

030813



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES

UNIDAD ACADEMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES
Y DE POSGRADO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS
PROYECTO DE DOCTORADO EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

CARACTERIZACION MOLECULAR DEL GEN QUE
CODIFICA PARA LA PROTEINA Rv2874 (DipZ) Y SU
RELACION CON EL LOCUS *mpt83-mpt70* DE
Mycobacterium tuberculosis.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE
DOCTOR EN INVESTIGACION
BIOMEDICA BASICA

P R E S E N T A :

M. en C. MARIA DOLORES JUAREZ RODRIGUEZ

DIRECTOR DE LA TESIS: DRA. CLARA INES ESPITIA PINZON

MEXICO, D.F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

2002



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.

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, UNAM, 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 realizado bajo la dirección de la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón
y asesorado por los cotutores: Dr. Luis Servín González
Dra. Bertha Espinoza Gutiérrez

Durante este trabajo la autora fue becaria de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) y se le otorgó un presupuesto de PADEP para la realización de su trabajo.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

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 Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas que tuvo lugar el día 18 de julio de 2001, se acordó designar el siguiente jurado para examen de Doctorado en Investigación Biomédica Básica de la M. en C. María Dolores Juárez Rodríguez con no. de cuenta 7814463-9 y no. de expediente 70465 con la tesis titulada: "Caracterización molecular del gene que codifica para la proteína Rv2874 (DipZ) y su relación con el locus rnpT83-rnpT70 de Mycobacterium tuberculosis", dirigida por la Dra. Clara I. Espitia Pinzón.

Presidente:	Dr. Raúl Mancilla Jiménez
Secretario:	Dra. Clara I. Espitia Pinzón
Vocal:	Dra. Laura Camarena Mejía
Vocal:	Dr. Armando Tovar Palacios
Vocal:	Dr. Baltazar Beceril Luján
Suplente:	Dra. Edda Lydia Sciutto Conde
Suplente:	Dr. Jorge González y Merchand

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente

"Por mi raza hablará el espíritu"

Cd. Universitaria, D.F., 18 de julio de 2001.

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

Dr. César A. Domínguez Pérez-Tejada
Coordinador
Doctorado en Ciencias Biomédicas

c.c.p. - Secretaría de Asuntos Escolares

Dedico esta Tesis a la memoria del:

Dr. Lino Díaz de León y al Dr. Jorge F. Calderón Jiménez,
quienes siempre me brindaron su apoyo. Que en paz descansen.

Agradezco muy sinceramente a la Dra. Clara Inés Espitia Pinzón:

la oportunidad que me dio para continuar con mi formación académica en su laboratorio, por su apoyo incondicional aún en los momentos difíciles, por su comprensión y paciencia.

Agradezco a los siguientes investigadores por el apoyo que me brindaron para continuar con mi formación académica, por sus sabios consejos y por confiar en mi.

Dra. Clara Inés Espitia Pinzón.

Dr. Raúl Mancilla Jiménez

Dr. Guillermo Ruiz-Palacios.

Dr. Jesús Reynaga Obregón.

Dra. Amelia Farres.

Dr. Lino Díaz de León.

Lic. Jorge Pérez de la Mora.

Dra. Edda Scitutto Conde y su Grupo.

Dr. Juan Pedro Laclette San Roman y su Grupo.

Dr. Carlos Larralde.

QFB. Mercedes Baca Ladrón de Guevara.

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

Dedico esta Tesis a: la memoria de mis abuelos Gertrudis Juárez, Blas Rodríguez y mi queridísima Lota Quintana, que en paz descansen.

También dedico esta Tesis muy especialmente y con mucho cariño:

A mis padres
por el cariño, apoyo y comprensión en todo momento.
Por su ejemplo de bondad, rectitud y honestidad.

A Ascención Torres Escobar
por su cariño, apoyo incondicional
y por compartir conmigo su vida e ideales.

A mi abuelita María, por su cariño.

A mis hermanas por su cariño, apoyo y solidaridad.
Y por que este trabajo sea un ejemplo del esfuerzo por la superación continúan,
a pesar de que el camino no sea muchas veces fácil.

A mis sobrinos Pedrito y Leonardito,
por el cariño, la alegría y ternura que han traído a mi vida.
Esperando que este trabajo también los motive a su constante superación.

A Paco, Fabian y Juan
Por formar parte ya de nuestra familia.

A todos las personas que me han brindado su amistad incondicional y cariño.

A el Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y su Grupo por su sincero e incondicional apoyo.

RESUMEN

Los antígenos proteicos MPT83 y MPT70 de *Mycobacterium tuberculosis* son expresados al 1% de lo que se expresan sus homólogos, en un grupo de subcepas de *Mycobacterium bovis* BCG. Sin embargo, la secuencia nucleotídica del *locus mpt83-mpt70* en ambas micobacterias es similar. Por otra parte, ambos genes podrían estar formando un operón, debido a que la expresión del *mpt70*, solo se observó con un cósmido que contenía también al *mpt83*, localizado a 2.4 kb arriba del *mpt70*. El objetivo principal del presente trabajo fue estudiar la expresión del *locus mpt83-mpt70* de *M. tuberculosis*. El análisis de la secuencia intergénica entre el *mpt83* y el *mpt70*, permitió identificar un gen con la misma orientación transcripcional que codifica una posible proteína integral de membrana con similitud a CcdA y DipZ, implicadas en la biogénesis del citocromo c. Este gen fue designado como el Rv2874 en el proyecto de secuenciación de *M. tuberculosis*. Por hibridación tipo Southern blot, el gen Rv2874 fue identificado únicamente en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG. La proteína expresada por el Rv2874, al igual que las proteínas MPT83 y MPT70, no fue detectada por inmunoblot en los extractos proteicos de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG. La expresión del Rv2874 y de los genes Rv2871, Rv2872, *mpt83* y *mpt70* de *M. tuberculosis* fue analizada en *M. smegmatis* transformada con diferentes fusiones traduccionales y transcripcionales de estos genes con el gen reportero *lacZ* de *E. coli* y por experimentos de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los resultados obtenidos nos sugieren que estos genes pueden estar formando un operón y que su transcripción, además podría estar dirigida por regiones promotoras localizadas en las regiones 5' corriente arriba de estos genes.

SUMMARY

The amount of MPT83 and MPT70 antigens, produced by *Mycobacterium tuberculosis* is only about 1% of the amount of their homologous proteins produced in a group of substrains of *M. bovis* BCG. However, the nucleotide sequence of *mpt83-mpt70* locus from both mycobacteria is very similar. Furthermore, both genes could be forming part of an operon. The expression of the *mpt70* gene was observed only in a cosmid that contained the *mpt83* gene. This gene is located 2.4 kb upstream of the *mpt70*. The main goal of this work was to study the expression of the locus *mpt83-mpt70* of *M. tuberculosis*. Analysis of the intergenic nucleotide sequence between the *mpt83* and *mpt70* allowed the identification of a gene with the same transcriptional orientation, which encodes a possible integral membrane protein homologous with CcdA and DipZ involved in cytochrome c biogenesis. Afterwards, this gene was designated as the Rv2874 in the *M. tuberculosis* sequencing project. By Southern blot was determined that the Rv2874 is present only in *M. tuberculosis* and *M. bovis* BCG. Like MPT83 and MPT70 proteins, the Rv2874 protein was not detected by immunoblot in protein extracts of *M. tuberculosis* complex strains. The expression of the Rv2874 and of the Rv2871, Rv2872, *mpt83* and *mpt70* genes of *M. tuberculosis* was studied in *M. smegmatis* transformed with translational and transcriptional fusions, between these genes and the *E. coli lacZ* reporter gene, and by experiments of reverse transcription and polymerase chain reactions (RT-PCR). Our results suggest that these genes could be forming an operon and also that their transcription could be driven by promoter regions located upstream of these genes.

INDICE

I.- INTRODUCCION.....	1
- El estudio de <i>M. tuberculosis</i> a nivel molecular requiere del desarrollo de nuevas herramientas moleculares específicas para este patógeno.	4
- Patogénesis de <i>M. tuberculosis</i> .	8
- Principales antígenos de <i>M. tuberculosis</i> .	10
- Los antígenos MPT83/MPB83 y MPT70/MPB70.	11
- Expresión de las proteínas MPT83 y MPT70.	12
II.- JUSTIFICACION.....	14
III.- OBJETIVOS.....	15
IV.- MATERIALES Y METODOS.....	16
- Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y plásmidos.	16
- Técnicas de DNA recombinante.	17
- Transformación genética de los cultivos bacterianos.	17
Preparación de células competentes de <i>E. coli</i> .	17
Preparación de células competentes de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc ² 155.	18
- Aislamiento y clonación de la región del DNA conteniendo los genes <i>mpt83</i> y <i>mpt70</i> de <i>M. tuberculosis</i> .	19
- Extracción del DNA cromosomal de micobacterias.	23
- Hibridación tipo Southern.	25

- Análisis de la expresión de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*. 26
- Expresión del dominio central transmembranal y el dominio carboxilo terminal hidrofílico codificados por el gen Rv2874. 28
- Expresión del dominio hidrofílico carboxilo terminal de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*. 30
- Purificación de las formas solubles recombinantes de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*. 33
- Obtención de sueros policlonales de ratón dirigidos contra las proteínas recombinantes purificadas. 34
- Preparación de la fracción de membranas celulares de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*. 36
- Fraccionamiento celular de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG y de *M. smegmatis* transformada con el gen Rv2874. 37
- Electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayos de inmunoblot. 38
- Determinación de la inmunogenicidad de la proteína recombinante His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa por inmunoblot con sueros de pacientes tuberculosos y de personas sanas como control. 39
- Purificación de las proteínas recombinantes His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa y His-Rv2874C₁1 de 36/40 kDa por cromatografía de inmunoafinidad con el suero policlonal de ratón dirigido contra estas proteínas. 40
- Ensayo de la reducción de los puentes disulfuro de la insulina. 42

- Aislamiento total de RNA de <i>M. tuberculosis</i> .	43
- Reacciones de transcripción reversa y amplificación en cadena de la DNA polimerasa (RT-PCR).	44
- Construcción de fusiones traduccionales del gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> con el gen estructural <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> .	47
- Construcción de fusiones transcripcionales entre el posible operón <i>mpt83-Rv2874-mpt70</i> de <i>M. tuberculosis</i> y el gen <i>lacZ</i> estructural de <i>E. coli</i> .	56
- Ensayos de β -galactosidasa.	69
V. RESULTADOS.....	71
- Clonación del gen Rv2874 y del fragmento de DNA conteniendo los genes <i>mpt83</i> y <i>mpt70</i> .	71
- Análisis de la secuencia nucleotídica del gen Rv2874.	72
- Modelo topológico de la proteína codificada por el gen Rv2874.	79
- Expresión del dominio C-terminal recombinante sin el motivo de tioredoxina His-Rv2874-C ₂ de 30/34 kDa y con el motivo de tioredoxina His-Rv2874-C ₁ de 36/40 kDa, de la proteína codificada por el gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> .	81
- Inmunodetección de la proteína codificada por el gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> .	85
- La proteína recombinante His-Rv2874-C ₁ de 36/40 kDa no fue reconocida por sueros de pacientes con TB.	88

- Ensayo de la reducción de Insulina con la proteína recombinante His-Rv2874C ₁ l de 36/40 kDa.	89
- Análisis de la expresión del gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> por RT-PCR.	89
- Fusiones traduccionales del gen Rv2874 con el gen estructural <i>lacZ</i> de <i>E. coli</i> .	92
- Análisis de la probable región promotora del gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> .	100
- Caracterización de la probable región -10 localizada en la región reguladora del gen Rv2874 de <i>M. tuberculosis</i> por mutagénesis de sitio dirigida y por fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> estructural de <i>E. coli</i> sin promotor.	102
- Análisis de la expresión del probable operón <i>mpt83</i> -Rv2874- <i>mpt70</i> por medio de fusiones transcripcionales con el gen <i>lacZ</i> estructural de <i>E. coli</i> .	103
- Análisis de la cotranscripción del gen Rv2874 con el gen <i>mpt83</i> por RT-PCR.	107
VI.- DISCUSION.....	114
VII.- CONCLUSIONES.....	127
VIII.- PERSPECTIVAS.....	131
XI.- BIBLIOGRAFIA.....	135

X.- ANEXO.....150

- Artículo publicado:

Juárez MD, Torres A, Espitia C. 2001. Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mp183* and *mp170* genes. FEMS Microbiol 203: 95-102.

INDICE DE FIGURAS

Figura 1.....	22
Figura 2.....	27
Figura 3.....	29
Figura 4.....	31
Figura 5a.....	48
Figura 5b.....	50
Figura 5c.....	51
Figura 5d.....	53
Figura 5e.....	54
Figura 5f.....	55
Figura 6a.....	57
Figura 6b.....	59
Figura 6c.....	60
Figura 6d.....	61
Figura 7a.....	62
Figura 7b.....	63
Figura 7c.....	65
Figura 7d.....	66
Figura 8.....	68
Figura 9.....	73
Figura 10.....	74-75
Figura 11.....	77-78

Figura 12.....	80
Figura 13.....	82
Figura 14.....	83
Figura 15.....	84
Figura 16.....	86
Figura 17.....	90
Figura 18.....	91
Figura 19.....	93-94
Figura 20.....	95-96
Figura 21.....	97
Figura 22.....	99
Figura 23.....	101
Figura 24.....	104
Figura 25a.....	109
Figura 25b.....	110
Figura 25c.....	111
Figura 25d.....	112
Figura 25e.....	113

INTRODUCCION

La tuberculosis (TB) es una enfermedad infecciosa que continúa siendo uno de los más importantes problemas de salud pública en el mundo. El agente etiológico de la TB es *Mycobacterium tuberculosis*, una bacteria Gram-positiva del orden de los actinomicetales y patógeno intracelular de macrófagos. Se estima que *M. tuberculosis* está infectando a un tercio de la población mundial, causando anualmente 8 millones de nuevos casos de tuberculosis y de 2 a 3 millones de muertes (Pelicic *et al.*, 1998; WHO, 2001).

En los últimos años la incidencia de TB se ha incrementado debido al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes a los antibióticos de primera elección en el tratamiento de esta enfermedad (Cohn *et al.*, 1997). En los países en desarrollo, la prevalencia e incidencia de la enfermedad y el surgimiento de cepas resistentes a los antibióticos, ha sido debido principalmente a las condiciones de pobreza extrema combinadas con los programas de control de TB insuficientes e inadecuados, así como a regímenes de tratamiento sin seguimiento y en muchos de los casos, al abandono de los mismos.

Por otro lado, los brotes epidémicos por cepas de *M. tuberculosis* multiresistentes a antibióticos también están asociados con pacientes infectados con el virus de la deficiencia inmunológica humana (VIH) tanto en países desarrollados como en los no desarrollados. Además, el número creciente de infecciones por el VIH en los países en vías de desarrollo, representa un factor de riesgo para el desarrollo de la enfermedad clínica a partir de la tuberculosis no activa o latente y la diseminación de la misma (Daley *et al.*, 1992; Small *et al.*, 1994; Raviglione *et al.*, 1995; Bradford *et al.*, 1996). El reporte de la Organización Mundial de la Salud del 2001 mostró un incremento del 20% en la incidencia de TB, en los países de Africa más afectados por la epidemia del VIH, si esta tendencia

continúa, se estima que para el año 2005, el número de nuevos casos a nivel mundial ascenderá a 10.2 millones (WHO, 2001).

Por otra parte, la vacuna BCG confiere una protección contra la TB altamente variable, siendo por ejemplo del 77 % en el Reino Unido y del 0 % en el sur de la India (Roche *et al.*, 1995). Esta vacuna fue desarrollada por Calmette y Guérin (BCG), a partir de una cepa de *M. bovis* que fue subcultivada *in vitro* cada tres semanas y durante 13 años, con un total de 231 pases (de 1908 a 1921); hasta que perdió la virulencia pero conservó la inmunogenicidad. Sin embargo, debido a la incapacidad de preservar la bacteria viable, la vacuna viva requirió de pases continuados hasta los años de 1960s, cuando comenzaron a prepararse liofilizados de la vacuna BCG. Este crecimiento continuo *in vitro* de la vacuna original BCG, efectuado en diferentes laboratorios, trajo como resultado el surgimiento de múltiples subcepas conocidas como BCG. La variación en la protección conferida por la vacuna BCG, puede ser debida a la heterogeneidad existente entre las subcepas de BCG. Recientemente, en estudios comparativos del genoma entre *M. bovis*, varias subcepas BCG y *M. tuberculosis*, se detectaron un total de 16 regiones eliminadas del genoma variando en longitud desde 1903pb a 12733 pb. De estas 16 regiones, 9 se perdieron en todas las subcepas de BCG y en las cepas virulentas de *M. bovis* analizadas, dos regiones representando profagos, se perdieron en BCG y en algunas de las cepas de *M. bovis*, una región se perdió en todas las cepas BCG y 4 regiones solo se han eliminado en ciertas subcepas de BCG (Mahairas *et al.*, 1996; Behr *et al.*, 1999).

Por otra parte, otro factor importante implicado en la variabilidad de la protección contra la TB conferida por la vacuna BCG, es la exposición previa a micobacterias en el ambiente, debido a que la inmunidad inducida por éstas, evitaría la infección por la vacuna BCG, requerida para la inducción de inmunidad a la TB.

Debido a este panorama, la Organización Mundial de la Salud declaró en 1993 a la TB como uno de los problemas más graves de salud pública a nivel mundial, considerando una prioridad internacional en la investigación, el desarrollo de una nueva generación de vacunas más efectivas contra la TB o mejorar genéticamente la vacuna BCG.

El control y erradicación de la tuberculosis, por lo tanto requiere del desarrollo de vacunas contra la TB de mayor eficacia que la vacuna BCG; de métodos de diagnóstico rápidos y factibles de realizarse con la infraestructura mínima indispensable, así como la generación de conocimientos acerca de los determinantes genéticos de la virulencia y patogénesis de *M. tuberculosis*. La identificación y caracterización de los factores de virulencia permitirían diferenciar entre las cepas de *M. tuberculosis* virulentas (causantes de infecciones múltiples o brotes epidémicos) y menos virulentas (aquellas cepas que a pesar de las condiciones propicias para producir el contagio, no ocasionan enfermedad en las personas que conviven o tratan a los pacientes con TB desarrollada por estas cepas). Esto haría factible, desarrollar estrategias de control de la TB más adecuadas (incluyendo la aplicación de regímenes de tratamiento más rigurosos a los pacientes de TB infectados con cepas altamente virulentas, así como el manejo especial de estos pacientes, evitando la transmisión de la TB a otras personas). Otra área de investigación encaminada al control de la tuberculosis, es el desarrollo de conocimientos acerca de los factores genéticos humanos que confieren resistencia innata a la TB. Se ha reportado que solo el 10 % de las personas con tuberculosis latente desarrollan tuberculosis activa y las personas que por su ocupación laboral, han estado expuestas en múltiples ocasiones a pacientes con TB activa y no han desarrollado la enfermedad (Stead, 1997), son claros indicios de que existen factores hereditarios que confieren resistencia innata a patógenos intracelulares como el gen *bcg/lsh/ity/nramp1* que se ha identificado en ratón (Gros *et al.*, 1981; Vidal *et al.*, 1993). Este gen *bcg/lsh/ity/nramp1* codifica la proteína Nramp1, la cual está involucrada en

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

el proceso de acidificación de la vacuola fagocítica del macrófago, dependiente de la ATPasa de protones (Hackam *et al.*, 1998).

El estudio de *M. tuberculosis* a nivel molecular requiere del desarrollo de nuevas herramientas moleculares específicas para este patógeno.

A pesar de la importancia de la TB, los determinantes genéticos de la virulencia y patogénesis de *M. tuberculosis* no han sido completamente dilucidados, debido principalmente a las características particulares de este patógeno y también a que la aplicación a esta bacteria de las herramientas moleculares convencionales como mutagénesis por transposones o aislamiento de genes por complementación de mutantes de *E. coli*, no ha tenido éxito.

Debido a que *M. tuberculosis* se transmite por aerosoles, se ha estimado que se requieren de una a tres bacterias viables para establecerse el contagio. Por lo que es indispensable el uso de áreas de bioseguridad de nivel 3, para manipular la bacteria. Por otra parte, debido a que el tiempo de duplicación celular de *M. tuberculosis* es de 18-26 horas, para obtener un cultivo en medio líquido de este patógeno se requieren hasta dos meses y cerca de un mes para la obtención de colonias visibles en placas. Además, debido a que la pared celular de esta bacteria es rica en lípidos y carbohidratos, ésta crece formando cúmulos o agregados por lo que es necesario adicionar detergente al medio a fin de obtener un cultivo semi-homogéneo.

Estas características han dificultado la selección de mutantes y su caracterización, ya que ha sido difícil la obtención de colonias a partir de una sola célula. Debido a esto, los agentes químicos y físicos utilizados generalmente para mutagenizar bacterias, no han podido utilizarse exitosamente en *M. tuberculosis*.

Por otro lado, la estructura compleja de la pared celular le confiere propiedades como resistencia y grosor, haciendo a esta bacteria patógena difícil de transformar genéticamente. No obstante, por medio de electroporación se ha podido transformar *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, requiriéndose desde 1 hasta 3 µg de DNA. Sin embargo, la eficiencia de transformación es inferior en comparación con la obtenida para *E. coli* (McAdam *et al.*, 1995).

Con respecto al intercambio alélico en el cromosoma de *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG, se ha observado que para efectuarse se requiere preferencialmente del uso de fragmentos de DNA relativamente grandes (20 kb) y lineales, debido a que los fragmentos cortos de DNA homólogos son integrados al cromosoma por recombinación ilegítima al azar en sitios diferentes del sitio homólogo (Balasubramanian *et al.*, 1996).

Debido a las bajas frecuencias de electroporación, de intercambio alélico y de transposición, ha sido extremadamente difícil la generación de bancos de mutantes de *M. tuberculosis* por intercambio alélico o transposición, usando vectores incapaces de replicarse en *M. tuberculosis* (vectores suicidas). Por lo que, ambos sistemas de mutagénesis han requerido el diseño de métodos más eficientes. Recientemente, el desarrollo de vectores replicativos que liberan las secuencias de DNA mutagénicas y que son eficientemente perdidos en ciertas condiciones, con marcadores contra-seleccionables como el gen *sacB* y orígenes de replicación termosensibles, están permitiendo la selección positiva de mutantes insercionales y la construcción de los bancos de mutantes de *M. tuberculosis* (Bardarov *et al.*, 1997; Pelicic *et al.*, 1997; Camacho *et al.*, 1999).

Por otra parte, el genoma de *M. tuberculosis* contiene un alto contenido de guaninas y citosinas (G+C) (65%) y un uso de codones con una preferencia por G o C en la tercera base. El estudio de la expresión y regulación de genes de *M. tuberculosis* utilizando a *E. coli*, ha sido infructuosa. Los genes de *M. tuberculosis* no son expresados

por *E. coli*. Este hecho, probablemente se debe a que los sistemas de control transcripcionales así como las señales de traducción en *M. tuberculosis* (en parte, por su alto contenido de GC en el DNA) son diferentes a las de *E. coli*, la cual no reconoce la mayoría de las secuencias promotoras de los genes de *M. tuberculosis* con las que se ha transformado.

Debido a lo anterior, se ha recurrido al uso de *Mycobacterium smegmatis* que es una micobacteria no patógena y de rápido crecimiento, con un tiempo de duplicación celular de 3 horas. Aunque esta bacteria posiblemente también sea diferente de *M. tuberculosis*, constituye una alternativa para el estudio de la expresión de los genes de *M. tuberculosis* (Yeremeev *et al.*, 2000; Torres *et al.*, 2001; Tullius *et al.*, 2001). Con respecto al uso de plásmidos y bacteriófagos para el análisis genético y manipulación de *M. tuberculosis*, éste es restringido. La mayoría de los vectores de clonación construidos se han utilizado con *M. smegmatis*. Estos vectores “Shuttle” (con origen de replicación para *E. coli* y micobacteria) contienen al origen de replicación derivado del plásmido pAL5000 de *M. fortuitum* y la eficiencia de transformación de estos plásmidos es baja (Snapper *et al.*, 1988). No obstante, algunos grupos de investigación están trabajando en el desarrollo de herramientas moleculares para la transformación y manipulación génica de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (Bardarov *et al.*, 1997; Jain *et al.*, 1997; Hatfully y Jacobs, 2000).

Otra de las dificultades para lograr avanzar en el estudio de la virulencia y patogénesis de *M. tuberculosis*, lo constituye el hecho de que *M. tuberculosis* es una bacteria huésped-específico (del humano), por lo que no existe un modelo animal que brinde las condiciones de infección y patogenia similares al de humano. Sin embargo, los modelos de tuberculosis en el ratón y el conejo han brindado logros importantes en el entendimiento del establecimiento de la respuesta inmune del huésped (Schlossberg *et al.*, 2000).

Así, la generación de conocimientos a nivel molecular de este patógeno, requiere principalmente del desarrollo de herramientas moleculares.

Uno de los logros más recientes ha sido la culminación de la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* (Colc *et al.*, 1998), la cual brinda la información sobre los 3924 posibles frentes de lectura abiertos que potencialmente codifican proteínas en esta bacteria y su localización en el genoma. Esta información ya ha comenzado a ser usada para abordar el estudio de la regulación y expresión génica de *M. tuberculosis* en respuesta a diversas condiciones de crecimiento y señales de estrés ambiental, de una forma integral, completa y rápida, por medio de los microarreglos genómicos (Barry y Schroeder, 2000) y del análisis global de la expresión de proteínas (proteomas) (Jungblut *et al.*, 1999). Por ejemplo, la expresión génica en respuesta al antibiótico isoniazida, ha sido monitoreada usando el microarreglo de DNA de *M. tuberculosis*, construido con la representación del 97% de los frentes de lectura abiertos predichos. Se observó que la isoniazida induce la expresión de varios genes entre los que se encuentran, un grupo de genes que codifican componentes del complejo sintasa de ácidos grasos tipo II y denotados como Rv2243-47 por Cole *et al.*, (1998); la inducción del gen *fbpC* que codifica el antígeno 85C implicado en la maduración del micolato, así como la inducción de otros genes potencialmente implicados en el metabolismo de los ácidos micólicos, cuyo papel en este proceso no había sido reconocido anteriormente (Wilson *et al.*, 1999). El conocimiento sobre la biología de *M. tuberculosis* generado usando estas novedosas tecnologías, constituirá la base para la construcción de mutantes por ingeniería genética, y su comparación con cepas silvestres, abordando así los estudios sobre la función de genes implicados en procesos de infección y vías metabólicas específicas. Esto tendrá como fin por un lado el generar cepas atenuadas que puedan ser utilizadas como vacunas y por otra parte, identificar los mecanismos

moleculares que emplea este patógeno durante el proceso de invasión y sobrevivencia intracelular, con la perspectiva de generar nuevos fármacos que inhiban estos procesos.

Patogénesis de *M. tuberculosis*.

La infección con *M. tuberculosis* se establece después de la inhalación de unos cuantos bacilos que alcanzan los espacios alveolares de los pulmones (Smith *et al.*, 1965), donde son ingeridos por los macrófagos alveolares. Los mecanismos moleculares implicados en la entrada de la micobacteria al macrófago han sido pobremente caracterizados. Se ha propuesto que la entrada de la micobacteria a los macrófagos puede ser mediada por los receptores del complemento (Schlesinger *et al.*, 1990) o por el receptor de manosa (Schlesinger, 1993), así como por vías que no están acopladas a la activación de los mecanismos antimicrobianos de los macrófagos, tales como la producción de intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno. También se ha propuesto que la micobacteria por su alta capacidad de unir colesterol, puede promover su entrada al macrófago, interaccionando con los dominios de la membrana celular ricos en colesterol. El colesterol también media la asociación de la proteína denominada TACO (del inglés “tryptophane aspartate-containing coat protein”) con el fagosoma. Esta proteína es activamente reclutada y retenida por los fagosomas que contienen los bacilos de la micobacteria, permitiendo su sobrevivencia, debido a que esta proteína evita la fusión del fagosoma con los lisosomas (Gatfield y Pieters, 2000). *M. tuberculosis* también ha desarrollado otros mecanismos para sobrevivir dentro del macrófago. Se ha reportado que los fagosomas que contienen los bacilos de *M. tuberculosis* no adquieren las subunidades de la ATPasa de protones vacuolar, evitando así la acidificación del fagosoma (Sturgill-Koszycki *et al.*, 1994; Xu *et al.*, 1994). También se ha observado que las vacuolas fagocíticas que contienen bacilos de *M. tuberculosis*, presentan una alteración en la

maduración del fagosoma, deteniéndose en un estado temprano caracterizado por la acumulación de la proteína Rab5 (implicada en la endocitosis y el control de la fusión con endosomas tempranos) y exclusión de la proteína Rab7 (involucrada en la regulación del tráfico de membranas endosomales tardías); impidiendo así la fusión de la vacuola fagocítica con el lisosoma (Via *et al.*, 1997).

La inhibición de los mecanismos bactericidas del macrófago por *M. tuberculosis*, le permite a este patógeno reproducirse dentro del macrófago hasta destruirlo. Los bacilos liberados son fagocitados por los monocitos no activados o macrófagos que han emigrado desde la sangre hasta el alveolo infectado. La replicación intracelular de los bacilos y la muerte de las células del huésped continúa por 3 a 5 semanas mientras se desarrolla la respuesta humoral y celular contra la TB (Dannenberg 1991). Los linfocitos y macrófagos entran hasta el sitio de la infección y sí llegan a ser activados controlan la replicación de los bacilos; pero sí la inmunidad no es capaz de limitar el crecimiento de la bacteria, la enfermedad progresa a la forma clínica. La infección se disemina a través de los canales linfáticos hasta los nódulos linfáticos regionales y posteriormente los bacilos llegan a la sangre donde son transportados a través del torrente sanguíneo como parásitos intracelulares de macrófagos y monocitos.

