. Phosphate starvation enhances expression of the immunodominant 38-kilodalton protein antigen of *Mycobacterium tuberculosis*: demonstration by immunogold electron microscopy. *Infect Immun* 1992; 60: 2998–3001.
- Andersen AB, Worsaae A, Chaparas SD. Isolation and characterization of recombinant lambda gt11 bacteriophages expressing eight different mycobacterial antigens of potential immunological relevance. *Infect Immun* 1988; 56: 1344–51.
- Surin BP, Rosenberg H, Cox GB. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polipeptide relationships. *J Bacteriol* 1985; 161: 189–98.

- 28 Amemura M, Makino K, Shinagawa H, Nakata A. Nucleotide sequence of the genes involved in phosphate transport and regulation of the phosphate regulon in *Escherichia coli*. *J Mol Biol* 1985; 184: 241-50.
- 29 Andersen AB, Hansen EB. Structure and mapping of antigenic domains of protein antigen b, a 38,000-molecular-weight protein of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun* 1989; 57: 2481-8.
- 30 Braibant M, De Wit L, Peirs P *et al*. Structure of *Mycobacterium tuberculosis* antigen 88, a protein related to the *Escherichia coli* PstA periplasmic phosphate permease subunit. *Infect Immun* 1994; 62: 849-54.
- 31 Braibant M, Lefèvre P, De Wit L *et al*. A *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding protein of a phosphate transporter homologous to the *Escherichia coli* Pst system. *Gene* 1996; 176: 171-6.
- 32 Braibant M, Lefèvre P, De Wit L *et al*. Identification of a second *Mycobacterium tuberculosis* gene cluster encoding protein of an ABC phosphate transporter. *FEBS Letters* 1996; 394: 206-12.
- 33 Lefèvre P, Braibant M, De Wit L *et al*. Three different putative phosphate transport receptors are encoded by the *Mycobacterium tuberculosis* genome and are present at the surface of *Mycobacterium bovis* BCG. *J Bacteriol* 1997; 179: 2900-6.
- 34 Thangaraj HS, Bull TJ, De Smet KAL *et al*. Duplication of genes encoding the immunodominant 38 kDa antigen in *Mycobacterium intracellulare*. *FEBS Microbiol* 1996; 144: 235-40.
- 35 Eiglmeier K, Honoré N, Woods SA, Caudron B, Cole ST. Use of an ordered cosmid library to deduce the genomic organization of *Mycobacterium leprae*. *Mol Microbiol* 1993; 7: 197-206.
- 36 Espitia C, Mancilla R. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* 1989; 77: 378-83.
- 37 Dale WJ, Patki A. Mycobacterial gene expression and regulation. In: McFadden J, Ed. *Molecular Biology of Mycobacteria*. London: Surrey University Press, 1990: 173-98.
- 38 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: 4847-53.
- 39 Makino K, Amemura M, Kawamoto T *et al*. DNA binding of PhoB and its interaction with RNA polymerase. *J Mol Biol* 1996; 259: 15-26.
- 40 David HL. Alkaline phosphatases from *Mycobacterium smegmatis*. *J Gen Microbiol* 1977; 101: 99-102.
- 41 Casal RM, Linares SMJ. Preliminary investigation of *Mycobacterium tuberculosis* biovars. *J Clin Microbiol* 1984; 20: 1015-6.
- 42 Cole ST, Brosch R, Parkhill J *et al*. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 1998; 393: 537-44.
- 43 Peirs P, De Wit L, Braibant M, Huygen K, Content J. A serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *Eur J Biochem* 1997; 244: 604-12.
- 44 Schlesinger M, Olsen R. Expression and localization of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesized in *Salmonella typhimurium* cytoplasm. *J Bacteriol* 1968; 96: 1601-5.
- 45 Scholten M, Janssen R, Bogaarts C, Van Strien J, Tommassen J. The *pho* regulon of *Shigella flexneri*. *Mol Microbiol* 1994; 34: 247-54.
- 46 Sun G, Birkey SM, Hulett FM. Three two-component signal-transduction systems interact for Pho regulation in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 1996; 19: 941-8.
- 47 Nikata T, Sakai Y, Shibata K, Kato J, Kuroda A, Ohtake H. Molecular analysis of the phosphate-specific transport (*pst*) operon of *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Gen Genet* 1996; 250: 692-8.
- 48 Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR *et al*. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature* 1991; 351: 456-60.
- 49 Shaphira SK, Chou J, Richaud FV, Casadaban MJ. New versatile plasmid vector for expression of hybrid proteins coded by a cloned gene fused to *lacZ* gene sequences encoding an enzymatically active carboxy-terminal portion of β -galactosidase. *Gene* 1983; 25: 71-82.
- 50 Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 1977; 74: 5463-7.
- 51 Miller JH. Experiments in Harbor Laboratory Press molecular genetics, Cold Spring Harbor, Laboratory Press, 1972.
- 52 Brickman E, Beckwith J. Analysis of the regulation of *Escherichia coli* alkaline phosphatase synthesis using deletions and ϕ 80 transducing phages. *J Mol Biol* 1975; 96: 307-16.
- 53 Laemli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; 227: 680-5.
- 54 Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Biotechnology* 1979; 24: 145-9.
- 55 O'Farrel PH. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol Chem* 1975; 250: 4007-21.