En el 95% de los casos, la enfermedad corresponde a tuberculosis pulmonar y el 5% restante corresponde a formas extrapulmonares, afectando cualquier parte del cuerpo, incluyendo el hígado y los riñones, el estómago y los intestinos, los huesos, el cerebro y la médula espinal. En niños y personas inmunocomprometidas, la TB extrapulmonar es más frecuente (Highleyman 1998). Por otra parte, si el sistema inmune ha sido capaz de detener la infección por *M. tuberculosis*, la enfermedad se resuelve y la inmunidad mantiene a los bacilos controlados, en un estado inactivo, los cuales pueden reactivarse varios años después sí el sistema inmune es inmunocomprometido.

Principales antígenos de *M. tuberculosis*.

Una de las áreas de mayor interés en el mundo, ha sido el estudio de los antígenos de *M. tuberculosis*, su aislamiento y caracterización, con la finalidad de entender los mecanismos moleculares implicados en la respuesta inmune contra la TB y por otra parte, encontrar proteínas candidatas para usarse como subunidades de vacunas y como reactivos de pruebas de inmunodiagnóstico.

Entre los principales componentes micobacterianos inmunogénicos reportados que han sido encontrados hasta la fecha en el sobrenadante del cultivo, se encuentran las proteínas de choque térmico DnaK, GroEL y GroES de 71, 65 y 12 kDa (Young y Garbe, 1991a), el complejo rico en prolina de 45-47 kDa (Espitia y Mancilla, 1989; Romain *et al.*, 1993; Espitia *et al.*, 1995), el complejo antigénico 85 formado por proteínas de 30-32 kDa y denominadas AG85A, AG85B y AG85C (Wiker y Harboe, 1992); las lipoglicoproteínas de 38 kDa (PstS-1) y de 19 kDa (Espitia *et al.*, 1989; Young y Garbe, 1991b); la proteína MPT64 de 23 kDa (Kamath *et al.*, 1999) y ESAT-6 de 6 kDa (Harboe *et al.*, 1996).

Recientemente, algunas de estas proteínas han sido valoradas como componentes de vacunas de DNA contra la TB en modelos experimentales, mostrando que la protección que confieren puede ser similar a la conferida por la vacunación con BCG. Entre estos se encuentran la proteína de 65 kDa de choque térmico (Tascon *et al.*, 1996), los antígenos 85A (Tanghe *et al.*, 2001), 85B y 85C (Lozes *et al.*, 1997), la proteína PstS-1 de 38 kDa (Zhu *et al.*, 1997; Fonseca *et al.*, 2001) y la proteína de 6 kDa ESAT-6 (Kamath *et al.*, 1999).

Los antígenos MPT83/MPB83 y MPT70/MPB70.

Entre los antígenos ampliamente estudiados de *M. tuberculosis* están las proteínas homólogas MPT83 y MPT70, las cuales se ha observado que en el ratón son altamente

inmunogénicas durante la infección con *M. tuberculosis* viva (Hewinson, *et al.*, 1996). Los antígenos homólogos MPB83 y MPB70 de *M. bovis* BCG, fueron identificados primero en *M. bovis* BCG Tokyo que expresa abundantemente estos antígenos, lo que permitió purificarlos y analizar sus propiedades inmunológicas (Nagai *et al.*, 1981; Harboe y Nagai, 1984; Fifis *et al.*, 1989; Harboe *et al.*, 1995).

Los genes que codifican estas proteínas MPT83/MPB83 y MPT70/MPB70 (*mpt83/mpb83* y *mpt70/mpb70* respectivamente) de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG Tokio y Pasteur, han sido aislados y secuenciados (Matsuo *et al.*, 1995; Matsumoto *et al.*, 1995; Matsuo *et al.*, 1996; Hewinson *et al.*, 1996). El análisis de las secuencias de las proteínas expresadas por estos genes indicó que no existen diferencias entre las proteínas MPT83 y MPB83, ni tampoco entre las proteínas MPT70 y MPB70. Este análisis también permitió establecer que las proteínas MPT83/MPB83 y MPT70/MPB70 contienen un péptido señal, el cual es escindido después de promover la exportación de la proteína hacia el exterior, a través de la membrana celular.

Las proteínas MPT83 y MPT70 o MPB83 y MPB70, presentan un 63% de homología y las proteínas MPT83/MPB83, a diferencia de las MPT70/MPB70, contienen un inserto único de 35 aminoácidos en el dominio amino-terminal (N-terminal) y presentan un motivo consenso típico de lipoproteína, localizado del aminoácido 22 al 26 (LAGCS). Estas observaciones indican que estas proteínas son lipoproteínas ancladas en la pared celular, por medio de un enlace tioéster establecido entre la cisteína de la región N-terminal y una molécula de ácido graso de la membrana celular, lo cual explica porque estos antígenos son localizados en el sonicated de la pastilla celular (Hewinson *et al.*, 1996). La extracción de la proteína MPB83 en una fracción soluble en Tritón X-114 confirmó la naturaleza lipoprotéica de este antígeno (Harboe *et al.*, 1998), junto con la eliminación de la cisteína del motivo consenso, por mutagénesis sitio dirigida (Vosloo *et al.*, 1997).

Además las proteínas MPT83/MPB83 contienen un motivo señal para O-glicosilación (Hewinson *et al.*, 1996) indicando que estas proteínas probablemente son glicosiladas. Por otro lado, las proteínas MPT83 y MPB83 difieren únicamente en que para la MPT83 se ha reportado una forma de 25 kDa asociada al bacilo (Hewinson *et al.*, 1996), mientras que para la MPB83 se han reportado dos formas, una de 26 kDa asociada también a la superficie de la célula y una forma de 23 kDa secretada al medio de cultivo (no asociada a lípidos), pero ambas formas están glicosiladas (Harboe *et al.*, 1995; Harboe *et al.*, 1998).

Las proteínas MPT70/MPB70 presentan una secuencia señal de 30 aminoácidos que promueve su secreción al exterior de la célula, localizándose en el filtrado del cultivo bacteriano como una forma de 22 kDa (Hewinson *et al.*, 1996). A diferencia de las proteínas MPT83/MPB83, las proteínas MPB70/MPB70 no presenta el motivo de O-glicosilación ni el motivo de lipoproteína.

Expresión de las proteínas MPT83 y MPT70.

El estudio de estas proteínas ha generado una mayor atención, debido a que la MPT83 y MPT70 son expresadas escasamente por *M. tuberculosis* tanto *in vitro* como *in vivo* (Harboe y Nagai, 1984; Hewinson *et al.*, 1996), mientras que en *M. bovis* las proteínas homólogas MPB83 y MPB70 son expresadas abundantemente (Harboe y Nagai, 1984; Wiker *et al.*, 1998) y en diversas subcepas avirulentas de *M. bovis* BCG, la expresión de estas proteínas varía, siendo su expresión alta en subcepas de *M. bovis* BCG Brazil, Moreau, Russia, Moscow, Sweden y Tokyo y expresadas a bajos niveles por subcepas de *M. bovis* BCG Pasteur, Copenhagen, Tice y Glaxo (Harboe y Nagai, 1984; Matsuo *et al.*, 1995; Hewinson *et al.*, 1996). Si la sobre-expresión de estas proteínas está relacionada con

la virulencia de *M. bovis*, o con el nivel de protección conferido contra la TB por ambos grupos de subcepas de BCG, aún no se ha dilucidado.

La MPB70 constituye uno de los principales componentes secretados en el filtrado de cultivo de BCG Tokio, constituyendo el 10% de las proteínas secretadas totales, mientras que su expresión en *M. tuberculosis* es menor al 1% del nivel observado para BCG Tokio (Harboe y Nagai, 1984). Este mismo patrón de expresión también se ha observado para la proteína MPB83 (Hewinson *et al.*, 1996), constituyendo así un primer indicio del enlace de la expresión de estos genes tanto en *M. tuberculosis* como en *M. bovis* y subcepas avirulentas de *M. bovis* BCG.

Las secuencias de DNA del *mpb70*, incluyendo la región reguladora propuesta por Matsuo *et al.*, (1995) entre las subcepas de *M. bovis* BCG Tokio y Pasteur con alta y baja producción de estas proteínas respectivamente y de *M. tuberculosis* H37Rv (Matsumoto *et al.*, 1995), resultaron idénticas entre sí, sugiriendo que este gen *mpt70/mpb70* podría estar formando parte de un operón junto con el *mpt83/mpb83*, el cual resultó estar localizado a 2.4 kb arriba del *mpt70/mpb70* en *M. tuberculosis/M. bovis* BCG Tokio, además de ser estos genes transcritos en la misma dirección (Hewinson *et al.*, 1996).

La diferencia en la expresión de estas proteínas homólogas entre *M. tuberculosis* y *M. bovis*, ha generado el interés en el estudio de la expresión y regulación de los genes que codifican estas proteínas en una y otra bacteria, para dilucidar los probables mecanismos responsables de la expresión diferencial de estos genes.

En este trabajo, durante el aislamiento y clonación del locus *mpt83-mpt70* de *M. tuberculosis*, en la región intergénica entre estos genes, fue identificado un frente de lectura abierto que codifica para una proteína integral de membrana probable con homología con proteínas implicadas en la biogénesis del citocromo c como DipZ y CcdA de varias bacterias (Crooke y Cole, 1995; Page *et al.*, 1997, Schiött *et al.*, 1997). La identificación de

esta secuencia génica, plantea la interrogante de si la expresión de este gen también está relacionada con la expresión del *mpt83* y el *mpt70*, y si los tres genes están organizados formando un operón.

JUSTIFICACION

El estudio de la expresión del *locus* de *M. tuberculosis* que contiene los genes *mpt83* y *mpt70*, nos puede ayudar a dilucidar los mecanismos involucrados en la expresión diferencial de los antígenos codificados por estos genes y por otra parte, la generación de este conocimiento nos podría permitir establecer como opera la regulación de este *locus*.

Con el estudio de la expresión de estos genes se podrían determinar las diferencias en la regulación a nivel molecular entre *M. tuberculosis* y de *M. bovis* y las subcepas BCG que expresan altos niveles de estas proteínas, y analizar si estas diferencias repercuten en las interacciones de *M. tuberculosis* y *M. bovis* con el huésped.

Existen evidencias indirectas de que la expresión de los genes *mpt83* y *mpt70* se incrementa cuando *M. tuberculosis* esta infectando ratones (Hewinson *et al.*, 1996). La caracterización de estos genes así como el estudio de su regulación, expresión y función, será de utilidad para dilucidar el papel que puedan jugar éstos en la virulencia de la micobacteria. Se ha reportado que las proteínas codificadas por estos genes podrían actuar como moléculas de adhesión celular y desempeñar un papel en la invasión celular por la micobacteria (Matsumoto *et al.*, 1995; Ulstrup *et al.*, 1995). La comprensión de la probable función específica de estos genes en la virulencia de la micobacteria, puede permitir el desarrollo de estrategias basadas en fármacos u otros mecanismos enfocados en el bloqueo de su función.

Los genes *mpt83/mpb83* y *mpt70/mpb70* de *M. tuberculosis* y *M. bovis* respectivamente, codifican proteínas antigénicas inmunodominantes. Debido a esta

esta secuencia génica, plantea la interrogante de si la expresión de este gen también está relacionada con la expresión del *mpt83* y el *mpt70*, y si los tres genes están organizados formando un operón.

JUSTIFICACION

El estudio de la expresión del *locus* de *M. tuberculosis* que contiene los genes *mpt83* y *mpt70*, nos puede ayudar a dilucidar los mecanismos involucrados en la expresión diferencial de los antígenos codificados por estos genes y por otra parte, la generación de este conocimiento nos podría permitir establecer como opera la regulación de este *locus*.

Con el estudio de la expresión de estos genes se podrían determinar las diferencias en la regulación a nivel molecular entre *M. tuberculosis* y de *M. bovis* y las subcepas BCG que expresan altos niveles de estas proteínas, y analizar si estas diferencias repercuten en las interacciones de *M. tuberculosis* y *M. bovis* con el huésped.

Existen evidencias indirectas de que la expresión de los genes *mpt83* y *mpt70* se incrementa cuando *M. tuberculosis* esta infectando ratones (Hewinson *et al.*, 1996). La caracterización de estos genes así como el estudio de su regulación, expresión y función, será de utilidad para dilucidar el papel que puedan jugar éstos en la virulencia de la micobacteria. Se ha reportado que las proteínas codificadas por estos genes podrían actuar como moléculas de adhesión celular y desempeñar un papel en la invasión celular por la micobacteria (Matsumoto *et al.*, 1995; Ulstrup *et al.*, 1995). La comprensión de la probable función específica de estos genes en la virulencia de la micobacteria, puede permitir el desarrollo de estrategias basadas en fármacos u otros mecanismos enfocados en el bloqueo de su función.

Los genes *mpt83/mpb83* y *mpt70/mpb70* de *M. tuberculosis* y *M. bovis* respectivamente, codifican proteínas antigénicas inmunodominantes. Debido a esta

características, estas proteínas pueden ser de gran utilidad en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis. En un futuro, el desarrollo y aplicación de una nueva vacuna BCG albergando mutaciones que bloqueen la expresión de los genes *mpb83* y *mpb70*, podría hacer factible el uso de la expresión recombinante de estos genes en el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico de la tuberculosis, en poblaciones vacunadas con esta nueva vacuna BCG.

Por otra parte, el papel de las proteínas codificadas por el *mpt83/mpb83* y *mpt70/mpb70* en la inmunidad protectora contra la tuberculosis, aún no se ha establecido claramente. Existen reportes de que la proteína MPB70 es un blanco importante de la respuesta humoral y celular (Fifis *et al.*, 1989). Por lo que, el estudio de la expresión de estos antígenos también es importante desde el punto de vista de la interacción de la micobacteria con el sistema inmune del huésped.

Por lo expuesto anteriormente consideramos que es esencial el inicio del estudio de la expresión del *locus mpt83-mpt70* de *M. tuberculosis*.

OBJETIVOS

1.- Caracterizar molecularmente la secuencia genética identificada entre el *mpt83* y el *mpt70* de *M. tuberculosis*.

2.- Iniciar el estudio de la expresión en *M. smegmatis* del *locus* de *M. tuberculosis* conteniendo los genes *mpt83* y *mpt70*, y del gen identificado en medio de éstos, por medio de la fusión de diferentes regiones de este *locus* con el gen estructural *lacZ* de *E. coli* y por medio de reacciones de RT-PCR (de las siglas en inglés "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction").

características, estas proteínas pueden ser de gran utilidad en el inmunodiagnóstico de la tuberculosis. En un futuro, el desarrollo y aplicación de una nueva vacuna BCG albergando mutaciones que bloqueen la expresión de los genes *mpb83* y *mpb70*, podría hacer factible el uso de la expresión recombinante de estos genes en el desarrollo de métodos de inmunodiagnóstico de la tuberculosis, en poblaciones vacunadas con esta nueva vacuna BCG.

Por otra parte, el papel de las proteínas codificadas por el *mpt83/mpb83* y *mpt70/mpb70* en la inmunidad protectora contra la tuberculosis, aún no se ha establecido claramente. Existen reportes de que la proteína MPB70 es un blanco importante de la respuesta humoral y celular (Fifis *et al.*, 1989). Por lo que, el estudio de la expresión de estos antígenos también es importante desde el punto de vista de la interacción de la micobacteria con el sistema inmune del huésped.

Por lo expuesto anteriormente consideramos que es esencial el inicio del estudio de la expresión del *locus mpt83-mpt70* de *M. tuberculosis*.

OBJETIVOS

1.- Caracterizar molecularmente la secuencia genética identificada entre el *mpt83* y el *mpt70* de *M. tuberculosis*.

2.- Iniciar el estudio de la expresión en *M. smegmatis* del *locus* de *M. tuberculosis* conteniendo los genes *mpt83* y *mpt70*, y del gen identificado en medio de éstos, por medio de la fusión de diferentes regiones de este *locus* con el gen estructural *lacZ* de *E. coli* y por medio de reacciones de RT-PCR (de las siglas en inglés "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction").

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y plásmidos.

Las cepas de *E. coli* DH5 α IQ (Gibco BRL), XL1-Blue MRF' (Stratagene), HB101 (Gibco BRL) y MC4100 (Silhavy *et al.*, 1984) fueron usadas como los hospederos para los plásmidos vectores pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), pBK-CMV (Stratagene), pQ31 y pQ32 (Qiagen), pMC1871 (Shaphira *et al.*, 1983), pMV261 (Stover *et al.*, 1991) y pJEM15 (Timm *et al.*, 1994), así como para sus derivados construidos en este trabajo (tabla 1).

La cepa de *E. coli* JM109 se empleó para la replicación del bacteriófago filamentoso M13mp18 y las construcciones derivadas de éste.

Los cultivos de *E. coli* fueron crecidos a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) y a 30°C cuando los cultivos se indujeron para expresar proteínas recombinantes. Cuando se requirió, los medios de cultivo fueron suplementados con alguno de los siguientes antibióticos para mantener los plásmidos: ampicilina a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ o kanamicina a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Las cepas micobacterianas usadas en este trabajo fueron: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Glaxo, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium phlei*; las cuales fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas fueron crecidas en medio Lowestein-Jensen para la extracción del DNA.

MATERIALES Y METODOS

Cepas bacterianas, condiciones de crecimiento y plásmidos.

Las cepas de *E. coli* DH5 α IQ (Gibco BRL), XL1-Blue MRF ' (Stratagene), HB101 (Gibco BRL) y MC4100 (Silhavy *et al.*, 1984) fueron usadas como los hospederos para los plásmidos vectores pUC18 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985), pBK-CMV (Stratagene), pQ31 y pQ32 (Qiagen), pMC1871 (Shaphira *et al.*, 1983), pMV261 (Stover *et al.*, 1991) y pJEM15 (Timm *et al.*, 1994), así como para sus derivados construidos en este trabajo (tabla 1).

La cepa de *E. coli* JM109 se empleó para la replicación del bacteriófago filamentoso M13mp18 y las construcciones derivadas de éste.

Los cultivos de *E. coli* fueron crecidos a 37°C en medio Luria-Bertani (LB) y a 30°C cuando los cultivos se indujeron para expresar proteínas recombinantes. Cuando se requirió, los medios de cultivo fueron suplementados con alguno de los siguientes antibióticos para mantener los plásmidos: ampicilina a 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ o kanamicina a 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Las cepas micobacterianas usadas en este trabajo fueron: *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG Glaxo, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* y *Mycobacterium phlei*; las cuales fueron obtenidas del American Type Culture Collection (ATCC). Las cepas fueron crecidas en medio Lowestein-Jensen para la extracción del DNA.

Tabla 1. Plásmidos construidos en este trabajo.

Plásmido	Características	Derivado	Resistencia	Figura	Referencia
pJD951	C,Rv2874 <i>mpi70</i> Rv2876	pUC18	Ap	1	Construido en este trabajo
pJD961	C, <i>mpi83</i> Rv2874 <i>mpi70</i>	pUC18	Ap	1	Construido en este trabajo
pJD201	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i> Rv2874N, <i>mpi70</i>	pBK-CMV	Km	1	Construido en este trabajo
pJD964	C, <i>mpi83</i> Rv2874 <i>mpi70</i>	pMV261	Km	2	Construido en este trabajo
pJD966	C, <i>mpi83</i> Rv2874 <i>mpi70</i>	pMV261	Km	2	Construido en este trabajo
pJD9641	C,Rv2874 <i>mpi70</i>	pJD964	Km	3	Construido en este trabajo
pJD965	C, <i>mpi83</i> Rv2874 <i>mpi70</i>	pQE-32	Ap	3	Construido en este trabajo
pJD9651	C,Rv2874 <i>mpi70</i>	pJD965	Ap	3	Construido en este trabajo
pJD974	C,Rv2874 <i>mpi70</i>	pQE-32	Ap	4	Construido en este trabajo
pJD953	C,Rv2874 <i>mpi70</i> Rv2876	pQE-31	Ap	4	Construido en este trabajo
pJD-MC12	C, <i>mpi83</i> N,Rv2874- <i>lacZ</i>	pMC1871	Tc	5a	Construido en este trabajo
pJD9712	C, <i>mpi83</i> N,Rv2874- <i>lacZ</i>	pMV261	Km	5a	Construido en este trabajo
pJD-MC71	N,Rv2874- <i>lacZ</i>	pMC1871	Tc	5b	Construido en este trabajo
pJD9771	N,Rv2874- <i>lacZ</i>	pMV261	Km	5b	Construido en este trabajo
pJD-MC13	PromotorRv2874- <i>lacZ</i>	pMC1871	Tc	5c	Construido en este trabajo
pJD9713	PromotorRv2874- <i>lacZ</i>	pMV261	Km	5c	Construido en este trabajo
pJD9714	C, <i>mpi83</i> PromotorRv2874- <i>lacZ</i>	pJD9713	Km	5d	Construido en este trabajo
pJD9715	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i> PromotorRv2874- <i>lacZ</i>	pJD9713	Km	5e	Construido en este trabajo
pJD9710	<i>lacZ</i>	pMV261	Km	5f	Construido en este trabajo
pJD9711	Promotor <i>hsp60-lacZ</i>	pMV261	Km	5f	Construido en este trabajo
pJD2011	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i> N,Rv2874	pJD201	Km	6a	Construido en este trabajo
pJD20A	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i> N,Rv2874 <i>lacZ</i>	pJEM15	Km	6a	Construido en este trabajo
pJD20B	PromotorRv2874N,Rv2874 <i>lacZ</i>	pJD20A	Km	6a	Construido en este trabajo
pJD2012	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i>	pJD201	Km	6b	Construido en este trabajo
pJD20C	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83lacZ</i>	pJEM15	Km	6b	Construido en este trabajo
pJD20D	C,Rv2874N, <i>mpi70lacZ</i>	pJEM15	Km	6c	Construido en este trabajo
pJD20E	N,Rv2870Rv2871Rv2872 <i>mpi83</i> Rv2874N, <i>mpi70lacZ</i>	pJEM15	Km	6c	Construido en este trabajo
pJD20F	C, <i>mpi83</i> Rv2874N, <i>mpi70lacZ</i>	pJEM15	Km	6d	Construido en este trabajo
pJD20I	N,Rv2870C, <i>mpi83lacZ</i>	pJD20C	Km	7a	Construido en este trabajo
pJD20G	C,Rv2872 <i>mpi83lacZ</i>	pJD20C	Km	7a	Construido en este trabajo

pJD20H	<i>C₁mp183lacZ</i>	pJD20C	Km	7a	Construido en este trabajo
pJD-BK21	<i>N₁Rv2870Rv2871Rv2872mp183</i>				
	<i>N₁Rv2874invN₁mp170C₁Rv2874</i>	pJD201	Km	7b	Construido en este trabajo
pJD21D	<i>N₁Rv2870Rv2871Rv2872</i>				
	<i>mp183N₁Rv2874invN₁mp170</i>				
	<i>C₁Rv2874lacZ</i>	pJEM15	Km	7b	Construido en este trabajo
pJD21E	<i>N₁Rv2870Rv2871Rv2872 mp183</i>				
	<i>N₁Rv2874lacZ</i>	pJD20E	Km	7c	Construido en este trabajo
pJD21I	<i>C₁Rv2871Rv2872 mp183</i>				
	<i>N₁Rv2874lacZ</i>	pJD2011	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21J	<i>C₁mp183N₁Rv2874lacZ</i>	pJD2011	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21K	<i>C₁mp183N₁Rv2874lacZ</i>	pJD2011	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21F	<i>C₁Rv2871Rv2872mp183lacZ</i>	pJD2012	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21G	<i>C₁Rv2871Rv2872mp183lacZ</i>	pJD2012	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21H	<i>C₁Rv2872mp183lacZ</i>	pJD2012	Km	7d	Construido en este trabajo
pJD21A	PromotorRv2874lacZ	pJEM15	Km	8b	Construido en este trabajo
pJD21B	Promotor-mutadoRv2874lacZ	pJEM15	Km	8b	Construido en este trabajo
pJD21C	Δ PromotorRv2874lacZ	pJEM15	Km	8b	Construido en este trabajo
pJD953.1	pJD953 Δ PstI	pJD953	Ap	14	Construido en este trabajo
pJD953.2	pJD953 Δ SaI	pJD953	Ap	14	Construido en este trabajo
pJD953.3	pJD953 Δ NotI	pJD953	Ap	14	Construido en este trabajo
pJD953.4	pJD953 Δ SmaI	pJD953	Ap	14	Construido en este trabajo

Mycobacterium smegmatis mc²155 fue usada como la cepa huésped para los plásmidos pMV261 y pJEM15, así como sus derivados recombinantes.

Técnicas de DNA recombinante.

Las endonucleasas de restricción y enzimas modificadoras de DNA fueron usadas de acuerdo a las instrucciones de la compañía proveedora (Boehringer, actualmente Roche, New England Biolabs y Stratagene). Las manipulaciones genéticas fueron realizadas como se describe en Sambrook *et al.*, 1989. La extracción de plásmido a pequeña escala se hizo por la técnica de lisis alcalina con SDS (Sulfato Dodecil de Sodio) (Sambrook *et al.*, 1989). La extracción de DNA a mayor escala se efectuó utilizando columnas midi y maxi de purificación de Qiagen.

Transformación genética de los cultivos bacterianos.

Las cepas de *E. coli* y *Mycobacterium smegmatis* mc²155 fueron transformadas por electroporación con los plásmidos y construcciones obtenidas en el presente trabajo. Las células competentes se prepararon como se describe a continuación.

Preparación de células competentes de *E. coli*. Las cepas de *E. coli* fueron cultivadas en LB hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5 a 1. El cultivo se incubó por 30 minutos en hielo y se obtuvo la pastilla celular por centrifugación a 5 K rpm por 20 minutos a 4°C. Esta fue lavada utilizando un volumen y medio de agua estéril fría con respecto al volumen original del cultivo. La pastilla celular se recuperó nuevamente por centrifugación y se lavó con 1/50 del volumen original del cultivo con glicerol al 10% estéril. La pastilla celular obtenida fue resuspendida en 1/1000 del volumen original del

cultivo con glicerol al 10% y alícuotas de 40 μ l de la suspensión celular fueron almacenadas en tubos eppendorf de 0.5 ml. Estos tubos fueron colocados inmediatamente en hielo seco y almacenados a -70°C hasta su uso.

Para llevar a cabo la transformación bacteriana, se mezclaron 40 μ l de la suspensión celular con 2 a 5 μ l de la reacción de ligación conteniendo de 10 a 20 ng de DNA o 10 ng del plásmido recombinante. La mezcla fue colocada en celdas de electroporación de 0.2 cm y sometida a un pulso eléctrico determinado por los siguientes parámetros: 1.4 Kv, 1000 Ohms de resistencia y 25 μ F en un electroporador BTX modelo ECM600. Las células fueron recobradas en 1 ml de medio SOC (Sambrook *et al.*, 1989) e incubadas a 37°C en agitación por una hora y luego sembradas sobre placas de LB agar conteniendo el antibiótico respectivo, para mantener al plásmido, posteriormente se incubaron de 10 a 14 horas a 37°C .

Preparación de células competentes de *Mycobacterium smegmatis* mc²155.

M. smegmatis mc²155 fue crecida a 37°C en el medio 7H9 suplementado con 0.5% de glicerol, 2% de glucosa y 0.05% Tween 80. Las células para electroporación fueron procesadas de la misma forma como se describió para *E. coli*, con la diferencia de que la pastilla celular fue resuspendida al final con glicerol al 10% en 1/50 del volumen original del cultivo y alícuotas de 200 μ l de la suspensión celular, fueron colocadas en tubos eppendorf de a 0.5 ml y guardadas a -70°C hasta su uso.

La transformación de *Mycobacterium smegmatis* mc²155 se llevó a cabo por electroporación, 1 a 2 μ g de DNA del plásmido recombinante fueron mezclados con 200 μ l de suspensión celular. La mezcla fue colocada en una celda de 0.2 cm, a la cual se le aplicó un pulso eléctrico con los mismos parámetros utilizados para *E. coli*. Las

células electroporadas fueron recuperadas en 1 ml de medio SOC por 3 horas, después fueron sembradas sobre placas de agar 7H11 conteniendo kanamicina a $50 \mu\text{g ml}^{-1}$ y se incubaron a 37°C por 3 a 4 días.

Aislamiento y clonación de la región del DNA conteniendo los genes *mpt83* y *mpt70* de *M. tuberculosis*.

Un fragmento de 0.7 kb conteniendo la secuencia localizada inmediatamente arriba del gen *mpt70*, fue usado como detector homólogo en la búsqueda de los genes *mpt83* y *mpt70*, en un banco de *M. tuberculosis* construido en el vector cósmido Tropist3 (De Smet *et al.*, 1993). Este fragmento de DNA fue marcado radiactivamente con $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{-dCTP}$ (Amersham) usando el estuche de Amersham para marcar fragmentos de DNA sintetizados a partir de oligonucleótidos iniciadores al azar.

La hibridación de las clonas recombinantes con el detector se hizo por medio de la técnica de hibridación en colonia. Brevemente, 5×10^3 colonias del banco genómico fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa, colocando las membranas encima de las placas conteniendo las colonias bacterianas por 10 minutos y después removiendo la membrana de la placa. Las membranas con las colonias transferidas fueron colocadas sobre papeles filtro humedecidos con las siguientes soluciones: 10% SDS por 5 minutos, solución desnaturalizante (NaOH 0.5N, NaCl 1.5M) 10 minutos, solución neutralizante (Tris-HCl 0.5M pH 7.5, NaCl 1.5M) 10 minutos y en 2x SSC (20x SSC es 3 M NaCl y 0.3M $\text{Na}_3\text{citrato}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ pH 7) un minuto. Posteriormente, el DNA fue fijado a las membranas con luz ultravioleta.

La pre-hibridación fue realizada a 42°C en 6x SSC, Tris-HCl 50 mM pH 7.5, reactivo de bloqueo 1x (Roche) y 50% de formamida por 2 horas. La hibridación se llevó a cabo por 24 horas con una solución preparada igual a la de pre-hibridación pero adicionando además, 0.5% de SDS y el detector marcado radioactivamente y desnaturalizado por ebullición durante 10 minutos. Después, las membranas fueron lavadas dos veces con una solución conteniendo 2x SSC y 0.1% SDS por 15 minutos cada uno y dos lavados con 2x SSC por 15 minutos cada uno. Finalmente, las membranas fueron expuestas a películas fotográficas Kodak X-OMAT XR por 10 horas a -70°C para posteriormente ser reveladas.

Tres colonias conteniendo clonas cósmido recombinantes dieron señal positiva de hibridación con el detector, éstas fueron extraídas con una pipeta pasteur de las placas de agar LB y crecidas en 50 ml de LB con 25 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina. El DNA de los cósmidos recombinantes fue extraído de los cultivos por medio del método de lisis alcalina para obtención de plásmidos (Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA de los tres cósmidos recombinantes fue analizado por patrón de restricción con diferentes endonucleasas y los fragmentos generados fueron separados por electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, transferidos a membranas de nitrocelulosa e hibridados con el detector marcado radiactivamente y descrito anteriormente. El análisis del patrón de restricción y de hibridación tipo Southern fue similar entre los tres cósmidos recombinantes, por lo que uno de éstos (G1TB-4) se eligió al azar y fue digerido posteriormente con otras enzimas de restricción e hibridado con el detector.

Un fragmento de 2.2 kb *Sma*I dio señal positiva de hibridación con el detector y fue subclonado en pUC18 (pJD951). Las subclonaciones posteriores se llevaron a cabo

en M13mp18. La secuencia del DNA correspondió al gen *mpt70* flanqueado en la dirección 5' por un frente de lectura abierto incompleto y en dirección 3' por un frente de lectura abierto completo, presentando estos genes la misma orientación transcripcional que el *mpt70* (figura 1).

Para clonar completo el frente de lectura abierto localizado entre el *mpt83* y el *mpt70*, el patrón de restricción del cósmido recombinante y del fragmento *StuI* de 2.2 kb secuenciado fueron analizados. La secuencia nucleotídica del fragmento *StuI* de 2.2 kb, mostró contener un sitio *SaII* a 1.55 kb del extremo *StuI* conteniendo el frente de lectura abierto truncado. Por otra parte, el análisis de restricción del cósmido recombinante G1TB-4, mostró que un fragmento *SaII* de 3.5 kb con una digestión doble *StuI-SaII*, originaba dos fragmentos *StuI-SaII* de 1.95 kb y 1.55 kb. Este análisis del patrón de restricción indicó que el fragmento *StuI* de 2.2 kb y el fragmento *SaII* de 3.5 kb contenían una región en común: el fragmento *StuI-SaII* de 1.55 kb y por lo tanto, el fragmento *StuI* de 2.2 kb subclonado y secuenciado, estaba sobrelapado con el fragmento *SaII* de 3.5 kb (figura 1).

Después, el fragmento *SaII* de 3.5 kb fue subclonado en el pUC18 para generar el pJD961 y la secuencia nucleotídica de este fragmento fue determinada y reportada al banco de secuencias genómicas junto con la secuencia del frente de lectura abierto localizado hacia abajo del *mpt70*, previamente determinada en la secuenciación del fragmento *StuI* de 2.2 kb (número de acceso AF189006).

El análisis de secuencia de este fragmento *SaII* de 3.5 kb mostró contener al gen *mpt83* truncado, seguido por el frente de lectura abierto completo arriba del *mpt70* (designado posteriormente como el gen Rv2874 en el proyecto de secuenciación del

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

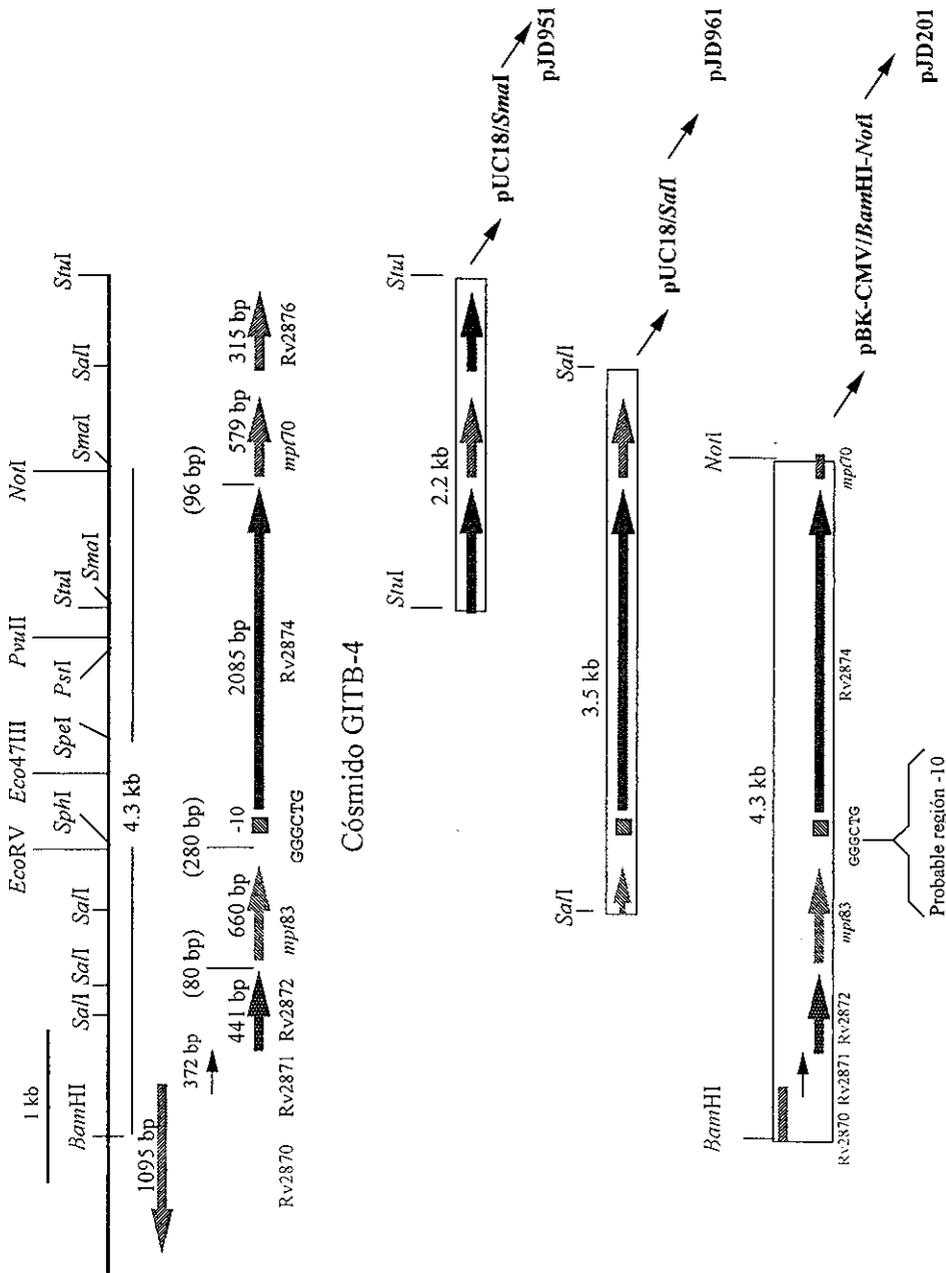


Figura 1. Esquema de la región cromosomal de *M. tuberculosis* conteniendo el locus *mpt83-mpt70*. Los fragmentos de DNA *StuI* de 2.2 kb, *SalI* de 3.5 kb y *BamHI-NotI* de 4.3 kb fueron obtenidos del cósmido GITB-4, el cual fue aislado de una genoteca genómica de *M. tuberculosis* H37Rv. Estos fragmentos de DNA fueron subclonados en los vectores pUC18 y pBK-CMV para obtener los plásmidos recombinantes pJD951, pJD961 y pJD201. La orientación de la transcripción es indicada por las flechas. La probable región promotora -10 del Rv2874 identificada en este trabajo se muestra como un cuadro negro.

genoma de *M. tuberculosis* por Cole *et al.*, 1998), al *mpt70* y 32 codones del frente de lectura abierto localizado hacia abajo del *mpt70*.

Por Southern blot un fragmento *Bam*HI-*Not*I de 4.3 kb obtenido del cósmido recombinante G1TB-4, dio una señal positiva de hibridación con el detector descrito antes y la secuencia nucleotídica de este fragmento indicó que este fragmento contenía desde la región 5' arriba del gen *mpt83* hasta la región que codifica la parte aminoterminal (N-terminal) del gen *mpt70* (figura 1). Este fragmento fue posteriormente clonado en el pBK-CMV para generar el pJD201.

La secuencia nucleotídica de los insertos fue determinada usando el estuche de Termo Sequenasa (USB/Amersham) con oligonucleótidos universales y específicos. El análisis de las secuencias fue llevado a cabo usando el programa "Gene Works" (Laboratorio de Biología Molecular Europeo) y el programa "GCG" (Devereux *et al.*, 1984).

Extracción del DNA cromosomal de micobacterias.

El DNA cromosomal de las diferentes micobacterias fue extraído de acuerdo a van Soolingen (van Soolingen, 1991) con algunas modificaciones. Brevemente, los cultivos micobacterianos crecidos en el medio Lowestein-Jensen, fueron cosechados dentro de una campana de flujo laminar, en tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo 1 ml de 2% azida de sodio. En esta solución fueron incubados a 37°C de 24 a 48 horas para causar la muerte micobacteriana.

Después fueron centrifugados a 14 K rpm por 2 minutos y el sobrenadante fue desechado. Las pastillas micobacterianas fueron resuspendidas en 1 ml de amortiguador

TE (Tris-HCl 10 mM pH 7.5, EDTA 1 mM pH 8) y centrifugadas otra vez como se describió anteriormente. Las pastillas de micobacterias fueron resuspendidas cada una con 400 μ l de amortiguador TE y luego fueron añadidos 40 μ l de lisozima a 20 mg ml^{-1} e incubadas 12 h a 37°C. Después fueron añadidos 75 μ l de una mezcla compuesta por 70 μ l de 10% SDS y 5 μ l de proteinasa K a 10 mg ml^{-1} y los tubos conteniendo la mezcla fueron vortexeados por 15 segundos, luego fueron incubados a 65°C por 10 minutos. A continuación, fueron añadidos 100 μ l de 5M NaCl y 100 μ l de una solución conteniendo 0.04 g de NaCl y 0.1 g de CTAB (N-cetil-N,N,N,-trimetil amonio bromuro) ml^{-1} , previamente incubada a 65°C. Posteriormente, los tubos conteniendo la mezcla fueron vortexeados hasta que su contenido tomó una apariencia blanca y luego fueron incubados a 65°C por 10 minutos.

Finalmente fueron añadidos 700 μ l de cloroformo a cada tubo y éstos fueron agitados manualmente por 5 minutos y luego centrifugados a 14 K rpm por 5 minutos. La fase acuosa obtenida en la parte superior de los tubos fue transferida a tubos limpios y el paso anterior fue repetido hasta que la capa proteica formada en la interfase ya no apareció. El DNA de cada tubo fue precipitado con 0.6 volúmenes (450 μ l) de isopropanol e incubados por 30 minutos a -20°C.

Los botones de DNA fueron obtenidos por centrifugación a 14 K rpm por 15 minutos. Los botones de DNA fueron lavados con 1 ml de etanol al 70% frío e invirtiendo los tubos varias veces y luego éstos fueron centrifugados a 14 K rpm por 10 minutos. El sobrenadante fue removido de los tubos y las trazas de etanol también. Los botones de DNA fueron secados a temperatura ambiente por 10 minutos y luego resuspendidos con 20 μ l de H₂O milliQ estéril y almacenados a -20°C hasta su uso.

Hibridación tipo Southern.

El DNA genómico (2 µg) de *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra, *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG, *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare*, *Mycobacterium phlei*, *Mycobacterium smegmatis* mc²155 y *E. coli* fue digerido con *SalI* y separado por electroforesis en un gel de agarosa al 1%. Posteriormente este DNA fue transferido a una membrana de nitrocelulosa Hybond-N (Amersham) usando los métodos estándares (Sambrook *et al.*, 1989).

El DNA fue fijado a la membrana con luz ultravioleta. El fragmento de DNA *EcoRV-SmaI* de 1.6 kb conteniendo 1.42 kb de la región que codifica la parte N-terminal del frente de lectura abierto (Rv2874) localizado entre los genes *mpt83* y *mpt70*, y 0.19 kb hacia arriba del codón de inicio del Rv2874, fue usado como detector en la hibridación tipo Southern. El detector fue marcado con [α -³³P]-dATP por el método de síntesis o extensión de fragmentos al azar usando un estuche comercial (Amersham).

La membrana fue prehibridada por 2 horas a 42°C con una solución conteniendo 5x SSC, Tris-HCl 50mM pH 7.5, reactivo de bloqueo 1x (Roche) y formamida al 50%. La hibridación fue llevada a cabo por 24 horas a 42°C, con una solución similar a la de prehibridación pero conteniendo además 0.1% SDS y el detector marcado radioactivamente y desnaturalizado por ebullición durante 10

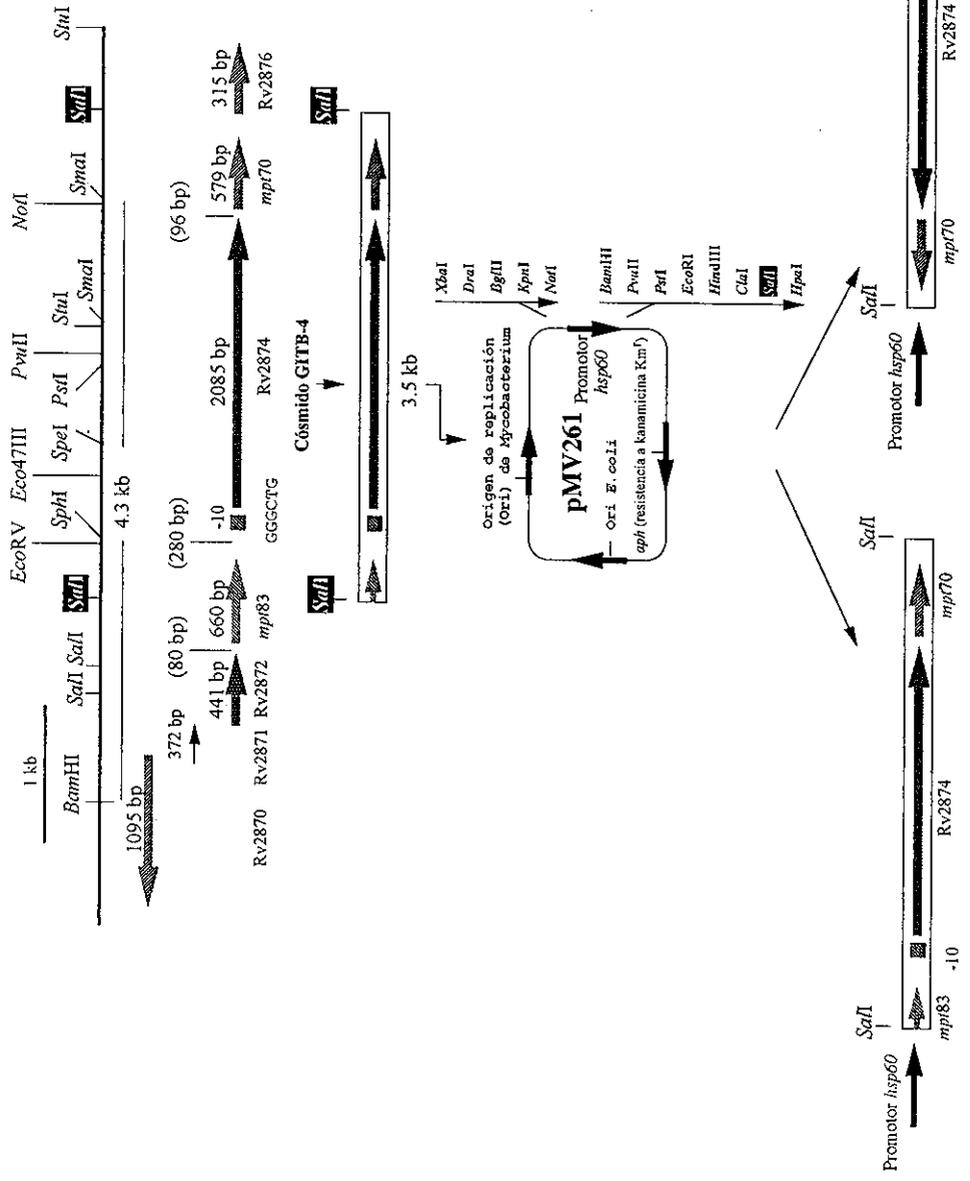
minutos. La membrana fue sometida a dos lavados con 2x SSC y 0.1% SDS por 15 minutos cada uno y luego a dos lavados con 2x SSC por 15 minutos cada uno. Posteriormente, la membrana fue expuesta a una película fotográfica Kodak X-OMAT XR por 12 horas a -70°C para posteriormente ser revelada.

Análisis de la expresión de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis*.

Con la finalidad de estudiar la expresión de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* mc² 155 (micobacteria no patógena y de rápido crecimiento), el fragmento *SalI* de 3.5 kb conteniendo el gen Rv2874 y obtenido de la clona cósmido G1TB-4, fue subclonado en el vector pMV261 generándose los plásmidos pJD964 con la misma orientación del promotor del gen *hsp60* en el vector y el pJD966 con la orientación contraria a éste (figura 2). *M. smegmatis* mc²155 fue electroporada con cada uno de los plásmidos y las micobacterias electroporadas fueron crecidas sobre placas de medio 7H11 suplementado con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina.

Posteriormente, una sola colonia de cada *M. smegmatis* y *E. coli* transformadas independientemente con las construcciones anteriores, fueron crecidas a 37°C con agitación en medio 7H9 suplementado como se describió anteriormente o medio LB, respectivamente; ambos con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina. La detección de la expresión de la proteína recombinante fue llevada a cabo en los sonicados totales de estos cultivos crecidos hasta la fase exponencial tardía.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



pJD966

pJD964

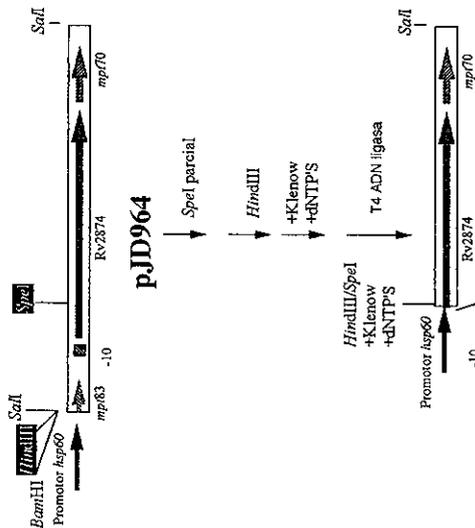
Figura 2. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD964 y pJD966. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

Expresión del dominio central transmembranal y el dominio carboxilo terminal hidrofílico codificados por el gen Rv2874.

Con el fin de obtener la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* para analizar su posible capacidad de tioredoxina, y para generar un suero policlonal, se llevaron a cabo las construcciones que se describen a continuación.

Construcción del plásmido pJD9641. El plásmido pJD964 conteniendo la secuencia completa del gen Rv2874 fue digerido parcialmente con *SpeI* y completamente con *HindIII*, eliminándose los primeros 118 codones de la región amino terminal (N-terminal). Los extremos cohesivos fueron tratados con la enzima Klenow y una mezcla de deoxinucleósidos trifosfato (dNTP'S) para rellenarlos. Posteriormente, el plásmido lineal fue ligado sobre sí mismo para generar una fusión en fase con los primeros codones del gen *hsp60* presentes en la secuencia de múltiples sitios de clonación del vector pMV261, obteniéndose el plásmido pJD9641 (figura 3a).

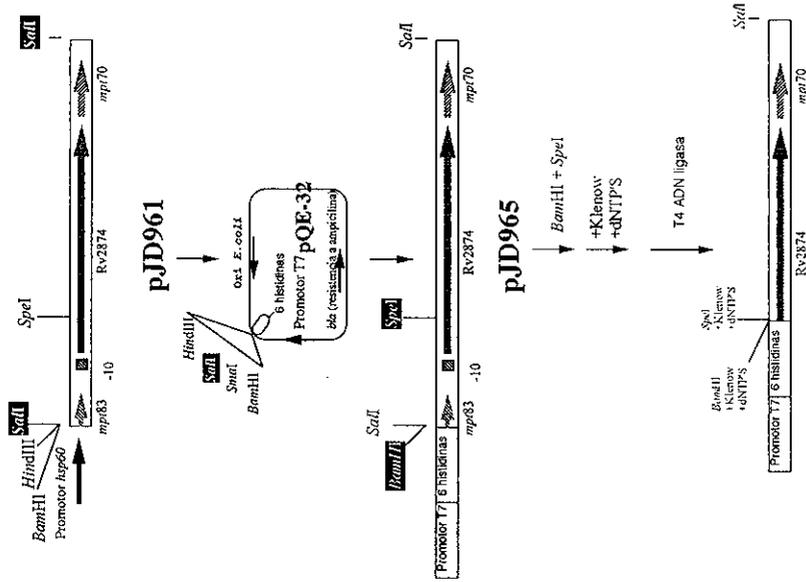
Construcción del plásmido pJD9651. El fragmento *SalI* de 3.5 kb conteniendo el gen Rv2874 completo fue obtenido del pJD961 y fue subclonado en el sitio *SalI* del vector de expresión pQE-32 (Qiagen), con el gen Rv2874 hacia abajo y en la misma dirección de la secuencia que codifica un tallo de seis histidinas del vector. El plásmido resultante fue designado pJD965 (figura 3b). Posteriormente, el pJD965 fue digerido con *BamHI* y *SpeI* y luego los extremos cohesivos generados fueron rellenados con Klenow y dNTP'S para religar el plásmido resultante pJD9651 (figura 3b). Este plásmido contiene al gen Rv2874 truncado y en fase con el frente de lectura que codifica el tallo de seis histidinas N-terminal.

a

ATE GCC AAC ACA ATT GCG GAT CCA GGT GCA GAA TTC GAA GCT CTA GTC GGC
 D S A A A E F A SECUENCIA DE LA REGION DE
 M A K T I A SECUENCIA DE LOS
 PRIMEROS OCHO CODONES DEL GEN Rv2874
 DE CLONACION

pJD964

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

b

AGC AGC GCA TCT GAT GCG GCA GCT CTA GTC GGC
 M R G S L I L G SECUENCIA DEL
 SECUENCIA DEL
 P0632 GEN Rv2874

pJD965**pJD9651**

Figura 3. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD964(a) y pJD9651 (b). El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en estas construcciones fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

Las cepas de *E. coli* DH5 α IQ y HB101 fueron transformadas con los plásmidos pJD9651 y pJD9641 respectivamente. Con la última construcción también fue transformada *M. smegmatis* mc²155. Las bacterias transformadas con cada una de estas construcciones fueron cultivadas y en el caso del plásmido pJD9651, la expresión del gen híbrido fue inducida con 1 mM de Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido (IPTG) cuando el cultivo alcanzó una D.O._{600nm} de 0.5, continuándose el cultivo por 2 y 4 horas.

Expresión del dominio hidrofílico carboxilo terminal de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*.

Debido a que no fue posible expresar la proteína completa codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* y tampoco la proteína truncada conteniendo los dominios central, transmembranal y carboxilo terminal (C-terminal), se realizaron dos construcciones para intentar expresar el dominio C-terminal.

Construcción del plásmido pJD974. Esta construcción se generó utilizando el fragmento *PvuII-HindIII* de 1.76 kb del plásmido pJD966, conteniendo la secuencia que codifica el dominio C-terminal hidrofílico del Rv2874 (codones 384-695). Este fragmento fue subclonado en los sitios *SmaI-HindIII* del vector de expresión pQE-32, para producir una fusión en fase con la secuencia que codifica un tallo de seis histidinas N-terminal en el vector y generar el pJD974 (figura 4a). Esta construcción expresó el dominio soluble de la proteína con el motivo isomerasa disulfuro/tioredoxina (CINC) y denominada His-Rv2874C₁.

Construcción del plásmido pJD953. Una segunda construcción se generó al subclonar el fragmento *StuI* de 2.2 kb de la clona cósmido recombinante GITB-4

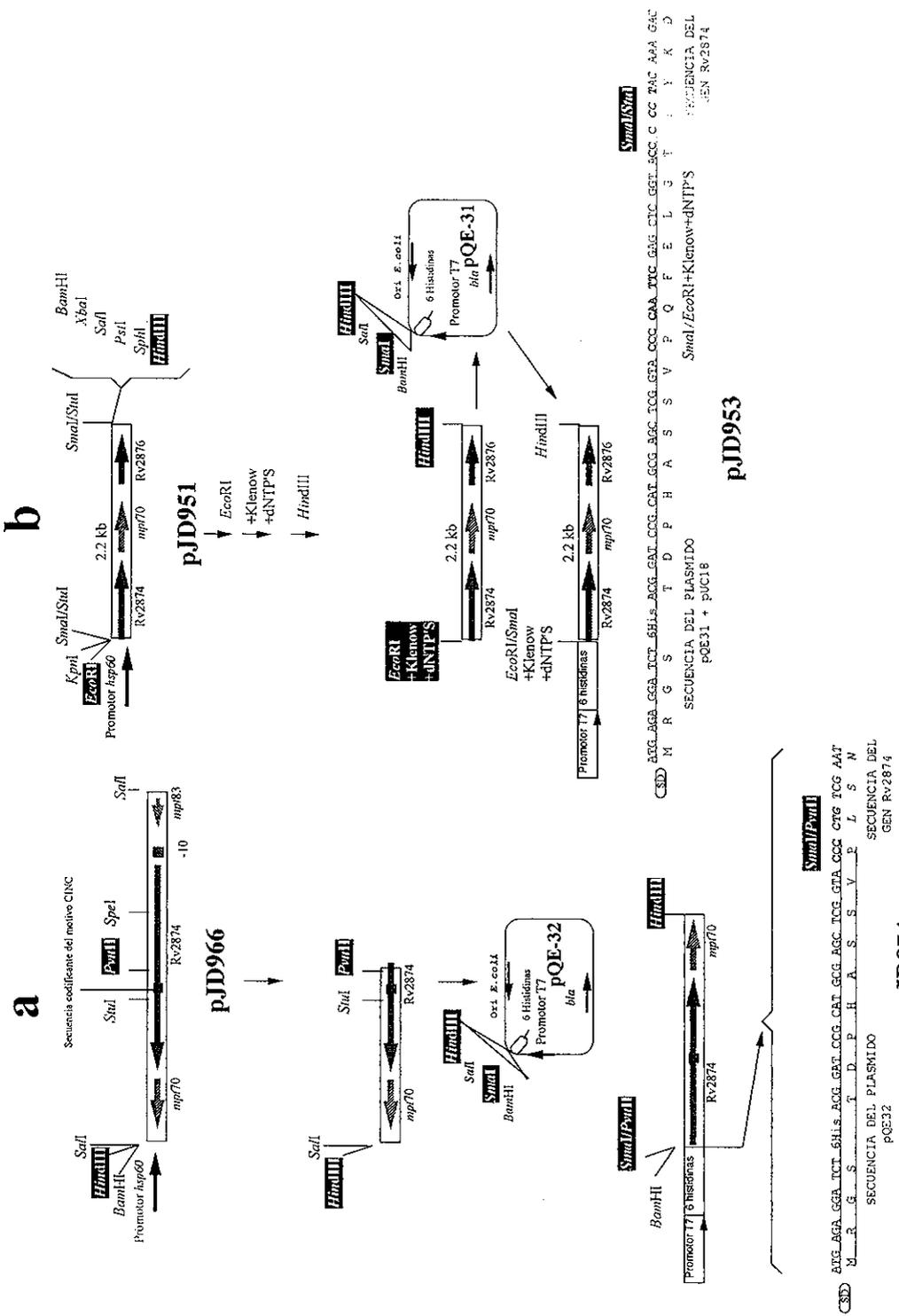


Figura 4. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD974 (a) y pJD953(b). El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en estas construcciones fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

de *M. tuberculosis*, en la orientación correcta y en fase con un frente de lectura codificando un tallo de seis histidinas N-terminal en el vector de expresión pQE-31 (Qiagen). A continuación se describe como se realizó esta construcción. El plásmido recombinante pJD951 conteniendo el fragmento *StuI* de 2.2 kb, fue linearizado con *EcoRI* y los extremos cohesivos generados fueron rellenados con la enzima Klenow y dNTP'S. Posteriormente, este DNA se digirió con la enzima *HindIII* para liberar el fragmento de 2.2 kb de *M. tuberculosis*, el cual se subclonó en los sitios *SmaI-HindIII* del pQE-31, generando el plásmido pJD953 (figura 4b). Esta construcción expresó el dominio soluble (codones 453-695) pero sin el motivo isomerasa disulfuro/tioredoxina (His-Rv2874C₂), de la proteína codificada por el Rv2874.

El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en estas construcciones pJD974 y pJD953, fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las formas recombinantes solubles del dominio C-terminal de la proteína codificada por el Rv2874 fueron expresadas en cultivos de *E. coli* DH5 α IQ transformada con el pJD974 y el pJD953. Una sola colonia de cada *E. coli* transformada con cada uno de los plásmidos fue cultivada a 30°C con agitación (200 rpm) en LB conteniendo 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5 y entonces 1mM de (IPTG) fue adicionado al cultivo para inducir la expresión de la proteína recombinante por 5 horas a 30°C. La inducción de las proteínas fue analizada por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS.

Purificación de las formas solubles recombinantes de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*.

Los cultivos de *E. coli* DH5 α IQ transformada con cada uno de los plásmidos pJD974 y pJD953, los cuales expresan las proteínas recombinantes His-RV2874C₁ de 36/40 kDa y His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa respectivamente, fueron crecidos como se describió anteriormente y procesados como se indica abajo.

La purificación de las proteínas recombinantes se llevo a cabo por cromatografía de afinidad a níquel usando condiciones desnaturalizantes como lo recomienda el proveedor (Qiagen). Los cultivos de *E. coli* transformada con cada uno de los plásmidos y crecidos a una D.O._{600nm} de 0.5, fueron inducidos con 1mM de IPTG por 5 horas.

Las células fueron cosechadas por centrifugación a 5 K rpm por 20 minutos y resuspendidas en amortiguador A (6 M Guanidina hidroclicorada, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8) y agitadas en el vortex suavemente por 1 hora a temperatura ambiente. Los lisados celulares de cada cultivo fueron centrifugados a 14 K rpm por 30 minutos a 4°C y los sobrenadantes obtenidos fueron mezclados con un volumen igual de la resina al 50% de Níquel-ácido nitriloacético (Ni-NTA) previamente equilibrada con amortiguador A (Qiagen), la mezcla fue agitada suavemente por 1 hora a temperatura ambiente.

La mezcla de cada uno de los lisados con la resina fueron empaquetados en columnas. Las columnas fueron lavadas con 10 volúmenes de amortiguador A y 5 volúmenes de amortiguador B (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 8) o hasta que la absorbancia (A_{280nm}) fue menor a 0.01. Después la columna fue lavada con

el amortiguador C (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 M Tris-HCl, pH 6.3) hasta que la A_{280 nm} fue menor a 0.01. Cada una de las proteínas recombinantes fue eluida con 10 ml de amortiguador D (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 Tris-HCl, pH 5.9), seguido por 10 ml de amortiguador E (8 M Urea, 0.1 M NaH₂PO₄, 0.01 Tris-HCl, pH 4.5). Las fracciones de 1.5 ml de cada elución fueron colectadas y analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS al 12 %. La tinción de Coomassie reveló además de la proteína recombinante otras bandas protéicas teñidas con menor intensidad. Por esta razón se decidió transferir cada una de las proteínas recombinantes a membranas de nitrocelulosa y después obtener estas proteínas de la nitrocelulosa. Para llevar a cabo lo anterior, las proteínas fueron separadas en geles preparativos de poliacrilamida-SDS al 12% y, luego transferidas a membranas de nitrocelulosa siguiendo los métodos estándares. Las membranas fueron teñidas con el colorante temporal ponceau y las bandas de 36/40 kDa y de 30/34 kDa de las proteínas recombinantes His-Rv2874C₁ y His-Rv2874C₂, respectivamente, fueron recortadas. Las tiras de nitrocelulosa con las bandas de las proteínas recombinantes fueron desteñidas y después pulverizadas antes de llevar a cabo la inmunización de los ratones.

Obtención de sueros policlonales de ratón dirigidos contra las proteínas recombinantes purificadas.

Un lote de trece ratones Balb/c fue inoculado con la proteína recombinante de 30/34 kDa (His-Rv2874C₂) purificada como se mencionó. A cada ratón se le administraron subcutáneamente 5µg de la proteína de 30/34 kDa mezclada con 200 µg de saponina recién preparada en 1x PBS (13.7 mM NaCl, 0.27 mM KCl, 0.43 mM

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ y 0.14 mM KH_2PO_4 pH 7.4). La administración del antígeno fue efectuada 4 veces con intervalos de 15 días entre cada uno. Para la obtención de sueros controles negativos, a dos ratones se les administró subcutáneamente 1x PBS conteniendo 200 μg de saponina por 4 veces, siguiendo el mismo calendario de administración que el de los ratones inmunizados con el antígeno. Después de 15 días de la última administración del antígeno, los ratones fueron anestesiados y desangrados con un capilar por el ojo y finalmente sacrificados. El suero de cada uno de los ratones inmunizados con el antígeno, reconoció por inmunoblot a la proteína His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa y a la proteína His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa, mientras que el suero de los ratones controles fue negativo.

Siguiendo este mismo protocolo se obtuvo un suero dirigido contra la proteína His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa, el cual reconoció a ambas proteínas recombinantes.

Por otro lado, los sueros policlonales dirigidos contra las proteínas recombinantes His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa y His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa, fueron usados para detectar por inmunoblot, la proteína nativa codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*, en el sonicado total y proteínas del filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* crecida en medio Sauton (0.05 g L⁻¹ citrato de fierro y amonio, 0.5 g L⁻¹ MgSO₄, 0.5 g NaH₂PO₄, 2.0 g ácido cítrico, 4.0 g L⁻¹, asparagina y 60 g L⁻¹ glicerol, pH 7.2).

Preparación de la fracción de membranas celulares de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis*.

M. tuberculosis H37Rv fue crecida por tres meses en medio Sauton. El cultivo micobacteriano crecido en la superficie fue tratado con una solución al 2% de azida de sodio, deslizando esta solución por las paredes del matr az, mezclando e incubando a 37°C por 24 a 48 horas sin agitación. Posteriormente, la masa celular fue recuperada decantando el sobrenadante. La pastilla micobacteriana fue lavada dos veces con amortiguador de sonicación (10 mM Na₂HPO₄ pH 7.2) y 5 g (peso húmedo) de la pastilla celular fue resuspendida en 20 ml de amortiguador de sonicación. La suspensión celular se dividió en alícuotas de 500 él en tubos eppendorf de 1.5 ml y fue sonicada, manteniendo los tubos siempre en hielo, con pulsos de 20 segundos y con intervalos de 2 minutos hasta obtener clareamiento en la suspensión celular.

Los lisados celulares fueron centrifugados a 12 K rpm por 10 minutos a 4°C para remover las paredes celulares insolubles y células no rotas. El sobrenadante resultante conteniendo las proteínas del citoplasma y de las membranas fue centrifugado a 40 K rpm por 1 hora a 4°C. El botón obtenido en esta centrifugación fue utilizado como la fracción concentrada de proteínas de membrana para la realización de los inmunoblots, el cual fue lavado dos veces con 1x PBS.

M. bovis BCG fue crecida en medio Sauton suplementado con ácido pirúvico. El cultivo micobacteriano fue procesado para obtener la fracción con las membranas celulares como fue descrito para *M. tuberculosis* H37Rv.

M. smegmatis mc² 155 fue cultivada por cuatro días en medio 7H9 y suplementado como fue descrito anteriormente. Este cultivo fue procesado como los de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG para obtener la fracción de membranas celulares.

Fraccionamiento celular de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG y de *M. smegmatis* transformada con el gen Rv2874

El cultivo de *M. smegmatis* mc²155 transformada con el plásmido pJD964, crecido por 4 días en el medio 7H9 suplementado como fue descrito anteriormente y con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina, fue cosechado por centrifugación y la pastilla celular fue resuspendida en 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.2. La suspensión celular de este cultivo fue alicuotada y sonicada con pulsos de 20 segundos manteniendo la muestra en hielo, hasta observarse la suspensión celular clara.

El fraccionamiento de las proteínas celulares fue realizado como lo describen Pages y Lazdunski (1982) y modificado ligeramente. Brevemente, el sonificado resultante fue centrifugado por 10 minutos a 12 K rpm para bajar las células no rotas y paredes celulares insolubles. El sobrenadante clareado fue centrifugado a 14 K rpm por 30 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido en esta centrifugación constituyó la fracción correspondiente a proteínas solubles principalmente y el botón a proteínas insolubles y de membrana. Este botón fue tratado con 2% Triton X-100 por 30 minutos a 37°C y posteriormente fue centrifugado a 14 K rpm por 30 minutos a 4°C. En el sobrenadante resultante fueron obtenidas las proteínas solubles en Triton X-100, mientras que en los botones las proteínas insolubles en este detergente. El botón protéico fue lavado con 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.2 y luego fue centrifugado a 14 K rpm

por 30 minutos a 4°C. Finalmente el botón fue resuspendido en 1x PBS. Las fracción conteniendo las proteínas solubles en Tritón-X 100 y la fracción insoluble en Tritón-X 100 fueron consideradas como las fracciones conteniendo las proteínas de membrana.

Las proteínas de los fraccionamientos celulares obtenidos fueron almacenados a -70°C hasta ser analizadas por electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS y transferidas a membranas de nitrocelulosa para ensayos de inmunoblot.

Las fracciones celulares de *M. bovis* BCG y *M. tuberculosis* H37Rv muertas con 2% azida de sodio, también fueron preparados por la técnica descrita anteriormente.

Electroforesis en geles de poliacrilamida y ensayos de inmunoblot.

Cinco µg de las proteínas recombinantes o 10 µg de proteínas de fracciones subcelulares o proteínas de filtrado del cultivo o sonicado total de *M. tuberculosis*, fueron corridas en geles preparativos de poliacrilamida-SDS al 12%. Unos geles fueron teñidos con Coomassie blue R-250 y otros fueron transferidos a membranas de Immobilon-P (Millipore).

Las membranas fueron incubadas por 1 hora con albúmina al 3% en 1x PBS y 0.3% Tween-20, luego fueron incubadas por 1 hora con una dilución 1:250 del suero hiperinmune de ratón surgido contra la proteína recombinante de 30/34 o de 36/40 kDa en 1x PBS y 0.3% Tween-20. Después de dos lavados de 15 minutos con 1x PBS conteniendo 0.3% Tween-20, las membranas fueron incubadas por 30 minutos a temperatura ambiente con un anticuerpo anti-IgG de ratón conjugado con peroxidasa y diluido 1:2000 (Sigma). Después de lavar las membranas como se mencionó anteriormente, la actividad de la peroxidasa fue revelada con una solución conteniendo

60 mg 4-Cloro-1-naftol disuelto en 10 ml de metanol (preparado antes de usar) y mezclado con 90 ml de 10 mM Tris-HCl pH 7.4 conteniendo 150 mM NaCl, añadiendo al final a esta solución 100 μ l de H₂O₂ al 30%.

Determinación de la inmunogenicidad de la proteína recombinante His-Rv2874-C₁1 de 3640 kDa por inmunoblot con sueros de pacientes tuberculosos y de personas sanas como control.

Con la finalidad de determinar si los sueros de 9 pacientes con tuberculosis pulmonar reconocían la proteína recombinante His-Rv2874-C₁1 de 3640 kDa, la proteína obtenida por cromatografía de afinidad a níquel, fue sometida a electroforesis en geles preparativos de poliacrilamida-SDS al 12% y luego transferida a membranas de nitrocelulosa. Estas membranas fueron cortadas en tiras para incubarlas con los sueros controles y los sueros de los pacientes con tuberculosis.

Las tiras de nitrocelulosa con la proteína recombinante fueron incubadas con 5% leche en polvo descremada disuelta en 1x PBS pH 7.4 y 2% azida de sodio, por 30 minutos para bloquear las uniones no específicas. Luego las tiras fueron incubadas con el primer suero (de pacientes tuberculosis o de personas sanas) diluidos 1/50 en 1x PBS por 60 minutos.

Los lavados fueron efectuados con 1x PBS por 5 minutos y con 1x PBS conteniendo 0.05% Nonidet P-40 (NP-40) por 15 minutos dos veces y un lavado final con 1x PBS por 5 minutos. Posteriormente, las tiras fueron incubadas con el anticuerpo anti-IgG humana conjugado con fosfatasa alcalina y diluido 1/2000, por 60 minutos. Las tiras fueron lavadas siguiendo el procedimiento anterior y fueron reveladas con el

sustrato de la fosfatasa alcalina. Como control positivo fueron incubadas una tiras con el suero anti la proteína His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa.

Los sueros de los pacientes con tuberculosis y de las personas sanas fueron también empleados en inmunoblots con proteínas del sonicado de *M. tuberculosis* para monitorear la reactividad de los mismos.

Purificación de las proteínas recombinantes His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa y His-Rv2874C₁1 de 36/40 kDa por cromatografía de inmunoafinidad con el suero policlonal de ratón dirigido contra estas proteínas.

Los sueros policlonales de ratón dirigidos contra las proteínas recombinantes His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa y His-Rv2874C₁1 de 36/40 kDa de *M. tuberculosis* fueron adsorbidos antes de usarse, con un extracto protéico de *E. coli* tratado previamente con acetona, por media hora a 4°C y luego fueron centrifugados a 12 K rpm por 10 minutos, recuperando el sobrenadante con los anticuerpos.

Estos sueros preadsorbidos fueron acoplados químicamente a sefarosa activada para preparar las columnas de inmunoafinidad. Brevemente, 1g de sefarosa activada con CNBr (Pharmacia) por cada suero, fue hidratada, lavada y resuspendida en 1 mM de HCl. Por otra parte, 10 mg de cada suero previamente preabsorbidos con extractos protéicos de *E. coli*, fueron disueltos en 5 ml de 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3 y 0.5 M NaCl. Después, las soluciones con cada uno de los sueros fueron mezcladas con la sefarosa activada y agitadas suavemente por 2 horas a 4°C, para permitir la unión covalente de los anticuerpos a la sefarosa activada con CNBr. El amortiguador de NaHCO₃ fue sustituido por 0.1 M Tris-HCl pH 8 para saturar los grupos reactivos remanentes sobre

la sefarosa y luego se permitió el asentamiento de ésta. Posteriormente fueron efectuados tres ciclos de lavados con 0.1 M de acetato de sodio pH 4 y 0.5 M NaCl y con 0.1 M Tris-HCl pH 4 y 0.5 M NaCl. La sefarosa con los anticuerpos acoplados anti His-Rv2874-C₂ 30/34 kDa y la acoplada con los anticuerpos anti His-Rv2874-C₁ 36/40 kDa fueron empaquetadas en columnas diferentes y después lavadas con 10 mM Tris-HCl pH 7.5.

Los cultivos de *E. coli* DH5 α IQ transformada con cada uno de los plásmidos pJD953 y pJD9714, fueron crecidos en un litro de LB con 200 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de ampicilina a 30°C con agitación moderada. Cuando los cultivos alcanzaron una D.O._{600nm} de 0.5U fueron inducidos con 1 mM de IPTG y crecidos por 5 horas. Cada cultivo fue cosechado por centrifugación a 5 K rpm por 20 minutos y las pastillas celulares fueron resuspendidas en 20 ml de 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.2. Las suspensiones celulares fueron sonicadas con pulsos de 20 segundos e intervalos de 30 segundos hasta que se observó el clareamiento de las suspensiones, manteniéndolas en hielo durante todo el proceso de sonicación. El sonicado de cada cultivo fue centrifugado a 12 K rpm por 30 minutos a 4°C y el sobrenadante resultante fue recuperado.

La columna de inmutioafinidad anti His-Rv2874-C₁ 36/40 kDa fue utilizada para pasar el sobrenadante conteniendo la proteína His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa y la columna anti His-Rv2874-C₂ 30/34 kDa se empleó para pasar el sobrenadante con la proteína His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa. El sobrenadante eluido de su columna respectiva, fue pasado dos veces más por la misma columna. Después cada una de las columnas fue lavada con 20 volúmenes de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 hasta que la A_{280nm}

fue menor de 0.01. Cada una de las proteínas fue eluida con 10 volúmenes de 100 mM Glicina pH 2.5.

Las fracciones eluidas de 450 μ l fueron colectadas en tubos eppendorf de 1.5 ml conteniendo 50 μ l de 1 M Tris-HCl pH 8. Después, las columnas fueron lavadas con 10 mM Tris-HCl pH 8.8 hasta que el eluido alcanzó un pH de 8. Una segunda elución de proteína recombinante fue llevada a cabo con 10 volúmenes de 100 mM Trietanolamina pH 11.5. Las fracciones eluidas de 450 μ l fueron colectadas como se describió para la primera elución.

Las columnas fueron lavadas con 20 volúmenes de 10 mM Tris-HCl pH 7.5 y fueron reusadas varias veces para purificar la misma proteína siguiendo el protocolo descrito aquí. Las columnas fueron almacenadas con 10 mM de Tris-HCl pH 7.5 conteniendo 0.01% de azida de sodio a 4°C. Las fracciones eluidas de una y otra proteína recombinantes fueron analizadas leyendo la A_{280nm} y por electroforesis en geles de poliacrilamida al 12 %.

Las fracciones eluidas conteniendo la proteína His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa o la His-Rv2874-C₂2 de 30/34 kDa fueron dializadas contra 10 mM Na₂HPO₄ pH 7.4 y concentradas por vacío. La concentración de las proteínas fue determinada por el micrométodo de Bio-Rad usando albumina de suero bovino como estandar.

Ensayo de la reducción de los puentes disulfuro de la insulina.

La capacidad potencial de la proteína recombinante His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa (conteniendo el motivo de tioredoxina) de *M. tuberculosis*, de catalizar la reducción de los puentes disulfuro de la insulina por ditiotreitól (DTT), fue analizada

de acuerdo con el método de Holmgren (1979) ligeramente modificado. Brevemente, el ensayo se hizo con 1 μ M de cada proteína recombinante His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa y His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa, purificadas por inmunoafinidad (del eluido con pH ácido). Uno μ M tioredoxina de *E. coli* (Sigma) fue usada como control positivo, y la proteína recombinante de 30/34 kDa como control negativo. Otro control negativo fue la incubación de la insulina únicamente con el DTT y el amortiguador de reacción.

El ensayo fue realizado en paralelo con cada una de las proteínas. Se comenzó preincubando cada una de las proteínas en el amortiguador de reacción conteniendo 0.1 M K₂HPO₄ pH 6.5, 0.2 mM EDTA y 1mM DDT, por 45 minutos a 25°C. La reacción fue iniciada adicionando la insulina a una concentración final de 0.13 mM. La reacción fue monitoreada como el incremento de la A_{650nm} originada por la precipitación de la insulina al reducirse las cadenas A y B de la misma.

Aislamiento de RNA total de *M. tuberculosis*.

M. tuberculosis H37Rv fue crecida en medio Sauton por tres meses a 37°C sin agitación. Las células micobacterianas fueron tratadas con 2% azida de sodio por 24 horas a 37°C sin agitación. La masa celular fue recuperada decantando el sobrenadante. Una alícuota de 200 μ l de masa bacteriana fue resuspendida con la solución de Trizol (Gibco-BRL) a 65°C y el RNA total fue obtenido usando la técnica de Trizol (Gibco-BRL).

El RNA fue tratado con DNasaI libre de RNasa a 100 μ g ml⁻¹ (Roche) por 1 hora a 37°C, extraído dos veces con cloroformo, precipitado con acetato de amonio y etanol absoluto y lavado con etanol al 70%. Finalmente la pastilla del RNA fue obtenida

después de centrifugar a 12 K rpm por 15 minutos a 4°C. La pastilla del RNA fue secada a temperatura ambiente y posteriormente resuspendida en 0.02% H₂O-DEPC y almacenada a -70°C hasta su uso. La concentración de RNA fue determinada espectrofotométricamente.

El RNA total de *M. smegmatis* mc²155 crecida a la mitad de la fase exponencial y transformada con cada uno de los plásmidos pJD20A, pJD21F, pJD21H (descritos más adelante), fue obtenido con el estuche de RNeasy (Qiagen) siguiendo las instrucciones del proveedor.

Reacciones de RT-PCR

Análisis de la expresión del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* por medio de RT-PCR (de las siglas en inglés "Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaccion"). Las reacciones de RT fueron llevadas a cabo en un volumen de 20 µl del amortiguador conteniendo 10 mM Tris-HCl pH 8.3, 50 mM KCl, 5mM MgCl₂, 1 mM dNTP'S, 20 U de inhibidor de RNasa (Perkin-Elmer), 0.2 µg de RNA, 2.5 µM de oligonucleótidos hexámeros iniciadores con secuencias al azar (Perkin-Elmer) y 50 U de la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina (Perkin-Elmer). En los controles negativos la transcriptasa reversa fue omitida. Las reacciones de RT fueron incubadas a 42°C por 1 hora e inactivadas por calor a 95°C por 5 minutos.

El producto obtenido por RT fue usado como molde en la reacción de PCR, con un amortiguador conteniendo 10 mM de Tris-HCl pH 8.3, 0.1% Triton X-100, 50 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 200 µM dNTP'S, 0.3 µM de cada uno de los oligonucleótidos iniciadores descritos adelante y 2.5 U de la Amplitaq DNA polimerasa (Perkin-Elmer),

en un volumen de 50 μ l. El DNA complementario (DNAc) fue amplificado en un sistema Gene Amp PCR 9600 (Perkin-Elmer) usando el siguiente programa: un ciclo a 95°C por 5 minutos y al finalizar este ciclo los tubos de la reacción fueron colocados en hielo y la enzima Amplitaq fue adicionada, después fueron colocados otra vez en la máquina y se llevaron a cabo 35 ciclos de 95°C por 15 segundos, 62°C por 30 segundos y 72°C por 30 segundos, y un ciclo de elongación de 7 minutos a 72°C. Solo cuando el oligonucleótido MT10 iniciador fue usado, la temperatura de alineamiento de éste con el DNAc molde fue de 52°C.

Las reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo con los siguientes oligonucleótidos:

MTA, localizado a 240 pb arriba del codón de inicio del gen Rv2871 (5'-CGT CGG ATC AGC ACT AGG GGA TGT CGC-3').

MTB, localizado a 338pb hacia abajo del codón de inicio del gen Rv2872 (5'-GCG CTA GAG TAC TAC GCA ACC TGG-3').

MTC antisentido, localizado inmediatamente arriba del codón de inicio del gen *mpt83* (5'-TCA TCG CTT CGG ATC CTT TGC TTC TGC G-3').

MT18, localizado hacia abajo del codón de inicio del gen Rv2871 (5'-CGC CAC CAC CTC GTT GTC A-3').

MT16 antisentido, localizado a 377 pb hacia abajo del codón de inicio del gen *mpt83* (5'-GTC GAA TGC GGC GTT GGT G-3').

MT11, localizado a 5 pb hacia abajo del codón de inicio del gen *mp183* (5'-CGT TCA GGC CAA ACC GGC CGC-3').

MTD antisentido, extendiéndose desde la base -16 hasta +8 con respecto al +1 del inicio de la traducción del gen *Rv2874* (5'-TCA ACC ATC GGC GCC GTG CGG GCT-3').

MT9, localizado a 45 pb hacia abajo del codón de inicio del gen *Rv2874* (5'-GAT GCG GGA TTG CAC CCG CGA CC-3').

MT7 antisentido, localizado desde la posición -3 a +22 con respecto al inicio de la traducción del gen *Rv2874* (5'-AGC TCG TCT CAG CTG AAC CAT CGG-3').

MT10 antisentido, localizado a 257 pb del codón de inicio del *Rv2874* (5'-GTT GAC AGA GTC GGT TC-3').

MT3 antisentido, localizado a 1097 pb hacia abajo del codón de inicio del *Rv2874* (5'-CCG-CCA-AGC TGC AGT TGT TCC CG-3').

MT6 antisentido, localizado a 400 pb hacia abajo del codón de inicio del *Rv2874* (5'-GAA GAT TAC TGG CAG GAC CGG C-3').

MT5, localizado a 1914 pb hacia abajo del codón de inicio ATG del gen *Rv2874* (5'-GTT GTC GGT GGC ACC GGC ACC-3').

MT1 antisentido, localizado a 2027 pb hacia abajo del codón de inicio del gen *Rv2894* (5'-GCT GGG TCG ACA CCT CAA GTG TTT CGG-3').

Los oligonucleótidos 16S1 (5'-GTG CCA GCA CCC GGG GTA ATA CG-3') y 16S2 (5'-CGA GTT GAC CCC GGG AGT CTC TC-3'), fueron usados como control interno de la expresión del gen del RNA ribosomal 16S de la micobacteria.

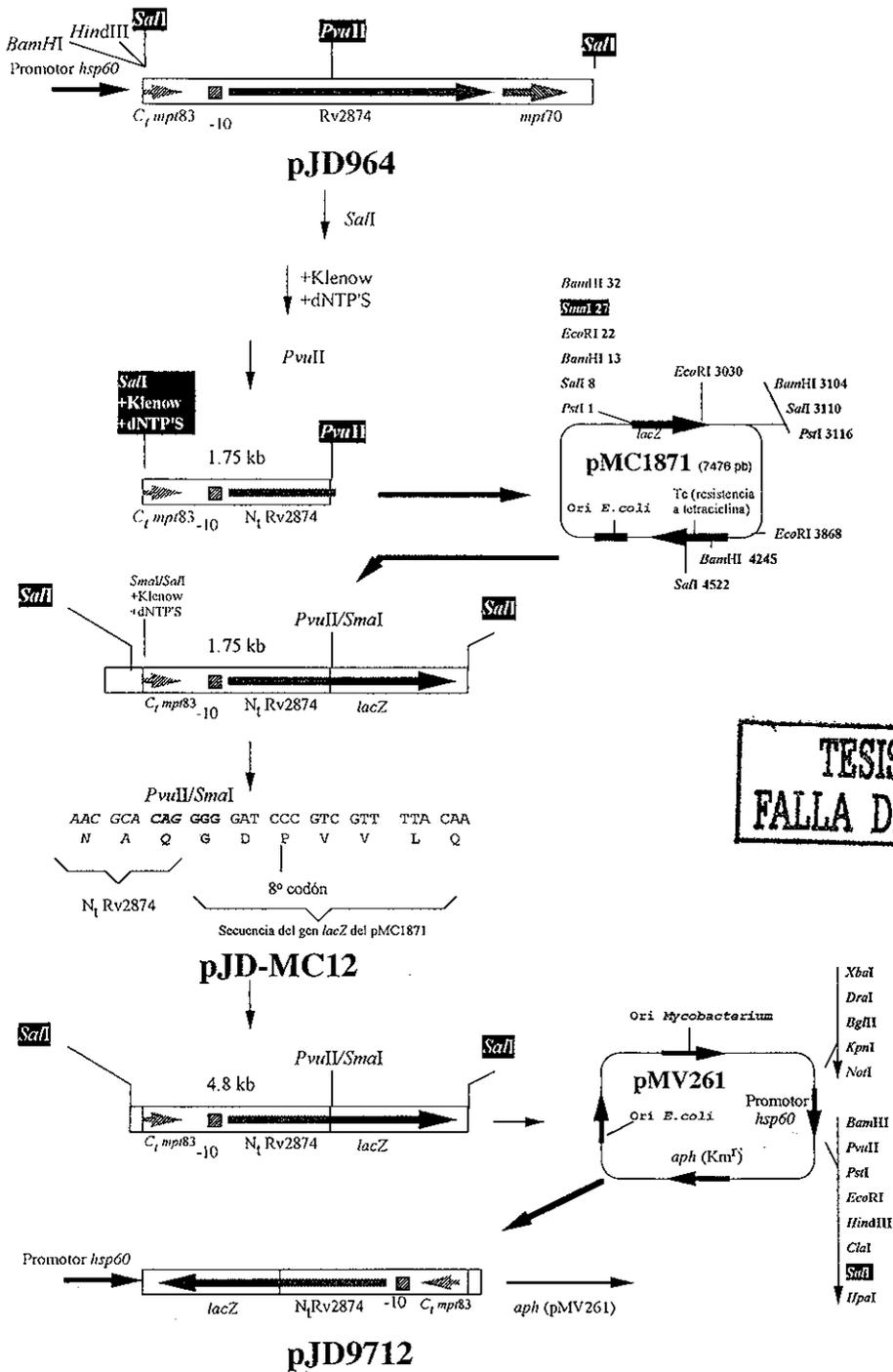
Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en geles de agarosa al 2%.

Construcción de fusiones traduccionales del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* con el gen estructural *lacZ* de *E. coli*.

Con la finalidad de analizar si la región 5' arriba del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* contenía las señales de transcripción y traducción de este gen, se construyeron cinco fusiones traduccionales que se describen a continuación.

Construcción del plásmido pJD9712. Para realizar esta primera fusión, el fragmento de 1.7 kb con un extremo digerido con *SalI* y luego tratado con Klenow+dNTP'S y el otro extremo digerido con *PvuII* (*SalI*/Klenow+dNTP'S-*PvuII*), conteniendo 106 codones de la secuencia que codifica la región C-terminal del gen *mpt83*, 280 pb de la región 5'arriba del codón de inicio del gen Rv2874, y 383 codones de este gen, fue obtenido del pJD964 y luego fue fusionado en fase con la secuencia del gen estructural *lacZ*, al subclonar este fragmento en el sitio *SmaI* del vector pMC1871 (figura 5a). El frente de lectura de la fusión fue verificado por secuenciación nucleotídica. Posteriormente, la clona obtenida pJD-MC12 fue digerida con *SalI* para liberar el fragmento *SalI* de 4.8 kb conteniendo la fusión, el cual fue subclonado en el sitio *SalI* del pMV261 generando el pJD9712 (figura 5a).

Construcción del plásmido pJD9771. El fragmento *EcoRV-PvuII* de 1.3 kb conteniendo 195 pb de la región 5' arriba del codón de inicio del gen Rv2874 y la misma secuencia del gen estructural Rv2874 descrita en el fragmento anterior, fue obtenido del pJD964 para ser subclonado en el sitio *SmaI* del pMC1871 y en fase con



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 5a. Esquema de la construcción del plásmido pJD9712. El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en el plásmido pJD-MC12 fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro. Secuencia genética que codifica la región amino-terminal (N_T) o la región carboxilo-terminal (C_T) de la proteína expresada.

el gen *lacZ* (figura 5b). El mantenimiento de la fase del frente de lectura entre el gen Rv2874 y el gen *lacZ* fue verificado por secuenciación nucleotídica. El plásmido recombinante obtenido pJD-MC71 fue digerido con *SalI* para liberar el fragmento *SalI* de 4.4 kb conteniendo la fusión. Este fragmento fue subclonado en el sitio *SalI* del pMV261 para generar el pJD9771 (figura 5b).

Construcción del plásmido pJD9713. Esta tercera fusión fue construida con un fragmento de 288 pb conteniendo 279 pb de la región 5' arriba del gen Rv2874 y los tres primeros codones de este gen, el cual fue amplificado por PCR con los oligonucleótidos iniciadores: MT8 localizado a 269 pb arriba del codón de inicio del gen Rv2874 (5'-CAG TAA CGT CCC GGG CGG TCA AGG-3') y MT7 (antisentido), localizado desde la posición -3 a +22 con respecto al inicio de traducción del gen Rv2874 (5'-AGC TCG TCT CAG CTG AAC CAT CGG-3'); usando como templado al pJD201. Con estos oligonucleótidos MT8 y MT7 se introdujeron los sitios *SmaI* y *PvuII* respectivamente, en el producto de PCR amplificado. La amplificación del DNA con estos oligonucleótidos se realizó utilizando la DNA polimerasa Pwo (Roche) de alta fidelidad. El producto de PCR fue digerido con *SmaI* y *PvuII* y después fue clonado en el sitio *SmaI* del plásmido pMC1871 (figura 5c). La clona obtenida pJD-MC13 con la orientación correcta fue analizada por secuenciación para verificar la fusión en fase con el gen *lacZ* estructural y que no hubiese cambios en la secuencia de DNA amplificada por PCR. Posteriormente, el pJD-MC13 fue digerido con *PstI* liberando un fragmento de 3.4 kb conteniendo dicha fusión, éste fue subclonado en el sitio *PstI* del pMV261 para generar el plásmido recombinante pJD9713 (figura 5c).

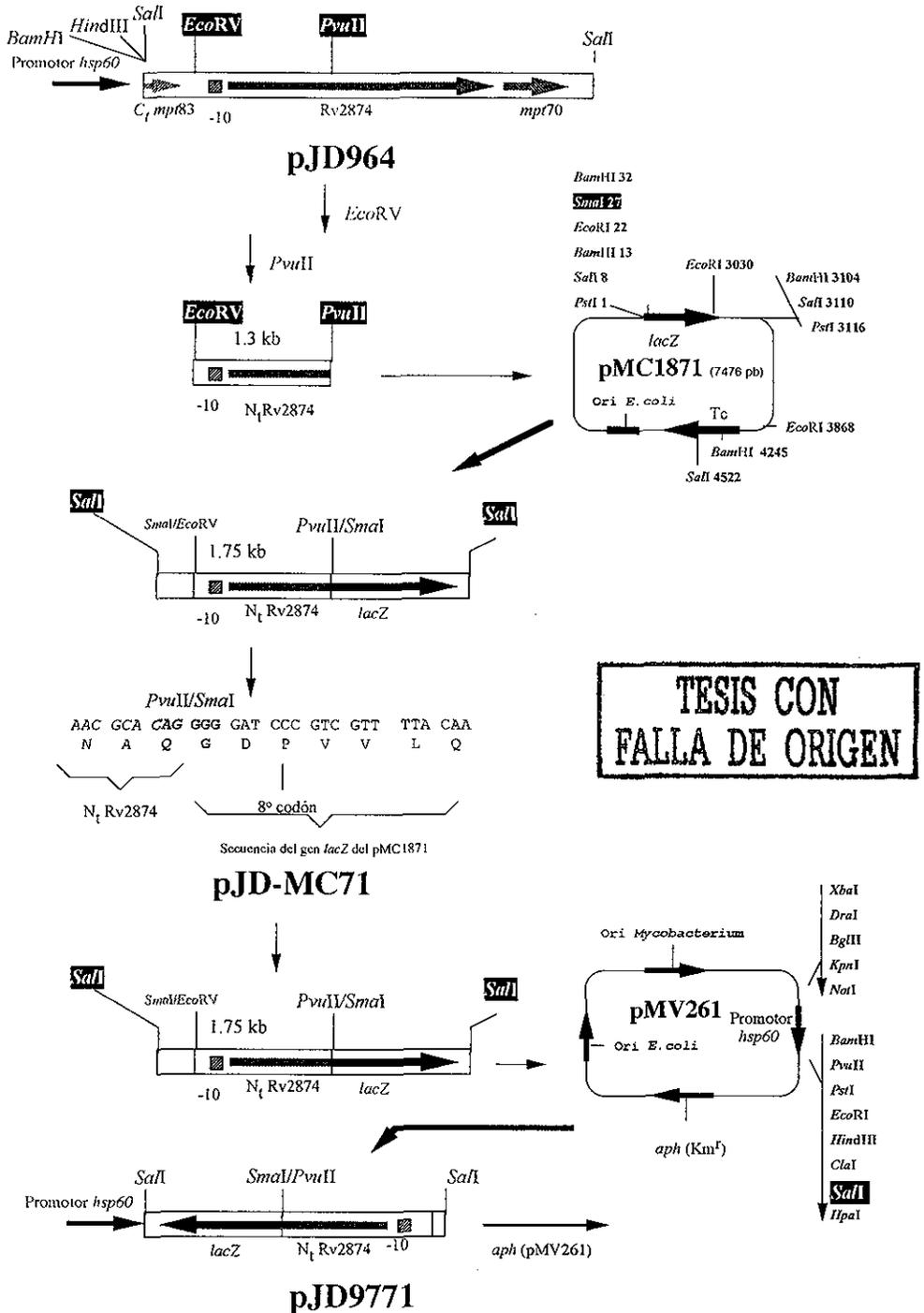
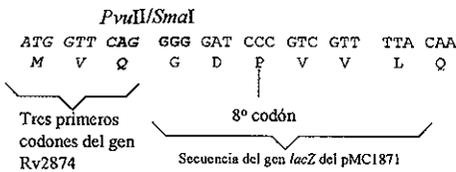
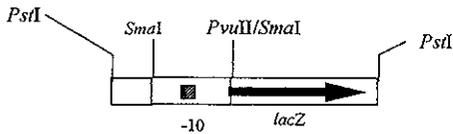
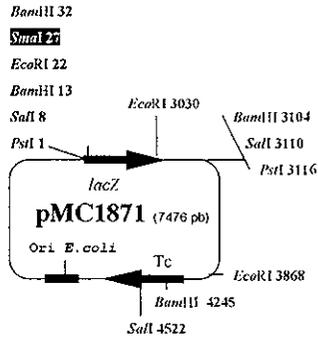
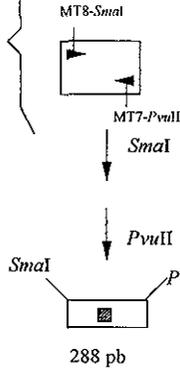


Figura 5b. Esquema de la construcción del plásmido pJD9771. El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en el plásmido pJD-MC71 fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

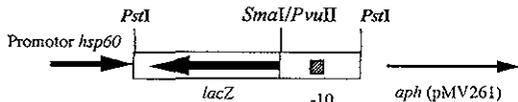
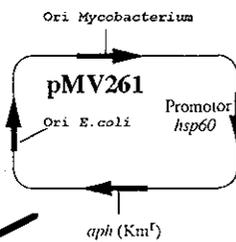
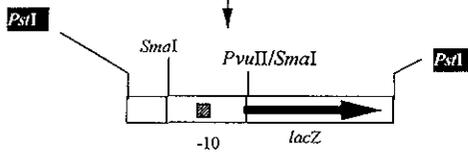


pJD201

Amplificación de un fragmento de 306 pb por PCR con la Pwo DNA polimerasa



pJD-MC13



pJD9713

Figura 5c. Esquema de la construcción del plásmido pJD9713. El mantenimiento del frente de lectura del gen Rv2874 en el plásmido pJD-MC13 fue verificado por secuenciación nucleotídica. El tercer aminoácido del Rv2874 cambió de E (ácido glutámico) a Q (glutamina). Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

Construcción del plásmido pJD9714. El pJD9713 fue digerido primero con *Hind*III, luego el plásmido linearizado fue tratado con Klenow y dNTP'S para rellenar las terminales cohesivas y después digiriendo con *Sph*I, para eliminar un fragmento de 140 pb y en su lugar se subclonó el fragmento de 0.46 kb *Sal*I/Klenow+dNTP'S-*Sph*I proveniente del pJD201, para generar el pJD9714 (figura 5d).

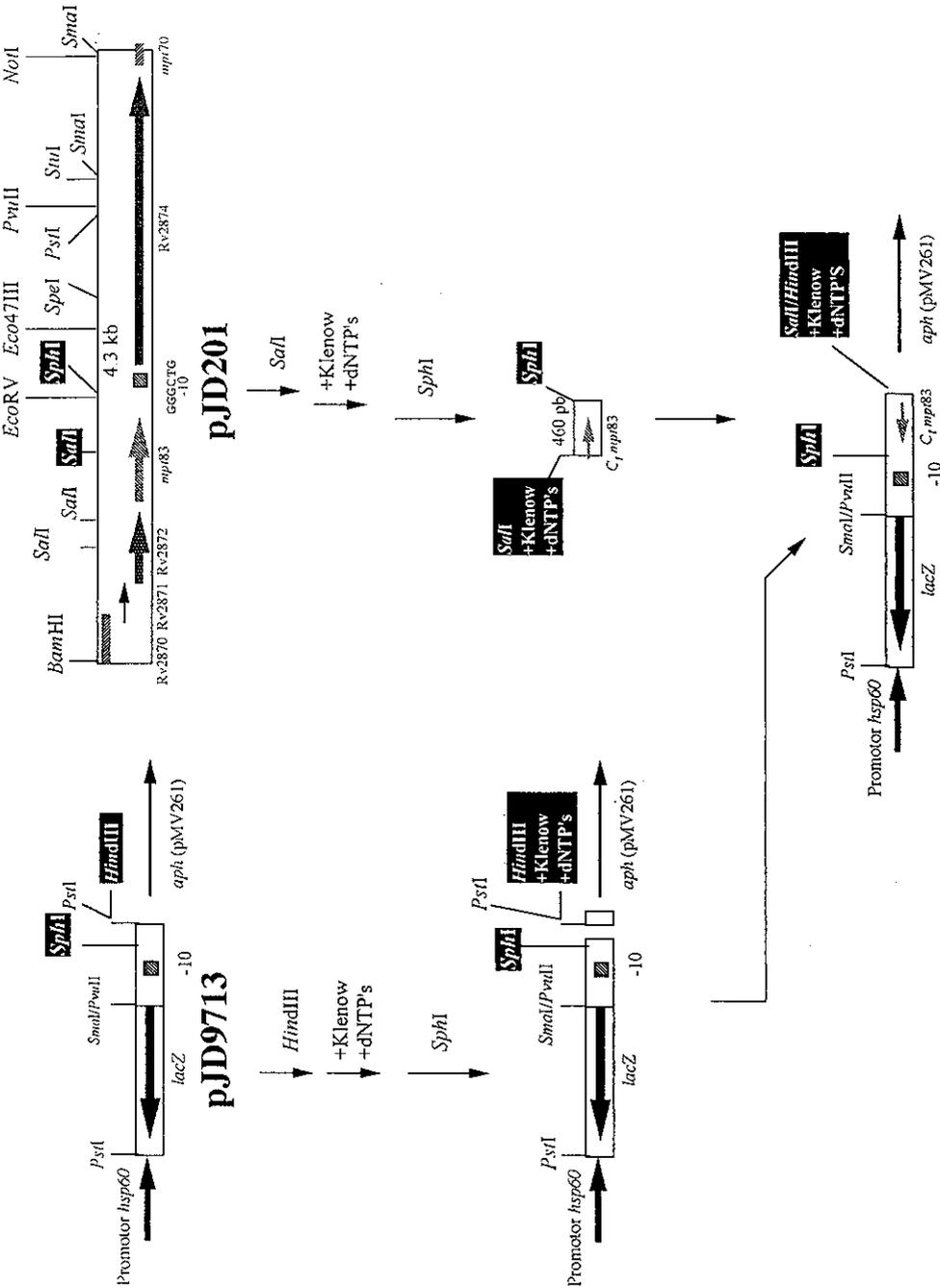
Construcción del plásmido pJD9715. El fragmento *Bam*HI/Klenow+dNTP'S-*Sph*I de 1.95 kb del pJD201, fue subclonado al pJD9713 digerido y tratado como se describió en la construcción anterior (figura 5e).

De las clonas obtenidas descritas anteriormente, se seleccionaron las que presentaron la fusión en sentido contrario a los promotores del *hsp60* y del gen *aph* contenidos en el vector pMV261.

Otras dos construcciones fueron generadas para usarlas como controles de expresión.

Construcción del pJD9710 y del pJD9711. El gen *lacZ* estructural contenido en un fragmento *Pst*I de 3.1 kb liberado del vector pMC1871, fue subclonado sin promotor en el sitio *Pst*I del vector pMV261 en dirección contraria al promotor de *hsp60* para obtener el plásmido pJD9710, y en la misma dirección y en fase con los primeros codones del gen *hsp60* generando el plásmido pJD9711 (figura 5f). La fusión fue verificada por secuenciación nucleotídica.

Con estas construcciones conteniendo las fusiones traduccionales fueron electroporadas *E. coli* MC4100 (*lacZ*) y *M. smegmatis* mc²155 que no expresa actividad de β-galactosidasa (β-gal) endógena. La actividad de la β-gal a partir de estas construcciones en *E. coli* MC4100 (*lacZ*) fue monitoreada sembrando las bacterias



pJD9714

Figura 5d. Esquema de la construcción del plásmido pJD9714. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

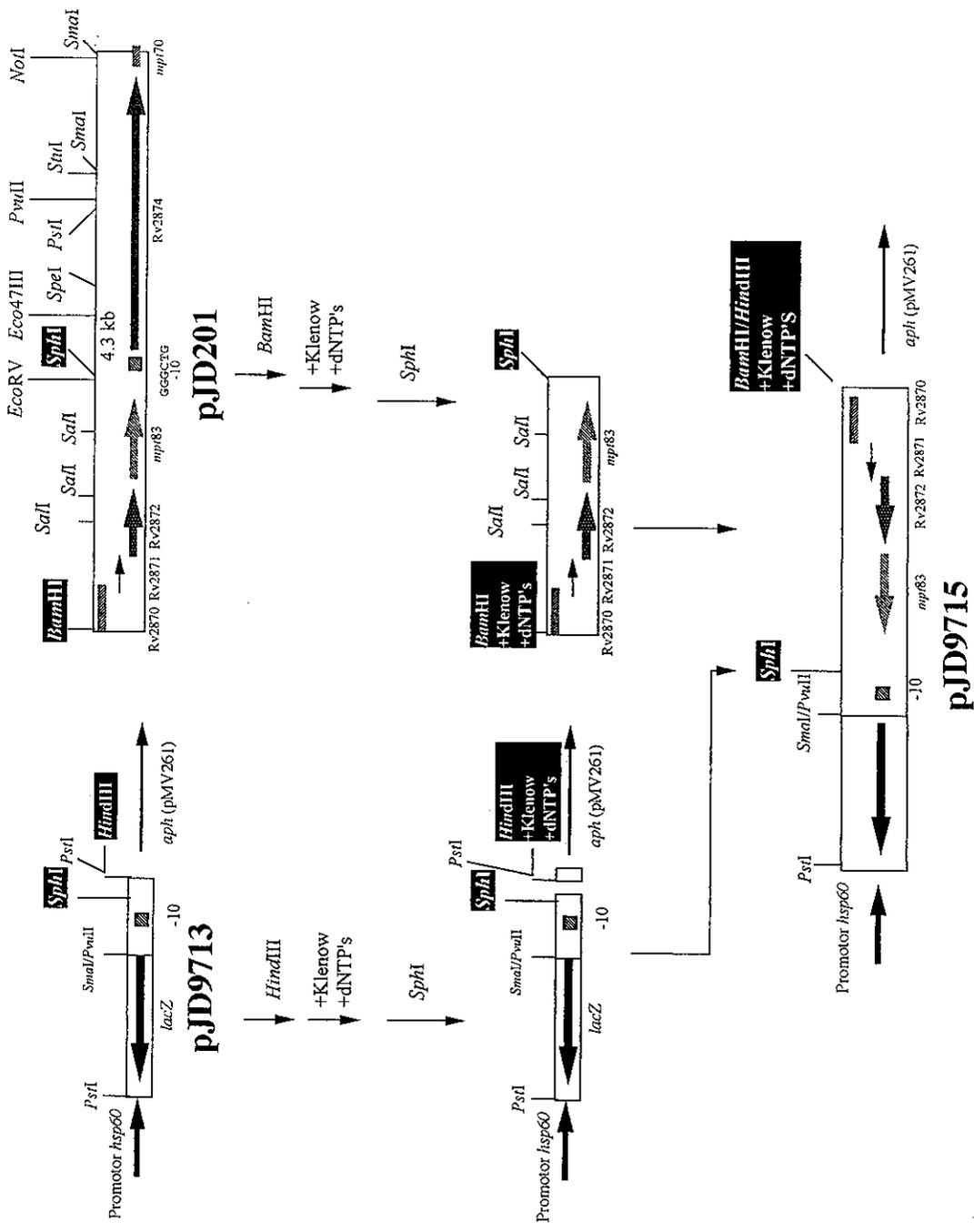


Figura 5e. Esquema de la construcción del plásmido pJD9715. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

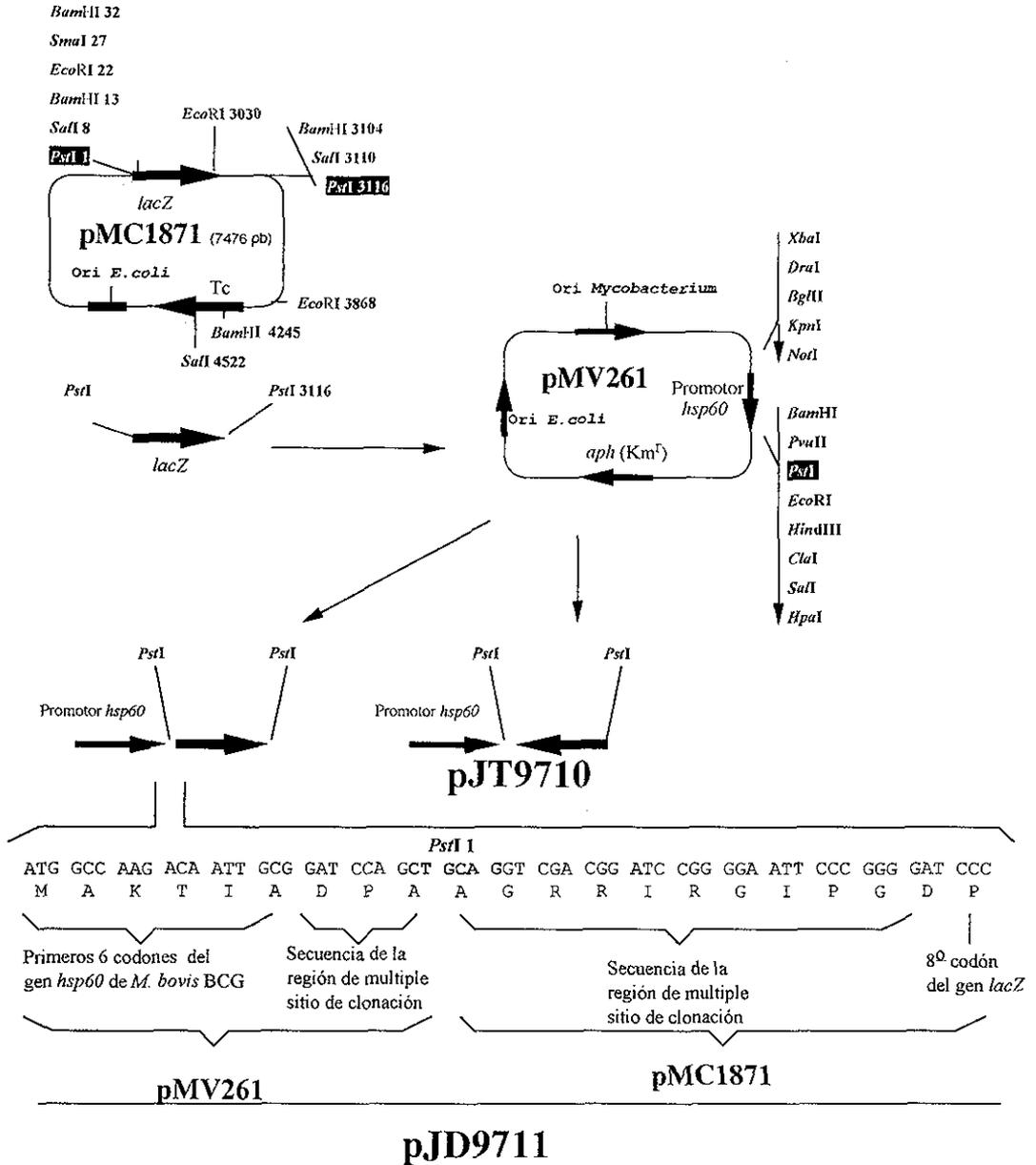


Figura 5f. Esquema de la construcción del plásmidos pJD9711. El mantenimiento del frente de lectura de *lacZ* en esta construcción, fue verificado por secuenciación nucleotídica. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

transformadas en medio LB agar con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de X-gal. La actividad de β -gal en *M. smegmatis* mc²155 transformada con cada una de estas construcciones también fue monitoreada creciendo las micobacterias sobre placas del medio 7H11 agar suplementado con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina y 40 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de X-gal.

Por otra parte, la actividad de la β -gal en *M. smegmatis* transformada con cada uno de los plásmidos pJD9712, pJD9771 y pJD9713, pJD9714 y pJD9715, fue cuantificada como lo describe Miller *et al.*, 1972.

Construcción de fusiones transcripcionales entre el posible operón *mpt83-Rv2874-mpt70* de *M. tuberculosis* y el gen *lacZ* estructural de *E. coli*.

Los diferentes fragmentos de DNA del probable operón *mpt83-Rv2874-mpt70* de *M. tuberculosis*, fueron obtenidos del pJD201 y fueron fusionados transcripcionalmente con el gen *lacZ* sin promotor de *E. coli* en el vector pJEM15 (Tim *et al.*, 1994), como se describe a continuación.

Construcción del pJD20A. Los fragmentos *Eco47III-SmaI* de 1.16 kb y *SmaI-SmaI* de 0.88 kb fueron eliminados del pJD201 y el plásmido linearizado fue ligado sobre sí mismo para producir el pJD2011 (figura 6a). Un fragmento *BamHI-KpnI* de 2.36 kb fue liberado del pJD2011 y después fue subclonado en el pJEM15 digerido con las mismas enzimas para obtener el pJD20A.

Construcción del pJD20B. El fragmento *BamHI-SphI* de 1.95 kb fue eliminado del pJD20A para obtener el pJD20B (figura 6a).

Construcción del pJD20C. Los fragmentos *EcoRV-SmaI* de 1.6 kb y *SmaI-SmaI* de 0.88 kb fueron eliminados del pJD201, y el plásmido resultante fue ligado

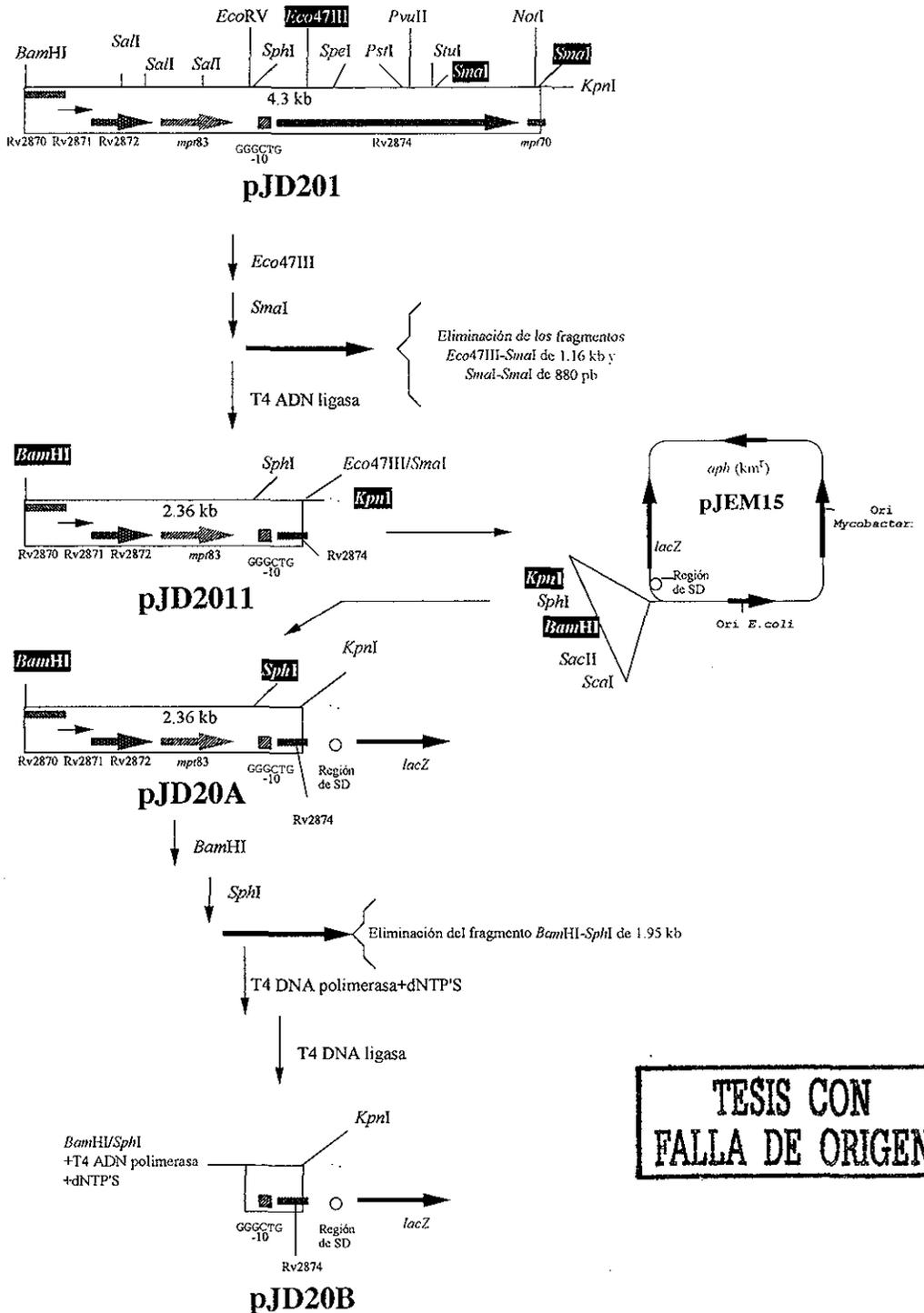


Figura 6a. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD2011, pJD20A y pJD20B. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

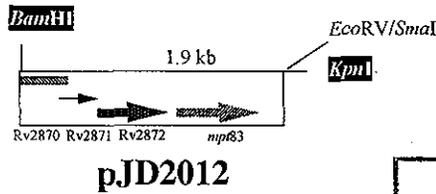
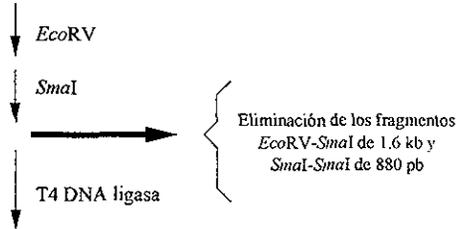
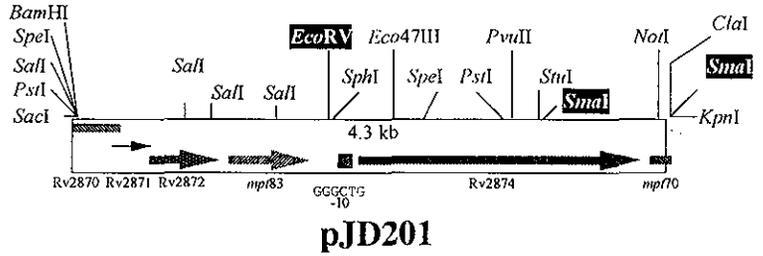
sobre sí mismo para producir el pJD2012 (figura 6b). Después un fragmento *Bam*HI-*Kpn*I de 1.9 kb fue liberado del pJD2012 y subclonado en el pJEM15 digerido con las mismas enzimas, para obtener el pJD20C (figura 6b).

Construcción de los plásmidos pJD20D y pJD20E. El fragmento *Stu*I-*Kpn*I de 0.94 fue liberado del pJD201 y fue subclonado en el pJEM15 digerido con *Scal* y *Kpn*I, para obtener el plásmido pJD20D (figura 6c). La construcción del pJD20E se hizo al subclonar el fragmento *Bam*HI-*Kpn*I de 4.3 kb del pJD201, en el pJEM15 digerido con las mismas enzimas, para generar el plásmido pJD20E (figura 6c).

Construcción del pJD20F. El pJD201 fue digerido con *Sal*I y los extremos cohesivos generados fueron rellenados con la enzima Klenow y una mezcla de dNTP'S. Este plásmido linearizado fue después digerido con *Kpn*I para liberar un fragmento *Sal*I/Klenow+ dNTP'S-*Kpn*I de 2.9 kb, el cual fue subclonado en el pJEM15 digerido con *Scal* y *Kpn*I, para obtener el pJD20F (figura 6d).

Construcción de los plásmidos pJD20I, pJD20G y pJD20H. Digestiones parciales del pJD20C con *Sac*II fueron realizadas para eliminar fragmentos de 1 kb, 0.94 kb y 1.41 kb, y después de ligar sobre sí mismos los plásmidos resultantes con estas eliminaciones, fueron generados los plásmidos pJD20G, pJD20I, pJD20H (figura 7a).

Construcción del plásmido pJD21D. El pJD201 fue digerido con *Eco*47III y *Cla*I, y las terminales *Cla*I cohesivas fueron rellenadas con Klenow y dNTP'S (figura 7b); para obtener el fragmento *Eco*47III-*Cla*I/Klenow+dNTP'S de 1.99 kb y posteriormente subclonarlo en sentido contrario al gen *Rv*2874. Por otra parte, el pJD201 fue digerido con *Eco*47III y *Sma*I para perder los fragmentos contiguos



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

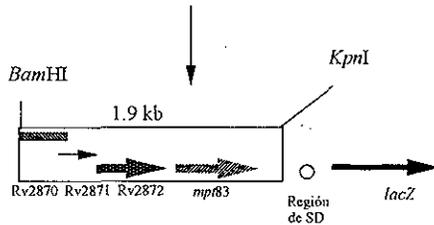
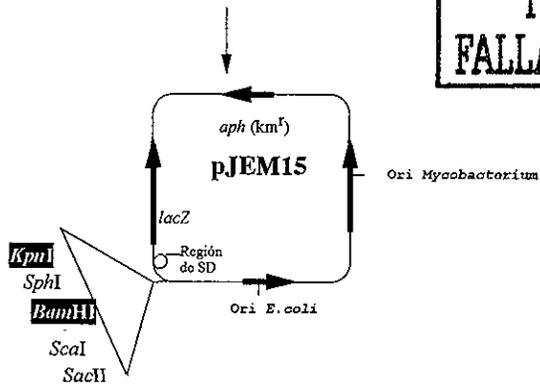
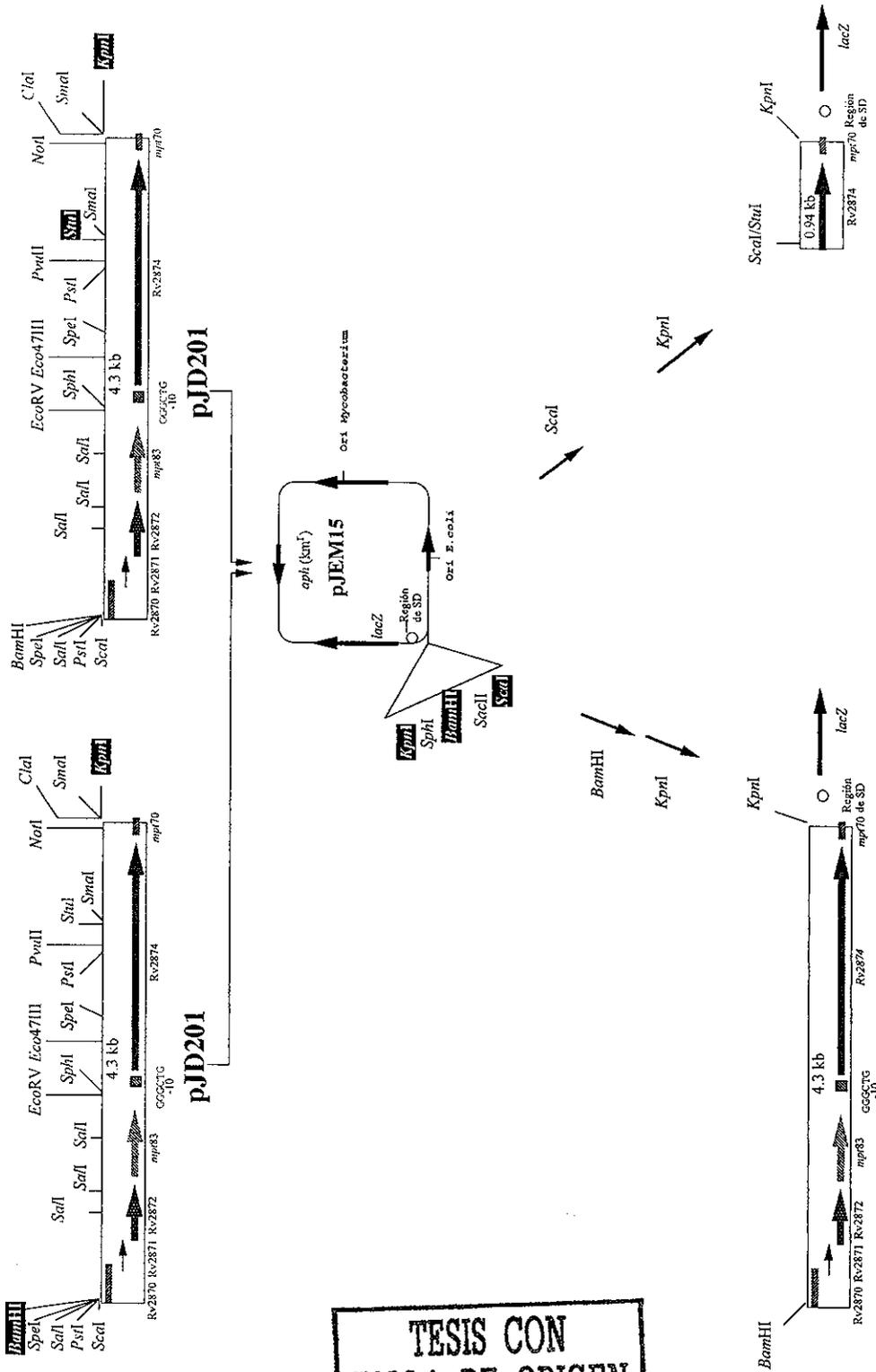
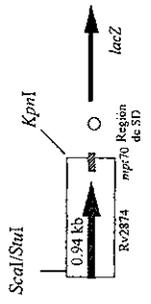


Figura 6b. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD2012, y pJD20C. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.



TESIS CON FALLA DE ORIGEN

pJD20D



pJD20E

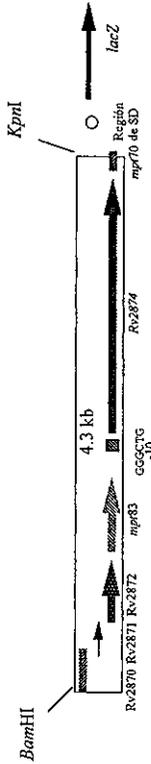
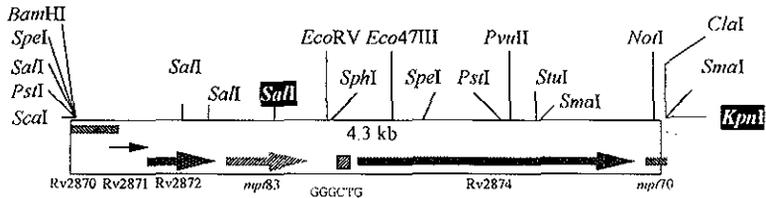
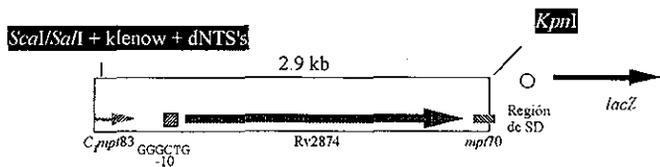
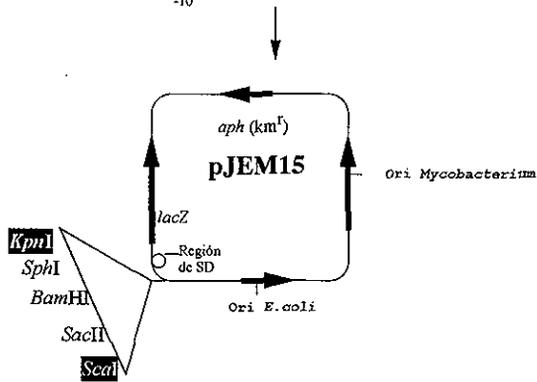
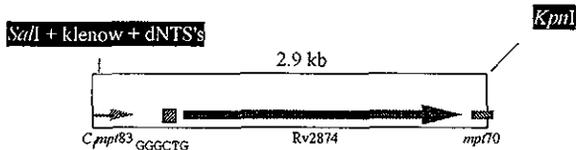
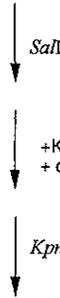


Figura 6c. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD20E y pJD20D. El pJD20E resultó de la subclonación del fragmento BamHI-KpnI de 4.3 kb del pJD201, en los mismos sitios del pJEM15. El pJD20D se obtuvo subclonando el fragmento StuI-KpnI de 0.94 kb del pJD201, en el pJEM15 digerido con Scal-KpnI. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.



pJD201



pJD20F

Figura 6d. Esquema de la construcción del plásmido pJD20F. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

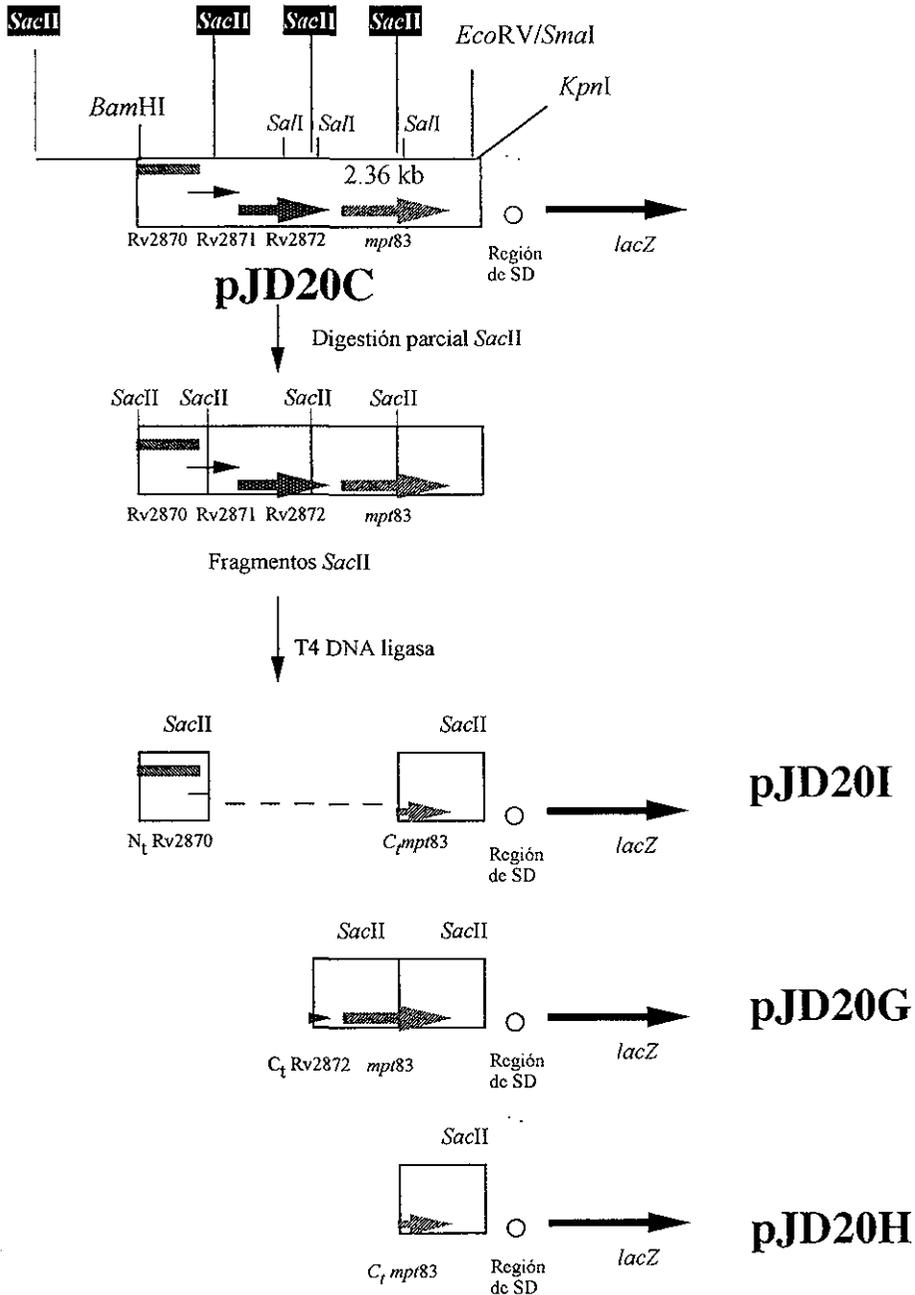


Figura 7a. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD20I, pJD20G y pJD20H. Estas construcciones contienen diferentes fragmentos *SacII* eliminados. La línea discontinúa indica la eliminación de dos fragmentos con *SacII*. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

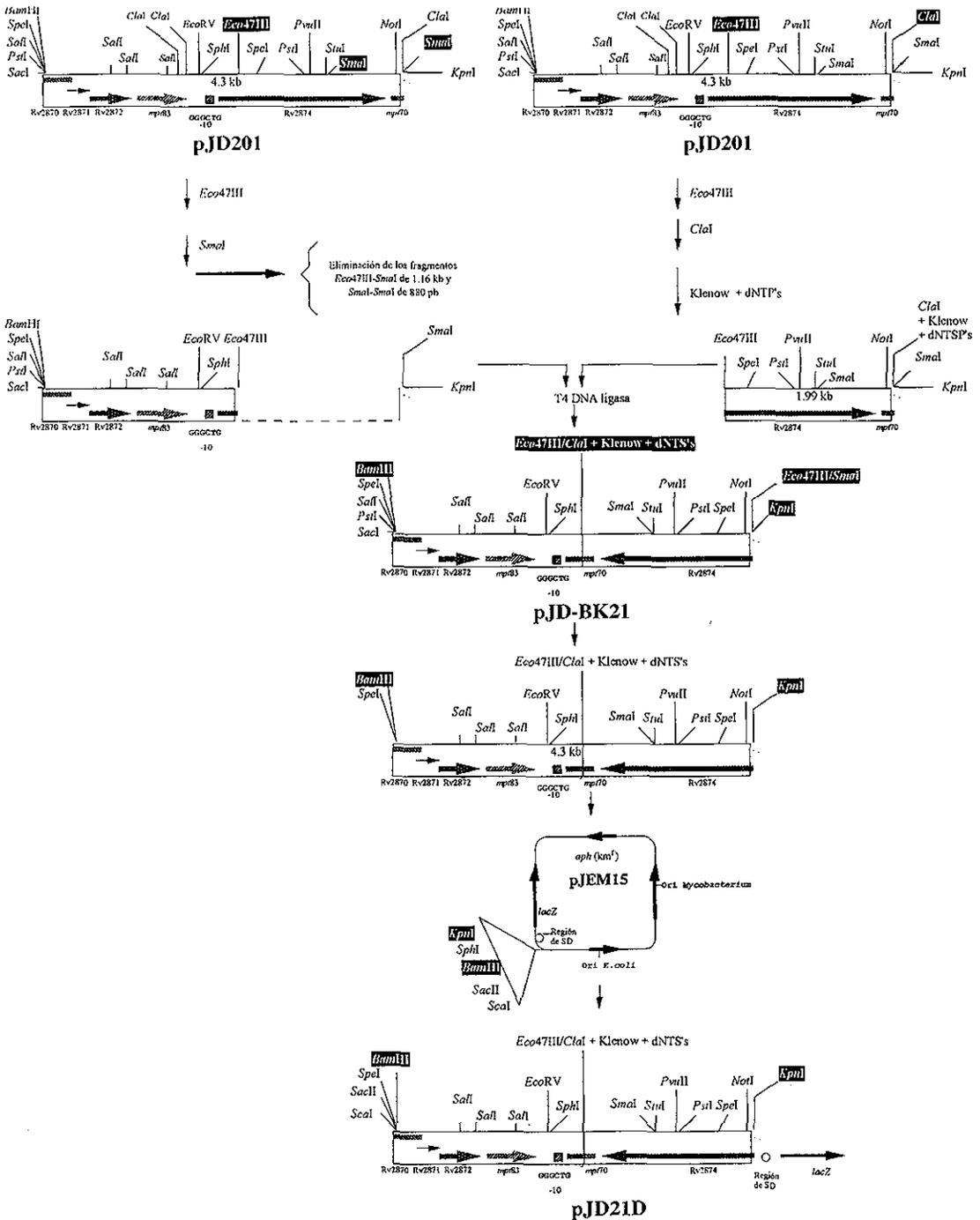


Figura 7b. Esquema de la construcción del plásmido pJD21D. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

Eco47III-SmaI de 1.16 kb y *SmaI-SmaI* de 0.88 kb y en su lugar subclonar el fragmento *Eco47III-Clal/Klenow+dNTP'S* de 1.99 kb, en los sitios *Eco47III-SmaI* del pJD201 (figura 7b). El plásmido resultante pJD-BK21 fue digerido con *BamHI-KpnI* para liberar un fragmento de 4.3 kb, el cual fue subclonado en el pJEM15 digerido con *BamHI-KpnI* para obtener el pJD21D (figura 7b).

Construcción del plásmido pJD21E. Esta construcción se obtuvo por digestión del pJD20E con *SpeI-NorI* para eliminar un fragmento de 1.91 kb y después de llenar las terminales cohesivas con Klenow y dNTP'S, el plásmido fue ligado sobre sí mismo (figura 7c).

Construcción de los plásmidos pJD21F, pJD21G, pJD21H, pJD21I, pJD21J y pJD21K. Los plásmidos pJD2012 y pJD2011, fueron digeridos con *SpeI* y después de rellenar las terminales cohesivas con Klenow y [α -S]-dNTP'S para protegerlas de la enzima exonucleasa III; éstos fueron digeridos con *BamHI* y tratados con la exonucleasa III y la Nucleasa del frijol mungo del estuche de eliminaciones de Stratagene, para generar eliminaciones de la terminal 5' en el extremo digerido con *BamHI* (figura 7d). Los plásmidos derivados del pJD2012 con eliminaciones en terminales 5' de 0.3 kb, 0.4 kb y 0.78 kb y los derivados del pJD2011 también con eliminaciones en terminales 5' de 0.29 kb, 1.3 kb y 1.5 kb, fueron digeridos con *PstI-KpnI* y los fragmentos liberados fueron subclonados en el pUC18 (figura 7d).

Los plásmidos recombinantes generados con pUC18 y derivados del pJD2012 fueron digeridos con *SphI-KpnI* y los fragmentos derivados fueron subclonados en el pJEM15 digerido con las mismas enzimas para obtener el pJD21F, pJD21G y el pJD21H respectivamente (figura 7d).

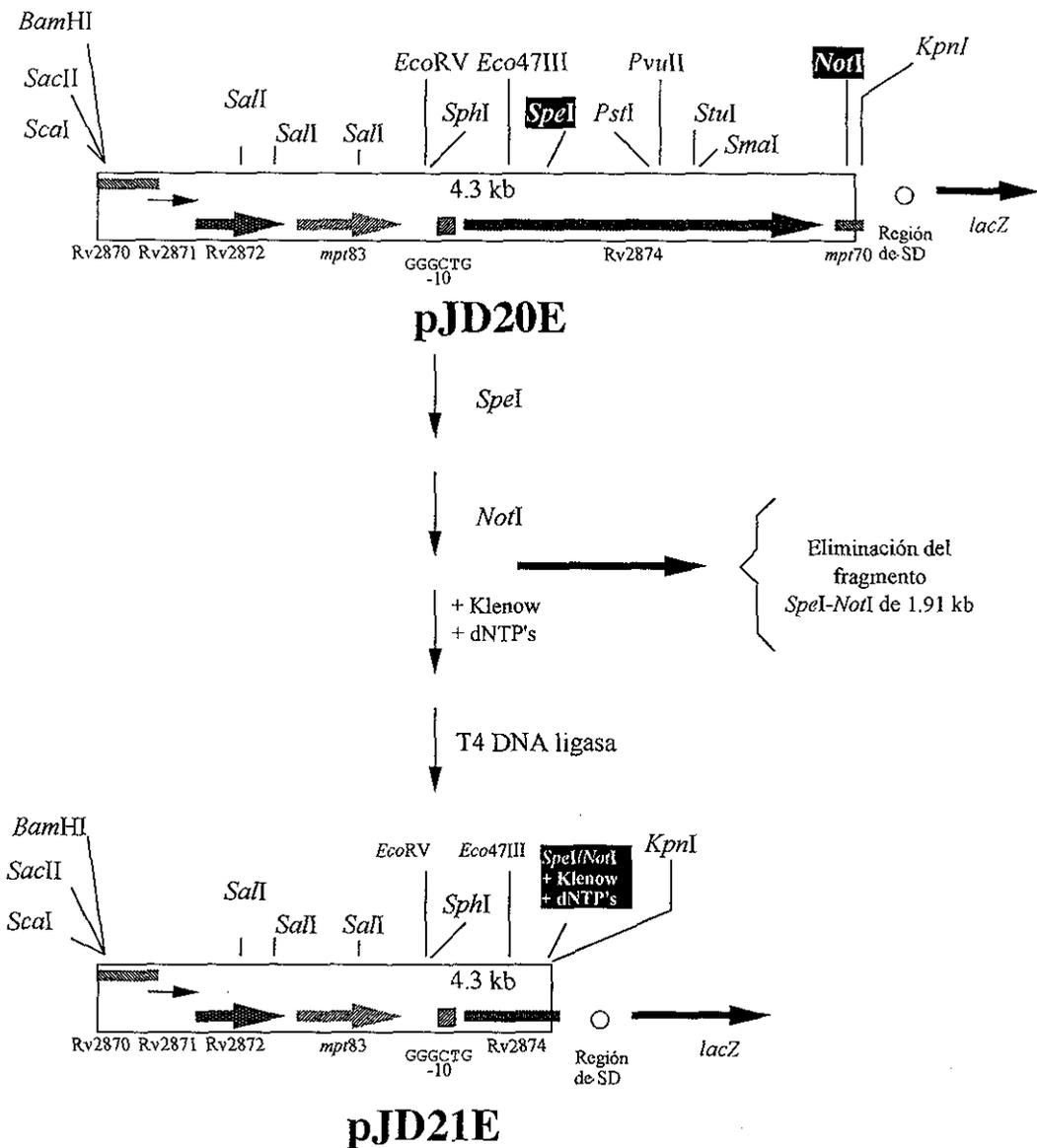


Figura 7c. Esquema de la construcción del plásmido pJD21E. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

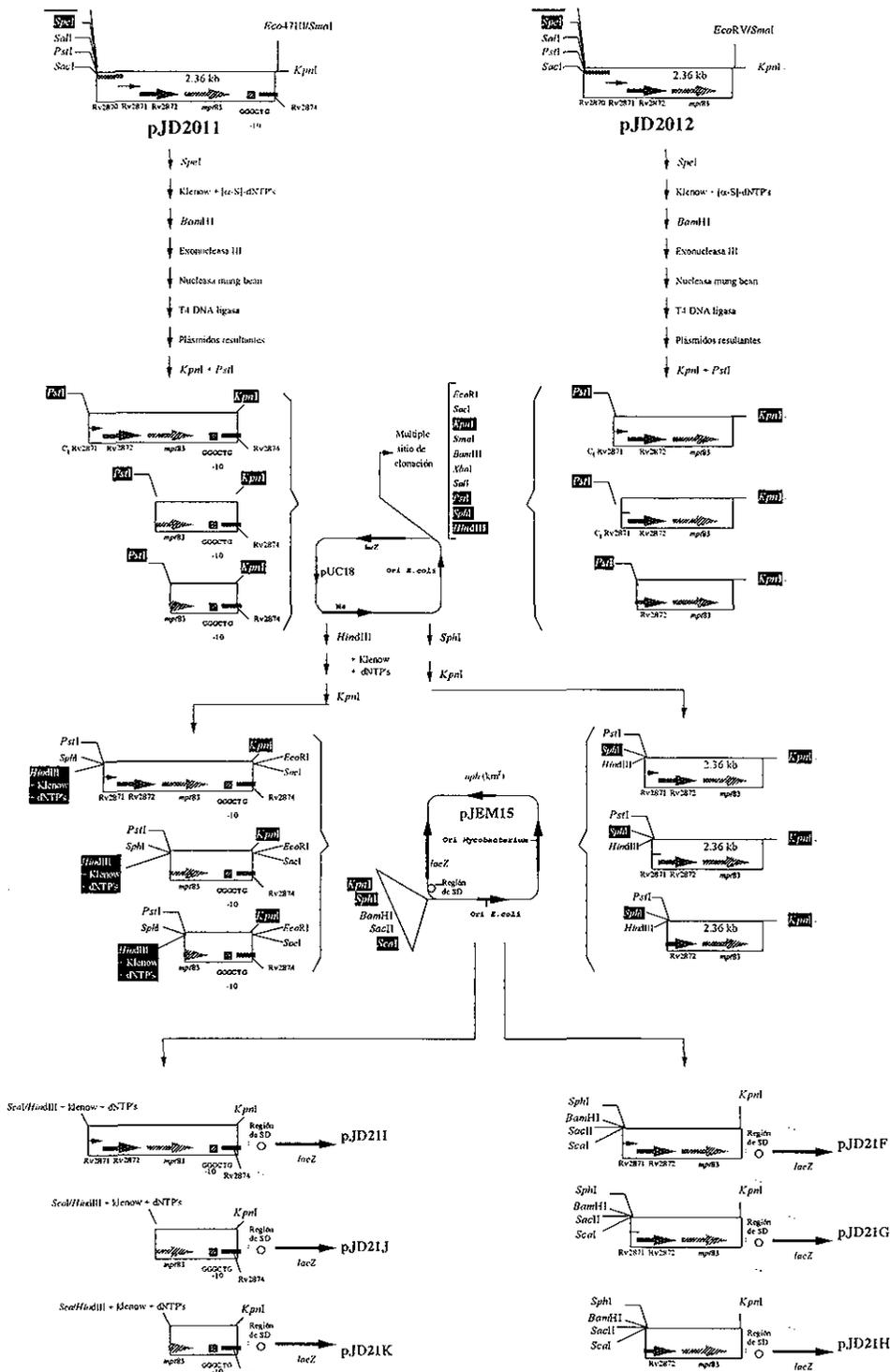
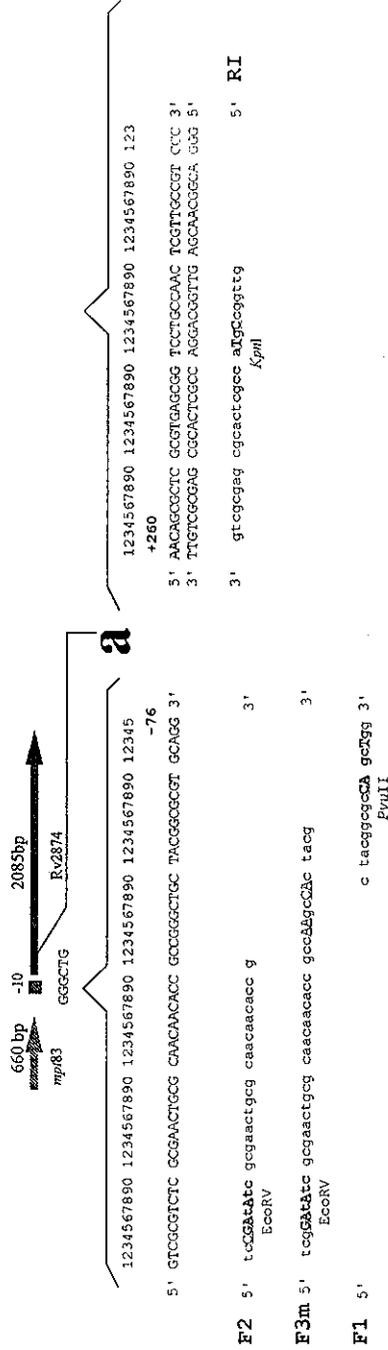


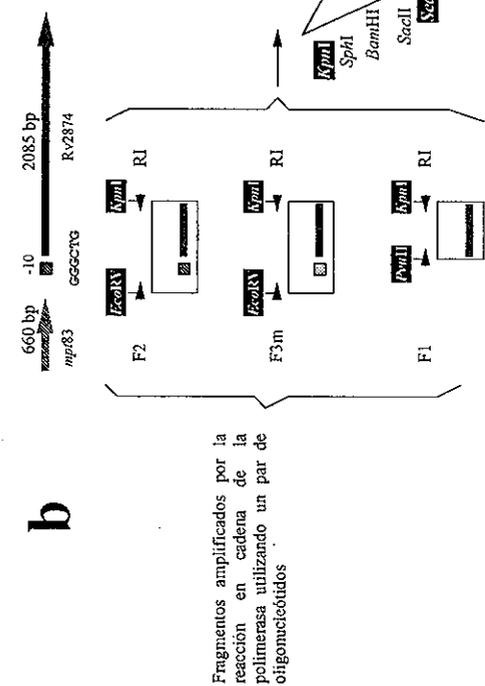
Figura 7d. Esquema de la construcción de los plásmidos pJD211, pJD21J, pJD21K, pJD20F, pJD20G y pJD20H. Diferentes fragmentos de DNA obtenidos del plásmido pJD2011 y del pJD2012, fueron subclonados en el pUC18. Los plásmidos resultantes fueron digeridos con las enzimas indicadas para liberar los fragmentos respectivos y éstos después fueron subclonados en el pJEM15. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las subclonaciones están indicadas con un cuadro negro.

Los plásmidos pUC18 recombinantes derivados del pJD2011, fueron digeridos con *Hind*III y después las terminales cohesivas fueron rellenadas con la enzima Klenow + dNTP'S (figura 7d). Estos plásmidos linearizados fueron digeridos con *Kpn*I y los fragmentos *Hind*III/Klenow + dNTP'S-*Kpn*I fueron subclonados dentro de los sitios *Sca*I-*Kpn*I del pJEM15 para obtener los plásmidos pJD21I, pJD21J y pJD21K (figura 7d).

Construcción de los plásmidos pJD21A, pJD21B y pJD21C. Las construcciones pJD21A conteniendo la región -10 promotora probable del gen Rv2874 de *M. tuberculosis*, el pJD21B albergando esta región -10 probable con cuatro bases nucleotídicas modificadas y el pJD21C sin esta probable secuencia -10, fueron obtenidas amplificando por PCR esta región en el plásmido pJD201, usando un oligonucleótido R1 antisentido común para todas las construcciones, localizado a 280 pb después del codón de inicio del Rv2874 (5'-GTT GGC GGT ACC GCT CAC GCG AGC GCT G-3') y los siguiente oligonucleótidos sentido: F2 para pJD21A, localizado a 96 pb arriba del codón de inicio del Rv2874 (5'-CCG ATA TCG CGA ACT GCG CAA CAA CAC CGC CG-3'), F3m para el pJD21B, localizado a 86 pb del codón de inicio del Rv2874 (las bases que fueron cambiadas para mutagenizar esta probable secuencia -10 están con negritas), (5'-CGG ATA TCG CGA ACT GCG CAA CAA CAC CGC CAA GCC ACT ACG-3') y F1 para pJD21C, localizado a 69 pb arriba del codón de inicio del Rv2874 (5'-CTA CGG CGC CAG CTG GCC GGC G-3') (figura 8a).



Secuencia 5' arriba del gen Rv2874 con respecto al codón de inicio ATG



Fragmentso amplificados por la reacción en cadena de la polimerasa utilizando un par de oligonucleótidos

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

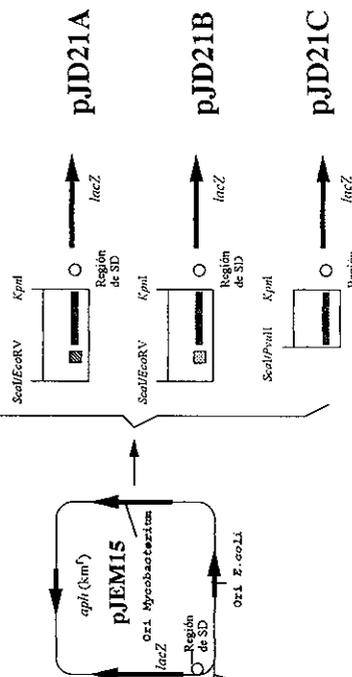


Figura 8. Esquema de la región 5' arriba del gen Rv2874 y construcción de los plásmidos pJD21A, pJD21B y pJD21C. (a) Esquema y secuencia nucleotídica de la región que contiene la probable secuencia -10 promotora del Rv2874 y la posición de los oligonucleótidos F2, F3m y F1, así como la secuencia de la región codificante de este gen, de donde se diseñó el oligonucleótido R1. (b) Los fragmentos de DNA amplificados por PCR, fueron digeridos con las enzimas apropiadas y clonados en el pJEM15. Las enzimas de restricción donde se llevaron a cabo las clonaciones están indicadas por un cuadro negro. Los números -76 y +260, indican la posición con respecto al inicio de la traducción del Rv2874.

Los oligonucleótidos F2 y F3m fueron sintetizados conteniendo un sitio de reconocimiento para la enzima *EcoRV*, y los oligonucleótidos F1 y R1 con un sitio para *PvuII* y *KpnI* respectivamente. Los productos de PCR digeridos apropiadamente fueron clonados en los sitios *ScaI-KpnI* del pJEM15 (figura 8b) y la secuencia nucleotídica de los insertos de DNA fue verificada por secuenciación.

Ensayos de β -galactosidasa.

Colonias únicas de *M. smegmatis* mc² 155 transformada por electroporación con los plásmidos pJD9712, pJD9771, pJD9715, pJD9714, pJD9713, pJD9711 y pJD9710 conteniendo las fusiones traduccionales con *lacZ*, y crecidas sobre placas de medio agar 7H11, fueron cada una cultivadas a 37°C en agitación (200 rpm) con 50 ml de Mílddebrook 7H9 suplementado con 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ de kanamicina, 0.5% glicerol, 2% glucosa y 0.05% Tween 80, hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5. Después los cultivos fueron centrifugados a 5 K rpm por 15 minutos y las pastillas celulares fueron resuspendidas en 1 ml de Mílddebrook 7H9. Posteriormente, en matraces de 250 ml conteniendo 50 ml del medio 7H9 y suplementado como fue descrito anteriormente, más extracto de levadura al 1%, fueron inoculados con una alícuota del cultivo concentrado de cada una de las fusiones para obtener una D.O._{600nm} inicial de 0.05. Estos cultivos fueron crecidos a 37°C en agitación por 96 horas. Alícuotas de 1 ml fueron removidas cada 4 horas para medir la D.O. La actividad de β -gal fue cuantificada con 200 μl de cultivos al inicio de la fase estacionaria.

Colonias únicas de *M. smegmatis* mc² 155 transformada por electroporación con los plásmidos conteniendo las fusiones transcripcionales con *lacZ*, crecidas sobre

placas de medio agar 7H11, fueron cada una cultivadas a 37°C en agitación (200 rpm) con 50 ml de Middelbrook 7H9 suplementado con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina, 0.5% glicerol, 2% glucosa y 0.05% Tween 80. Posteriormente, alícuotas de 1 ml fueron tomadas hasta alcanzar una D.O._{600nm} de 0.5 y después cada 4 horas. Las actividades de β-gal se hicieron con 200 µl de cultivos en la mitad de la fase exponencial de crecimiento. Los ensayos de β-gal fueron realizados de acuerdo al método descrito por Miller *et al.*, 1972. Brevemente, a 200 µl de cultivo se les adicionaron 600 µl de amortiguador Z (60 mM Na₂HPO₄, 40 mM NaH₂PO₄, 10 mM KCl, 1 mM MgSO₄, 50 mM de β-mercaptoetanol, pH 7). Posteriormente se agregaron dos gotas de cloroformo y una gota de 0.01% SDS, la muestra se agitó vigorosamente por 30 segundos y después se le adicionaron 200 µl de *o*-Nitrofenil-β-D-galactopiranosido (ONGP) a 4 mg ml⁻¹ (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 con 500 µl de 1 M Na₂CO₃ y los tubos fueron centrifugados a 14 k rpm por 5 minutos a 4 °C y la lectura a D.O._{420nm} fue determinada del sobrenadante. Las unidades de β-gal fueron calculadas de acuerdo a lo establecido por Miller (1972) usando la siguiente fórmula: $1000 \times DO_{420} / \text{tiempo (minutos)} \times 0.2 \times D.O._{600nm}$.

RESULTADOS

Clonación del gen Rv2874 y del fragmento de DNA conteniendo los genes *mpt83* y *mpt70*.

Un fragmento de 0.7 kb localizado arriba del gen *mpt70*, fue utilizado como detector en un banco de *M. tuberculosis* construido en el cósmido Tropist3 (De Smet *et al.*, 1993) con el objetivo de aislar y clonar el *locus* que contiene los genes *mpt83* y *mpt70*. En esta búsqueda se identificaron tres cósmidos recombinantes, los cuales dieron señal positiva de hibridación. Se determinó por el análisis de restricción del DNA de los tres cósmidos, que éstos contenían fragmentos similares, por lo que el cósmido denominado G1TB-4, fue seleccionado al azar de entre estos tres cósmidos.

El DNA del cósmido recombinante seleccionado fue obtenido y digerido con varias enzimas de restricción. Por Southern blot un fragmento *SmaI* de 2.2 kb, dio señal positiva de hibridación utilizado el detector descrito antes. Este fragmento fue subclonado en el pUC18 (pJD951) y posteriormente en el M13mp18 para su secuenciación nucleotídica. Con el análisis de la secuencia nucleotídica se observó que este fragmento contenía el gen *mpt70* flanqueado en la región 5' por un frente de lectura abierto truncado que codifica para 242 codones y otro frente de lectura abierto completo de 315 pb en la región 3', ambos con la misma dirección que el gen *mpt70* (figura 1).

Con el fin de obtener un fragmento de DNA conteniendo el frente de lectura abierto completo localizado arriba del *mpt70*, se subclonó un fragmento *SmaI* de 3.5 kb del G1TB-4 en el pUC18 (pJD961). La secuencia nucleotídica obtenida de este fragmento junto con la del gen localizado hacia abajo del *mpt70*, fue reportada al Banco de secuencias genómicas "Gene Bank" (número de acceso AF189006). Con el análisis de la secuencia nucleotídica se observó que el fragmento *SmaI* de 3.5 kb contenía al gen *mpt83* truncado, seguido por

un frente de lectura abierto de 2088 pb localizado arriba del *mpt70*, el gen *mpt70* y 32 codones del frente de lectura abierto localizado hacia abajo del *mpt70* (figura 1).

Posteriormente, utilizando el mismo detector descrito anteriormente, se aisló un fragmento *Bam*HI-*Not*I de 4.3 kb del cósmido recombinante GITB-4, el cual contenía 1.14 kb arriba del gen *mpt83*, el *mpt83*, el gen localizado hacia abajo del *mpt83* y 28 codones de la región N-terminal codificada por el gen *mpt70*. Con el reporte posterior de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998), determinamos que el fragmento *Bam*HI-*Not*I de 4.3 kb correspondía a las posiciones 3182758-3187112 del genoma de *M. tuberculosis* y el frente de lectura abierto identificado entre el *mpt83* y el *mpt70* era 100 % homólogo con el gen Rv2874 (figura 1), mientras que el frente de lectura abierto localizado hacia abajo del gen *mpt70* fue 100% homólogo con el gen Rv2876.

Por hibridación Southern blot en condiciones estrictas, determinamos la existencia del gen Rv2874 solo en *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H37Rv y *M. bovis* BCG (figura 9).

Análisis de la secuencia nucleotídica del gen Rv2874.

En este trabajo analizamos la secuencia nucleotídica del frente de lectura abierto identificado entre los genes *mpt83* y *mpt70* y designado como el gen Rv2874 en el proyecto de secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998). Observamos que este frente de lectura abierto comprende 2088 pb, comenzando con el codón ATG de inicio de la traducción del Rv2874 (localizado a 279 pb hacia abajo del codón TAA de término del *mpt83*) y finaliza con el codón de paro TGA (localizado a 94 pb arriba del codón de inicio ATG del *mpt70*) (figura 10). Por otra parte, en la región 5' arriba de este gen, no se encontró alguna secuencia consenso de unión a ribosoma o Shine Delgarno (SD) (figura 10).

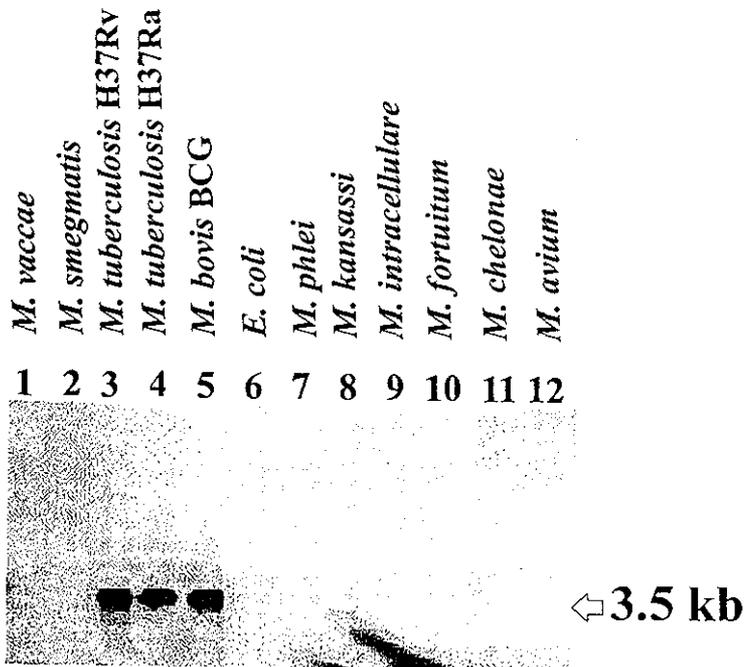


Figura 9. Análisis tipo Southern blot. El DNA genómico de once micobacterias y *E. coli* digerido con *Sa*II, fue hibridado con el fragmento *Eco*RV-*Sma*I de 1.6 kb del gen Rv2874, marcado como se describe en materiales y métodos. La flecha indica la señal positiva de hibridación correspondiente a un fragmento *Sa*II de 3.5 kb.

mpt83 343 gac acc ctc aac ggc ggc gag tac acc gtt ttc gcc ccc acc aac gcc gca ttc gac aag
 D T L N G G E Y T V F A P T N A A F D K
 mpt83 406 ctg ccg gcg gcc act atc gat caa ctc aag act gac gcc aag ctg ctc agc agc atc ctg
 L P A A T I D Q L K T D A K L L S S I L
 mpt83 466 acc tac cac gtg ata gcc ggc cag gcg agt ccg agc agg atc gac ggc acc cat cag acc
 T Y H V I A G Q A S P S R I D G T H Q T
 mpt83 526 ctg caa ggt gcc gac ctg acg gtg ata ggc gcc cgc gac gac ctc atg gtc aac aac gcc
 L Q G A D L T V I G A R D D L M V N N A
 mpt83 586 ggt ttg gta tgt ggc gga gtt cac acc gcc aac gcg acg gtg tac atg atc gat acg gtg
 G L V C G G G V H T A N A T V Y M I D T V
 mpt83 646 ctg atg ccc ccg gca cag taa
 L M P P A Q

-275 cgttcggcg cggTcaaggc gaggcagccc gtgtaggcgg tttgcctcgc tcatccggcg gcttcgtgccc
EcoRV *SphI*

-216 gatagatcac gtgatatccc aagcgcgatga cggtgacacc gcgccacgcy caagccgatc cccgcagcat

-146 gectgtgaa gtcgctctc gcgaactcgc caacaacacc gccgggctgc tacggcgcggt gcaggccggc

-76 gaagacatca ccatactgc caacggcaaa cccgttgccg tgctgaccgc aggcagcccg cacggcgccc

Rv2874 1 atg gtt gag tgc aga cga gct gct gcg gcg gct tgc gca tac gca
 M V E S R R A A A A A S A Y A

Rv2874 46 agc aga tgc ggg att gca ccc gcg acc tgc caa cgc tca ctg gcg
 S R C G I A P A T S Q R S L A

Rv2874 91 aca cca ccg acg atc tgc gtc ccg tcc ggt gag ggc cgc tgc cgt
 T P P T I S V P S G E G R C R

Rv2874 136 tgc cac gtc gca agg ggt gcc ggt cgt gac cca cga cgg cga ctt
 C H V A R G A G R D P R R R L

Rv2874 181 cga cgc cgt cga tgg tgt ggc cga tgt ggc tat cat tgc cat ctg
 R R R R W C G R C G Y H S H L
Eco47III

Rv2874 226 acg ggt ggc gag ttc gac gtg aac cga ctc tgt caa cag cgc tgc
 T G G E F D V N R L C Q Q R S

Rv2874 271 cgt gag cgg tcc tgc caa ctc gtt gcc gtc ccg gca gat cca aga
 R E R S C Q L V A V P A D P R
SpeI

Rv2874 316 cct aaa cgg caa cga ata acc gat gtg ttg acc ctc gca cta gtc
 P K R Q R I T D V L T L A L V

Rv2874 361 ggc ttc ctc ggc ggc ctc atc acc gga ata tca cca tgc att ctg
 G F L G G L I T G I S P C I L

Rv2874 406 ccg gtc ctg cca gta atc ttc ttc tcc ggc gcg cag agc gtc gat
 P V L P V I F F S G A Q S V D

Rv2874 451 gca gcg cag gtg gcg aaa ccc gaa ggc gcc gta gca ctc gcg cgc
 A A Q V A K P E G A V A V R R

Rv2874 496 aaa cgt gcg cta tca gcg aca ttg ccg ccc tac ccg gtg atc ggt
 K R A L S A T L R P Y R V I G

Rv2874 541 ggt ctg gtg ctc agt ttc ggc atg gtc acc ctg ctc ggc tgc gca
 G L V L S F G M V T L L G S A

Rv2874 586 ttg ctg tca gtg ctg cat cta ccg cag gac gcc atc cgc tgg gcc
 L L S V L H L P Q D A I R W A

Rv2874 631 gca ctg gtc gcc ttg gtg gca atc gcc gcc ggc ctc att ttc ccg
 A L V A L V A I G A G L I F P

Rv2874 676 ccg ttt gaa caa ctt ctg gaa aaa ccg ttc tcc cgt att ccg cag
 R F E Q L L E K P F S R I P Q

Rv2874 721 aag caa atc gtc act cgc agc aac ggt ttc ggg ctg ggt cta gcc
 K Q I V T R S N G F G L G L A

Rv2874 766 ctg gcc gtg ttg tat gtc ccc tgc gcc gcc ccg att cta gct gcg
 L G V L Y V P C A G P I L A A

Rv2874 811 atc gtc gtg gcc ggc gct act gcc acc atc ggg ttg gga acc gtc
 I V V A G A T A T I G L G T V

Rv2874 856 gtg ctc acc gcg aca ttc gca ctc gga gcc gcg ttg ccg ttg ttg
 V L T A T F A L G A A L P L L

Rv2874 901 ttc ttc gcc ctc gcc gcc caa ccg ata ggt gag ccg gtg gcc gct
 F F A L A G Q R I A E R V G A

Rv2874 946 ttt ccg cgc ccg cag cgt gag atc agg atc gcc acc ggt tcc gtc
 F R R R Q R E I R I A T G S V

Rv2874 991 acc atc ctg ctg gcg gtg gcg ttg gtc ttc gat ctg ccg gcc ggc
 T I L L A V A L V F D L P A A

Rv2874 1036 ctg cag ccg gct att cct gac tac acc gca tgc ctg cag cag cag
 L Q R A I P D Y T A S L Q Q Q

**TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN**

Rv2874 1081 atc agc acc ggc acg gag ata cgg gaa caa ctg aac ctt ggc ggc
I S T G T E I R E Q L N L G G
PvuII

Rv2874 1126 atc gtc aac gcc cag aac gca **cag** ctg tgc aat tgc agc gac ggc
I V N A Q N A Q L S N C S D G

Rv2874 1171 gcc gca caa ctc cag gaa agc tgc ggc act gca cca gat ctc aaa ggc
A A Q L E S C G T A P D L K G

Rv2874 1216 atc acc ggc tgg ctc aac acg ccc ggc aac aag ccg atc gac ctg
I T G W L N T P G N K P I D L

Rv2874 1261 aaa tca ttg cgt ggc aag gtg gtg ctg att gac ttt tgg gcc tac
K S L R G K V V L I D F W A Y

Rv2874 1306 tcc ~~ggg ggc ggc ggc~~ caa cgg gcc atc ccc cac gtc gtc ggt tgg
S ~~G S S S S~~ Q R A I P H V V G W
StuI

Rv2874 1351 tat **cag** gcc tac aaa gac agt ggt ttg gcg gtc atc ggc gtg cac
Y Q A Y K D S G L A V I G V H

Rv2874 1396 acc ccc gag tac gct ttc gag aag gtc ccg ggc aac gtc gcc aaa
T P E Y A F E K V P G N V A K

Rv2874 1441 ggc ggc gcc aat ctg ggc atc agc tat ccg att gcg ctc gac aac
G A A N L G I S Y P I A L D N

Rv2874 1486 aac tac gcc act tgg acc aac tac cgg aat cgc tat tgg ccc gcc
N Y A T W T N Y R N R Y W P A

Rv2874 1531 gag tat ctg atc gac gct acc ggg acg gtg cgg cac atc aag ttc
E Y L I D A T G T V R H I K F

Rv2874 1576 gga gaa ggc gat tac aac gtc acc gag acg ttg gtc acc gac ttg
G E G D Y N V T E T L V R Q L

Rv2874 1621 ctc aac gat gcc aag ccc ggc gtc aaa ctc ccc cag ccc agc agc
L N D A K P G V K L P Q P S S

Rv2874 1666 acc acc acg ccc gac ctt acc ccg cgg gcc gca ctt act ccc gag
T T T P D L T P R A A L T P E

Rv2874 1711 acg tac ttc gga gtc ggc aag gtg gtc aac tac ggc acc ggc ggc
T Y F G V G K V V N Y G G G G

Rv2874 1756 gca tat gac gaa ggg tgc gcc gtg ttt gac tac ccg ccc agt ttg
A Y D E G S A V F D Y P P S L

Rv2874 1801 gca gcc aac agc ttt gca ctg cgc ggc cgg tgg gcg ctg gac tat
A A N S F A L R G R W A L D Y

Rv2874 1846 cag ggt gcc acg tcc gac ggc aac gac gcc gct atc aaa ttg aat
Q G A T S D G N D A A I K L N

Rv2874 1891 tac cac gcc aaa gac gtc tac atc gtt gtc ggt ggc acc ggc acc
Y H A K D V Y I V V G G T G T

Rv2874 1936 ctc acg gtc gtg agg gac gga aag cca gcc aca cta ccg atc agc
L T V V R D G K P A T L P I S

Rv2874 1981 ggg ccg ccg acc acc cat cag gtg gtc gcc ggc tat ccg ctg gcg
G P P T T H Q V V A G Y R L A

Rv2874 2026 tcc gaa aca ctt gag gtg cgg ccc agc aag ggg cta cag gtt ttt
S E T L E V R P S K G L Q V F

Rv2874 2071 tcc ttc acc tac gga tga 2088
S F T Y G *

atatccatcc aagaccgga cggctccgaa gaaatcatgt cgggggtagc gagaccggac aagccgccgt
ctccggcagc gaaggagtga acggc

mpt70 atg aag gta aag aac aca att gcg gca acc agt ttc gcg gcg gcc ggc ctg gcg gct ctg
M K V K N T I A A T S F A A A G L A A L
NotI

mpt70 gcg gtg gct gtc tca ccg ccg gcg gcc gca
A V A V S P P A A A

Figura 10. Esquema de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos del Rv2874 de *M. tuberculosis*. Las regiones 5' y 3' flanqueantes del Rv2874, contienen la secuencia que codifica la región C-terminal del *mpt83* y la secuencia que codifica la región N-terminal del *mpt70*, respectivamente, son mostradas. a: Probable secuencia -35 de promotores dependientes de Sigma E. b: Probable secuencia -10 promotora de genes de micobacterias identificada en este trabajo. La secuencia codificante del Rv2874 subrayada y dentro de la llave, corresponde a la secuencia del dominio central transmembranal de la proteína codificada por este gen. El probable motivo CINC de disulfuro isomerasa/tioredoxina está indicado con letras con contorno.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Este gen codifica para una probable proteína integral de membrana de 695 aminoácidos con un dominio N-terminal de 115 aminoácidos, una región central transmembranal de aproximadamente 232 aminoácidos con seis probables regiones que atraviesan la membrana determinadas por la escala hidropática de Kyte y Doolittle (1982), y un dominio C-terminal de 348 aminoácidos que contiene un motivo CINC de disulfuro isomerasas/tioredoxinas (aminoácidos 437 al 440), localizado probablemente hacia el lado externo de la membrana celular.

Esta proteína contiene cisteínas conservadas y muestra similitud en la estructura de los dominios con proteínas implicadas en la biogénesis del citocromo c como DipZ de *E. coli* (Crooke y Cole, 1995), *Haemophilus influenzae* (Fleischman *et al.*, 1995) y *Pseudomonas aeruginosa* (Page *et al.*, 1997). Además, el dominio central transmembranal mostró homología del 21% al 28% con la proteína CcdA de *Bacillus subtilis*, y proteínas similares a CcdA de *H. Influenzae*, *Mycobacterium leprae*, *Synechocystis sp.*, *M. tuberculosis*, y del cloroplasto de *Porphyra purpurea* (Schiött *et al.*, 1997) (figura 11a), las cuales también están implicadas en la biogénesis del citocromo c.

En *M. tuberculosis*, el motivo CINC y los aminoácidos alrededor de éste en el dominio C-terminal de la proteína codificada por el gen Rv2874 mostró similitud con el motivo de disulfuro isomerasa/tioredoxina de proteínas como TlpA y CycY de *Bradyrhizobium japonicum* (Loferer *et al.*, 1993; Fabianek *et al.*, 1997), HelX de *Rhodobacter capsulatus* (Beckman y Kranz, 1993) y CcmG de *Paracoccus denitrificans* (Page y Ferguson, 1997) (figura 11b).

El análisis comparativo entre la proteína codificada por el gen Rv2874 y las proteínas DipZ de diferentes bacterias, sugiere que podría considerarse a esta proteína como análoga a las proteínas DipZ y probablemente con alguna actividad similar a ésta.

Figura 11. Comparación de la proteína hipotética codificada por el gen Rv2874 (probable DipZ) de *M. tuberculosis* (M.t DipZp) con proteínas similares a CcdA de *M. tuberculosis* (M.t) Rv0527, *M. leprae* (M.l) número de acceso (n.a.) U00018, *H. influenzae* (H.i) (n.a.) U32823; *H. pylori* (H.p) (n.a. AE000545); *Bacillus subtilis* (B.s) (n.a. X87845); *Aquifex aeolicus* (A.a) (n.a. AE000705); y con proteínas DipZ de *E. coli* (E.c) (n.a. X77707); *H. influenzae* (H.i) (n.a. U32770) y *Pseudomonas aeruginosa* (P.a) (n.a. AF010322). (B) Comparación del probable motivo CINC disulfuro isomerasa/tioredoxina del dominio C-terminal de la proteína codificada por el gen Rv2874 (M.t DipZp) (m) con el motivo disulfuro isomerasa/tioredoxina de las proteínas codificadas por (a) *M. tuberculosis* Rv1470 (M.t TrxA); *M. leprae* (M.l Trx) (n.a. X87899); (C) *E. coli* (E.c TrxA) (n.a. K02845); (d) *Mycoplasma pneumoniae* (M.p Trx) (n.a. U51987); (e) *Synechocystis* sp. (S.s Trx) (n.a. D90899); (f) *Bradyrhizobium japonicum* CycY (B.j CycY) (n.a. P30960); (g) *Rhodobacter capsulatus* (R.c HelX) (n.a. M96013); (h) *B. japonicum* (B.j TlpA) (n.a. Z23140); (i) *Bacillus subtilis* (B.s ResA) (n.a. Z99116); (j) *Neisseria gonorrhoeae* (N.g Trx) (n.a. U76418); (k) *Pseudomonas fluorescens* (P.f TipB) (n.a. P52237); (l) *M. tuberculosis* Rv0526 (M.t Trx), (n) *E. coli* (E.c DipZ); (ñ) *H. influenzae* (H.i DipZ), (o) *Pseudomonas aeruginosa* (P.a DipZ); y con proteínas CcmG de (p) *Paracoccus denitrificans* (P.d CcmG) (n.a. Z71971) y (q) *E. coli* (E.c CcmG) (n.a. P33926). Los números a la derecha de la secuencia indican las posiciones de los aminoácidos con respecto al inicio de cada secuencia de proteínas. Los aminoácidos conservados están impresos con letras más negras. Los segmentos transmembranales están indicados por las letras y las líneas horizontales. +, aminoácidos adicionales están presentes en el dominio C-terminal hidrofílico.

Modelo topológico de la proteína codificada por el gen Rv2874.

El modelo topológico del gen Rv2874 de *M. tuberculosis*, el cual codifica para una proteína análoga a la proteína DipZ de *E. coli* propuesto en este trabajo, está basado en los segmentos transmembranales predichos por la escala de hidrofobicidad de Kate y Doolittle como fue descrito anteriormente, y por la regla de los aminoácidos con carga positiva localizados en las asas del lado interno de la membrana celular, las cuales flanquean a las hélices transmembranales (von Heijne, 1992).

Con este modelo topológico se predijeron seis segmentos transmembranales (a, b, c, d, e, y f), con una longitud mínima de 21 aminoácidos para cada hélice alfa extendiéndose en la membrana (figura 12), el cual coincide con los segmentos transmembranales predichos para los productos genéticos relacionados.

Tomando en cuenta la orientación de las regiones transmembranales de esta proteína, en este modelo también se considera la localización del dominio N-terminal, en el lado externo de la membrana celular, como se ha sugerido para la proteína DipZ de *E. coli*. Por medio del algoritmo para la predicción de péptidos señales (SignalP) en la dirección <http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP>; se determinó un posible péptido señal con un sitio de corte probable entre los aminoácidos R68 y C69. Considerando este análisis, los aminoácidos a partir del C69 hasta el aminoácido V115 del dominio N-terminal estarían localizados hacia el exterior de la membrana celular. En este modelo, de acuerdo a la disposición de los segmentos transmembranales de esta proteína, el dominio C-terminal también estaría localizado hacia el lado externo de la membrana celular.

Expresión del dominio C-terminal recombinante sin el motivo de tioredoxina His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa y con el motivo de tioredoxina His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa, de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*.

Se hicieron dos construcciones para expresar el dominio C-terminal hidrofílico de la proteína codificada por el gen Rv2874, fusionadas a un tallo de seis histidinas N-terminal como se describió en materiales y métodos. La primera construcción pJD974 contenía 311 codones de este dominio con el motivo de disulfuro isomerasa/tioredoxina; la cual expresó la proteína His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa. La segunda construcción pJD953 contenía 242 codones del dominio C-terminal sin el motivo de tioredoxina y expresó la proteína His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa.

Por electroforesis en poliacrilamida-SDS al 12%, de una alícuota de los extractos totales, se observó un doblete para ambas construcciones (figura 13). Con el objetivo de determinar si la secuencia que codifica el dominio C-terminal del Rv2874 fusionada al tallo de polihistidina, expresaba el doblete protéico, u otra secuencia dentro de la construcción también estaba expresando una proteína; una de las construcciones (pJD953), fue digerida con cada una de las enzimas *Pst*I, *Sal*I y *Not*I, para eliminar 0.62 kb, 0.64 kb y 1.2 kb respectivamente de la región 3' hacia abajo de la secuencia codificante del dominio C-terminal, o con *Sma*I para eliminar 0.86 kb de la región 5' codificante del dominio C-terminal del Rv2874 fusionado con el tallo de polihistidina (figura 14). Los plásmidos linearizados resultantes fueron ligados sobre sí mismos y la expresión del doblete de 30/34 kDa fue analizada en *E. coli* DH5 α IQ transformada con cada uno de éstos plásmidos e inducida con IPTG por 5 horas (figura 15). Por medio del análisis de la expresión de estas construcciones se determinó que efectivamente las dos bandas de proteínas de 30 y 34 kDa fueron expresadas por la secuencia codificante de la región C-terminal del gene Rv2874.

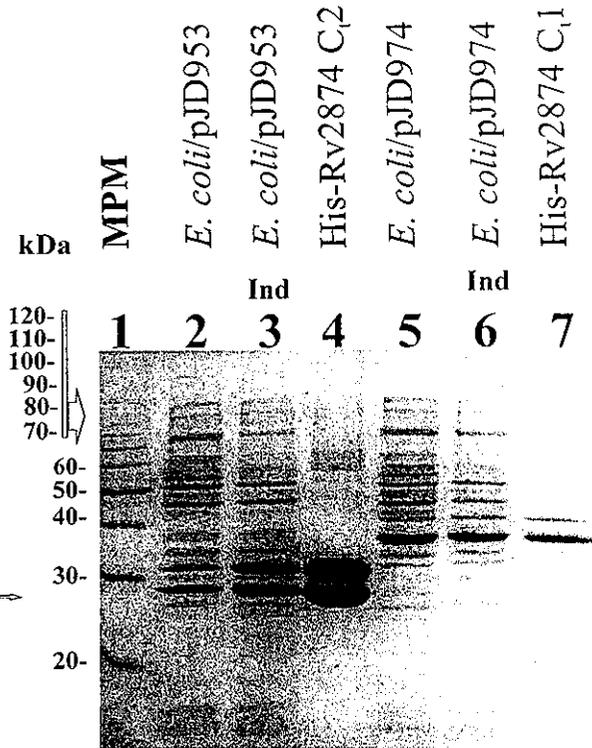
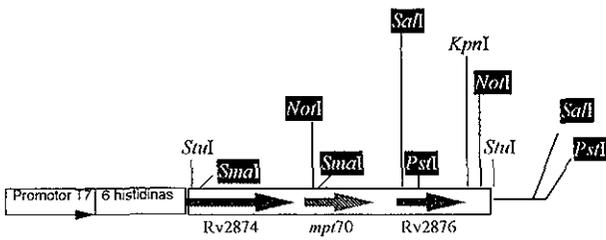


Figura 13. Expresión de las proteínas recombinantes His-Rv2874C₁ y His-Rv2874C₂. Electroforesis en un gel de poliacrilamida-SDS al 12% y tinción con coomassie de las proteínas del sonicado total de *E. coli* DH5 α IQ transformada con el pJD953 (2 y 3), *E. coli* DH5 α IQ transformada con el pJD974 (5 y 6). Cultivos con inducción (Ind) de 1mM de IPTG por 5 horas, con la expresión incrementada de la proteína His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa (3) o de la proteína His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa (con el motivo de disulfuro isomerasa/tioredoxina) (6). Las proteínas His-Rv2874C₂ y His-Rv2874C₁ purificadas por afinidad a níquel (4 y 7). Marcador de peso molecular de 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110 y 120 kDa (1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

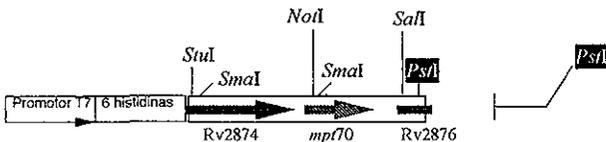


2.1 kb

pJD953

EXPRESION DE LA PROTEINA
His-Rv 2874 C₂ DE 30/34 kDa

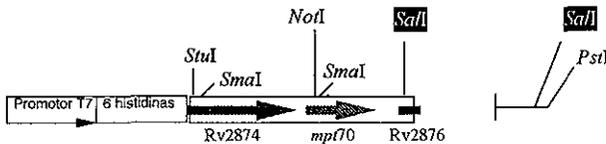
SI



1.48kb

pJD953.1 (Δ PstI)

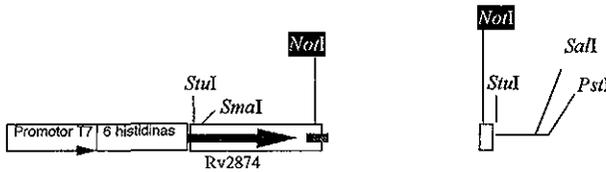
SI



1.45 kb

pJD953.2 (Δ SalI)

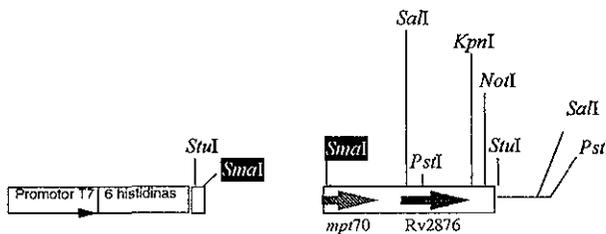
SI



850 pb

pJD953.3 (Δ NotI)

NO



1.25 kb

pJD953.4 (Δ SmaI)

Figura 14. Esquema de las eliminaciones de fragmentos de DNA del plásmido pJD953. La eliminación de los fragmentos PstI de 0.62 kb, SalI de 0.64 kb, NotI de 1.2 kb y SmaI 0.86 kb y recircularización generó los plásmidos pJD953.1, pJD953.2, pJD953.3 y pJD953.4 respectivamente. La expresión o ausencia de la proteína His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa se indica a la derecha.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

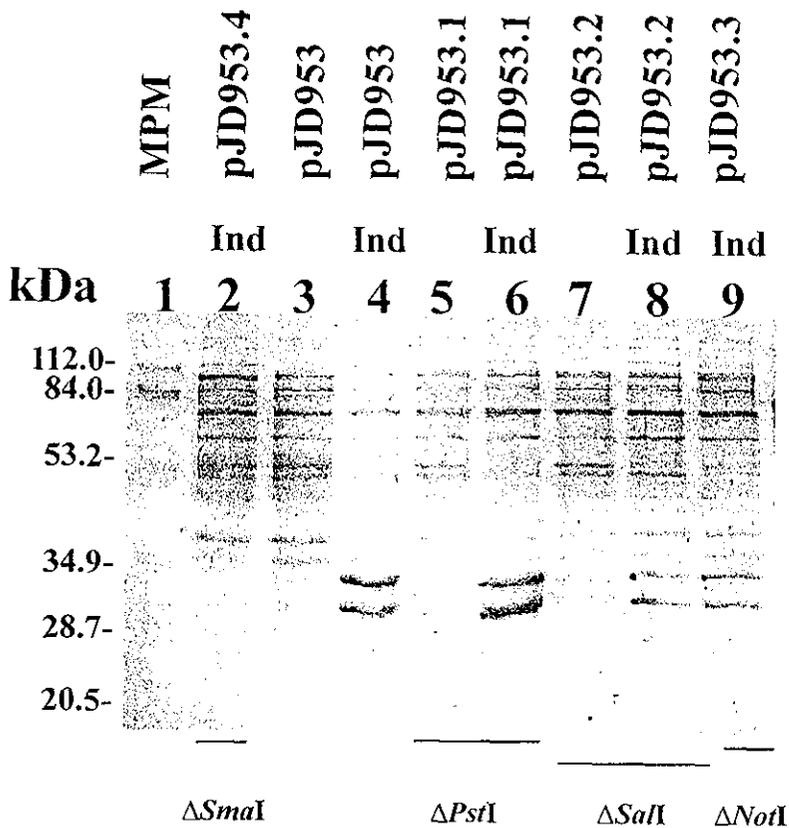


Figura 15. Análisis de la secuencia de DNA responsable de la expresión de la proteína His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa, por eliminación de fragmentos de DNA del plásmido pJD953. Electroforesis en gels de poliacrilamida-SDS al 12% de los sonicados totales de *E. coli* DH5 α IQ transformada con el plásmido pJD953 (3 y 4), con el pJD953.1 (5 y 6), con el pJD953.2 (7 y 8), con el pJD953.3 (9) y con el pJD953.4 (2). Marcador de peso molecular (MPM) (1). Cultivos de toda la noche sin inducción (3, 5, 7). Cultivos inducidos (Ind) con 1 mM de IPTG por 5 horas (2, 4, 6, 8 y 9).

Posteriormente, ambas proteínas His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa y His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa fueron inicialmente purificadas por cromatografía de afinidad a níquel, después fueron separadas en geles de poliacrilamida-SDS al 12% y transferidas a membranas de nitrocelulosa, de donde se obtuvieron las bandas protéicas, las cuales fueron pulverizadas y se utilizaron para inocular ratones Balb/c y así generar sueros policlonales en el ratón. El suero obtenido contra la proteína His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa reaccionó también contra la proteína His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa (figura 16).

Inmunodetección de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*.

En el sonicado total y filtrado de cultivo de *M. tuberculosis* H37Rv, no se detectó la proteína nativa codificada por el gen Rv2874, por inmunoblot usando el suero policlonal de ratón contra la proteína His-Rv2874-C₁1 de 36/40 kDa o contra la His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa.

La expresión de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* transformada con los plásmidos recombinantes pJD964 y pJD966 (expresión a partir de la región 5' arriba de este gen), fue analizada en los sonicados totales de los cultivos de estas bacterias, por medio de inmunoblot con el suero policlonal de ratón dirigido contra el dominio C-terminal recombinante de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*. Sin embargo, la proteína estimada de 72 kDa y codificada por este gen no fue detectada por inmunoblot. El mismo resultado fue obtenido con *E. coli* HB101 transformada con el pJD964 o el pJD966. Estos resultados nos sugirieron que probablemente los sistemas de expresión de *M. smegmatis* y *E. coli* no reconocieron la secuencia promotora de este gen, o que dicha región no estaba presente en el fragmento 5' arriba del gen Rv2874, o que esta región promotora si estaba contenida en las

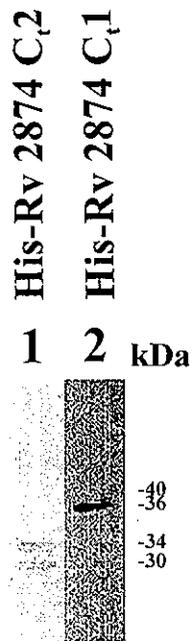


Figura 16. Inmunodetección de las proteínas recombinantes His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa de y His-Rv2874C₁ 30/34 kDa purificadas por afinidad a níquel, usando un suero policlonal de ratón generado contra la proteína recombinante His-Rv2874C₂.

construcciones realizadas, pero debido a un promotor débil, su expresión fue muy baja y no fue detectable por este método.

Por inmunoblot, tampoco se observó la expresión de la proteína recombinante de 62 kDa constituida por los primeros codones del gen *hsp60* de *M. tuberculosis* (codificados dentro de la secuencia de múltiples sitios de clonación del pMV261), seguidos por el dominio central transmembranal y el dominio C-terminal hidrofílico codificados por el gen Rv2874. Esta proteína fue expresada por el promotor del gen de estrés térmico (*hsp60*), en *M. smegmatis* transformada con el pJD9641. La ausencia de expresión de esta proteína recombinante podría ser debida a que la sobre-expresión del dominio transmembranal por un promotor fuerte, pudiera generar un efecto citotóxico y que por esta razón tal expresión fuera inhibida por algún mecanismo desconocido de la célula. Otra posibilidad podría ser que la proteína recombinante no fuera estable y hubiese sido degradada. Sin embargo, no se observó algún producto de degradación en el inmunoblot en los extractos bacterianos.

La expresión de una construcción similar bajo el control de un promotor inducido por IPTG en *E. coli* transformada con el (pJD9651), que codifica para una proteína híbrida que contiene un tallo de polihistidinas N-terminal fusionado en fase con el dominio central transmembranal y seguido por el dominio C-terminal hidrofílico de la Rv2874, ocasionó un efecto citotóxico, pues aún sin inducir la expresión de la proteína recombinante, se observó un crecimiento escaso y cuando se adicionó el IPTG a los cultivos, no observamos crecimiento durante las 2 y 4 horas de inducción.

Por otra parte, en la fracción de membranas celulares de *M. tuberculosis*, de *M. bovis* BCG, de *M. smegmatis* y de *M. smegmatis* transformada con el plásmido pJDP964, obtenidas por ultracentrifugación o por el método de Pages y Lazdunski, (1982), así como en los sonicados totales de los cultivos, tampoco se detectó por inmunoblot la proteína hipotética codificada por el gen Rv2874 de 72 kDa. Resultados similares han sido

observados con las proteínas MPT83 y MPT70, las cuales no son detectadas por inmunoblot en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG Pasteur crecidas *in vitro* (Hewinson *et al.*, 1996).

La proteína recombinante His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa no fue reconocida por sueros de pacientes con TB.

Los nueve sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar (reactivos contra proteínas del extracto total de *M. tuberculosis*) y los sueros de personas sanas, no mostraron reactividad contra la proteína His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa, por inmunoblot. A pesar de que el número de sueros ensayados no fue significativo, este resultado podría indicarnos que la región C-terminal codificada por el gen Rv2874 no es inmunogénica.

Sin embargo, estos resultados no son concluyentes y no debe descartarse la posibilidad de que la región C-terminal de la proteína codificada por el Rv2874 pudiera presentar alguna arreglo conformacional, que pudiera no estar presente en la proteína recombinante purificada por afinidad a níquel en condiciones desnaturizantes, haciendo difícil su reconocimiento por el suero de los pacientes con TB.

La no detección de la proteína nativa codificada por el Rv2874, por inmunoblot, usando el suero policlonal dirigido contra las proteínas recombinantes His-Rv2874-C₁ de 36/40 kDa o His-Rv2874-C₂ de 30/34 kDa en los extractos totales, filtrado del cultivo o fracciones de membrana de *M. tuberculosis*; nos permitió suponer que la expresión de la proteína nativa es basal y difícil de inmunodetectar por esta técnica. Sería difícil suponer que los sueros policlonales dirigidos contra las formas desnaturizadas de las proteínas recombinantes, no fueron capaces de reconocer la proteína nativa. Por lo que estas observaciones nos inclinan a suponer que la proteína codificada por el Rv2874 podría ser no inmunogénica y expresada a bajos niveles.

Ensayo de la reducción de Insulina con la proteína recombinante His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa.

Para determinar si la proteína hipotética codificada por el Rv2874 tenía actividad de tioredoxina, las proteínas recombinantes His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa (con el motivo de tioredoxina) y His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa (sin este motivo), purificadas por inmunoafinidad (figura 17) como se describió en materiales y métodos; fueron analizadas junto con la enzima tioredoxina de *E. coli*, en el ensayo de reducción de puentes disulfuro de la insulina.

En este ensayo, no se detectó alguna actividad de tioredoxina con la proteína His-Rv2874C₁ o con la His-Rv2874C₂, en comparación con la tioredoxina de *E. coli*, la cual sí mostró actividad; empleando 1 μ M de cada proteína (figura 18).

Análisis de la expresión del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* por RT-PCR.

Debido a la no detección del producto proteico del gen Rv2874 de *M. tuberculosis*, se decidió analizar la expresión de este gen por medio de experimentos de RT-PCR con el RNA total de *M. tuberculosis* crecida en medio Sauton. Sin embargo, debido a la baja concentración del RNAm de este gen y del *mpt83*, fue necesario repetir varias veces las reacciones de RT-PCR para poder observar la amplificación de los fragmentos esperados a partir del DNAc sintetizado en la reacción de RT y no a partir del DNA contaminante. En la mayoría de los casos, fue necesario reamplificar los productos de PCR una vez que éstos fueron solamente observados en las reacciones de RT-PCR efectuadas con transcriptasa reversa y no en las reacciones llevadas a cabo sin transcriptasa reversa.

Estas reacciones se hicieron utilizando oligonucleótidos hexámeros iniciadores con secuencias sintetizadas al azar, los cuales fueron hibridados con el RNA y extendidos con la transcriptasa reversa. Las combinaciones de oligonucleótidos iniciadores MT9-MT3,



Figura 17. Proteínas recombinantes His-Rv2874C₂ y His-Rv2874C₁ purificadas por inmunoafinidad. Electroforesis en gel de poliacrilamida-SDS al 12% y tinción con coomassie de las proteínas His-Rv2874C₂ de 30/34 kDa y His-Rv2874C₁ 36/40 kDa, purificadas por inmunoafinidad, usando los sueros policlonales de ratón dirigidos contra la proteína His-Rv2874C₂ y His-Rv2874C₁, respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

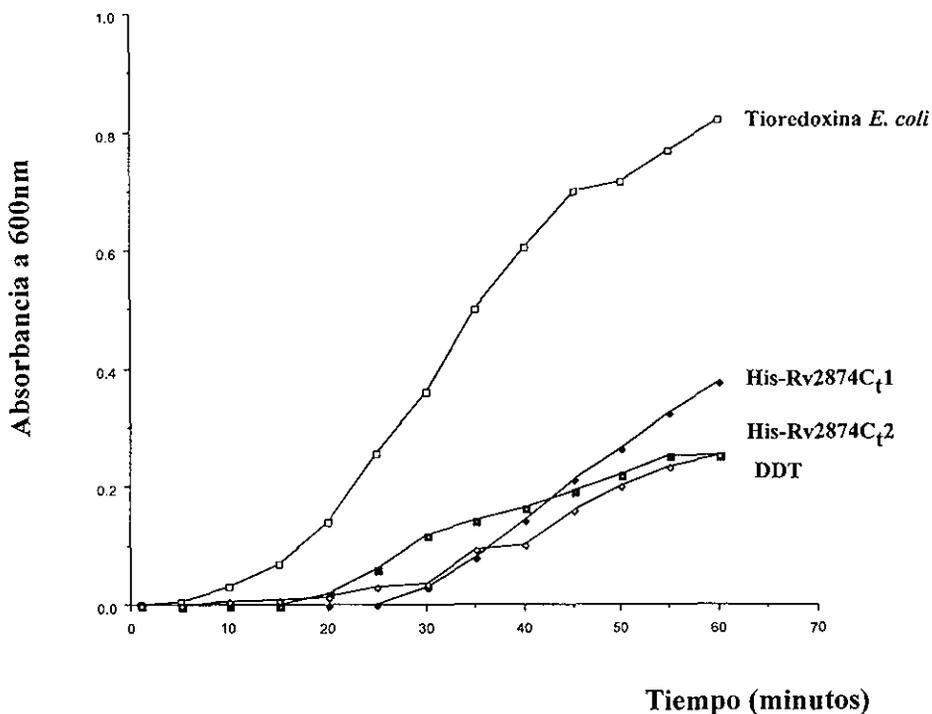


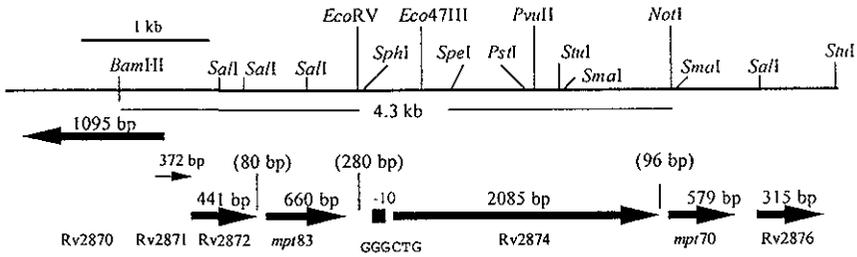
Figura 18. Ensayo de reducción de insulina. Las proteínas: Tioredoxina de *E. coli*, His-Rv2874C₁ (con el motivo CINC) y His-Rv2874C₂ fueron incubadas con 0.1 M de amortiguador de fosfato de potasio pH 6.5 conteniendo 0.2 mM de EDTA y 1 mM de DDT por 45 minutos a 25°C. El buffer conteniendo solo el DDT sirvió como control de la reducción de la insulina por DDT no catalizada. La reacción fue comenzada por la adición de insulina pancreática bovina (concentración final de 0.13 mM) y la precipitación de las cadenas reducidas y libres de la insulina fue seguida por el incremento en la densidad óptica a 600 nm. Los datos fueron colectados cada 5 minutos.

MT9-MT6 y MT5-MT1 fueron usados para amplificar el DNAc obtenido en las reacciones de RT. Los tamaños de los productos de PCR esperados se muestran en la figura 19. Las reacciones del control positivo de expresión se hicieron usando los oligonucleótidos iniciadores 16S1 y 16S2 para el gen 16S ribosomal (16S RNAr) (figura 19). Los productos de PCR de los tamaños esperados fueron obtenidos del RNA del gen Rv2874 y del gen 16S RNAr (figura 19), pero las amplificaciones del gen Rv2874 y del gen 16S RNAr no se obtuvieron cuando el paso de transcripción reversa fue omitido (figura 19). Estos resultados confirman que los productos obtenidos provienen del RNA y no de DNA contaminante. Estos resultados indican además que el gen Rv2874 se expresa en *M. tuberculosis*.

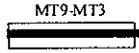
La cotranscripción del gen Rv2874 con el gen *mpt83* también fue analizada por RT-PCR con los oligonucleótidos MT11-MT7. Se observó el producto de PCR esperado de 0.95 kb, sugiriendo que ambos genes pudieran estar formando una unidad transcripcional (figura 20).

Fusiones traduccionales del gen Rv2874 con el gen estructural *lacZ* de *E. coli*.

Con la finalidad de determinar si la región promotora del gen Rv2874 estaba localizada entre el *mpt83* y el Rv2874 y cuantificar el nivel de expresión de este gen, el cual no pudo ser inmunodetectado; primero fueron construidas dos fusiones traduccionales, el pJD9712 y el pJD9771 con 383 codones del gen Rv2874 fusionados con el gen *lacZ* estructural (ambas) y con 598 pb y 195 pb arriba del codón de inicio del Rv2874, respectivamente (figura 5a y 5b). También se hicieron dos construcciones para ser usadas como controles de expresión (figura 5f), las cuales se describieron en materiales y métodos. Los resultados obtenidos mostraron que los cultivos de *M. smegmatis* mc²155 transformada con el pJD9712 y con el pJD9771 en el medio 7H9, produjeron actividades de β -gal de 6.25 y 5.68 veces con respecto al control negativo (pJD9710) (figura 21).



Producto
esperado
kb
1.07



0.37



0.13

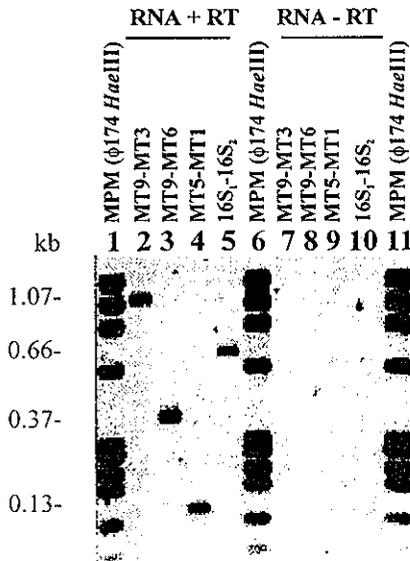
MT5-MT1



16S ARNr

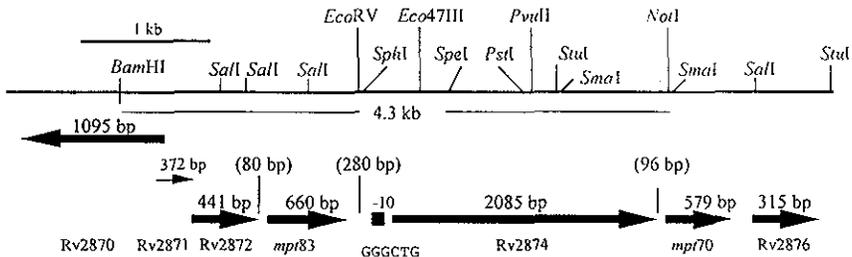


0.66

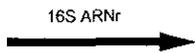


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

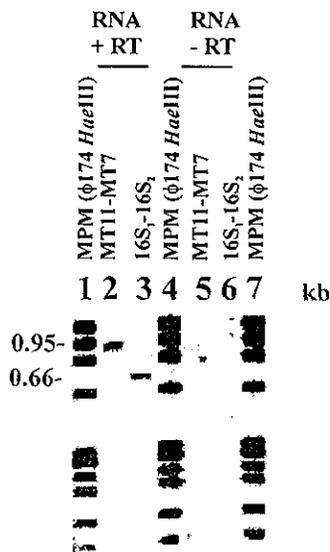
Figura 19. Análisis de la expresión del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* por medio de transcripción reversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR). Los productos de RT-PCR esperados de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos son mostrados como barras en el esquema de arriba y sus tamaños son indicados a la derecha. Los productos obtenidos por PCR a partir del RNA total de *M. tuberculosis* seguido de un paso de transcripción reversa (RNA+RT) o cuando el paso de transcripción reversa fue omitido (RNA-RT), usando la combinación de oligonucleótidos indicados arriba de los productos, son mostrados y los tamaños observados son señalados a la derecha. Marcador de peso molecular (MPM) ϕ X174 digerido con *Hae*III (carriles 1, 6 y 11). El tamaño de los productos obtenidos se muestra a la derecha.



Producto
esperado
kb
0.95

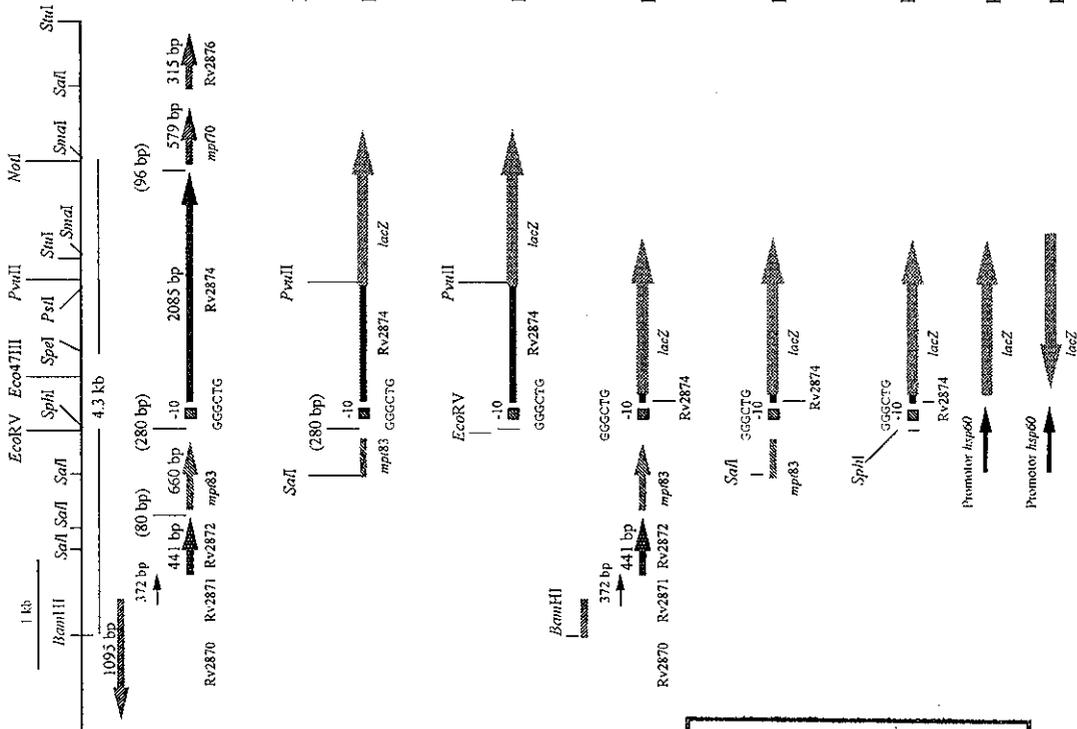


0.66



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 20. Análisis de la cotranscripción del *mpt83* y el *Rv2874* de *M. tuberculosis* por medio de RT-PCR. Los productos de RT-PCR esperados de las diferentes combinaciones de oligonucleótidos son mostrados como barras en el esquema de arriba y sus tamaños son indicados a la derecha. Los productos obtenidos por PCR a partir del RNA total de *M. tuberculosis* seguido de un paso de transcripción reversa (RNA+RT) o cuando el paso de transcripción reversa fue omitido (RNA-RT), usando la combinación de oligonucleótidos indicados arriba de los productos, son mostrados y los tamaños observados son señalados a la derecha. Marcador de peso molecular (MPM) ϕ X174 digerido con *Hae*III (carriles 1, 4 y 7).



Plásmido	Actividad de la β-galactosidasa (Unidades)	Expresión con respecto al pJD9710
pJD9712	1.39±0.35	6.25
pJD9771	1.20±0.40	5.68
pJD97715	2.14±0.60	10.14
pJD9714	1.31±0.40	6.2
pJD9713	0.81±0.20	3.8
pJD9711	417±45	1980.0
pJD9710	0.21±0.09	1.0

Figura 21. Esquema de la región cromosomal de *M. tuberculosis* conteniendo el locus *mpi83-mpi70* y las fusiones traducionales de esta región con *lacZ*. Las unidades de β-gal y la expresión obtenida con respecto al plásmido pJD9710 (control negativo) son mostrados a la derecha de la figura. Las actividades obtenidas con el pJD9711 (control positivo) también son indicadas. Los datos son presentados como el promedio de tres experimentos.

Las actividades obtenidas con estas construcciones revelaron que en los 195 pb arriba del codón de inicio del gen Rv2874 (pJD9771) podría estar contenida una secuencia promotora responsable de la expresión de este gen. Por otra parte, los valores de las actividades de β -gal obtenidas con estas construcciones fueron bajas en comparación con el control positivo (pJD9711) de 1980 veces mayor que el control negativo.

Con el propósito de determinar si en estas construcciones, los valores obtenidos se debieron a la presencia de una región promotora débil o por el contrario, a una expresión mayor que la cuantificada pero con la translocación de la β -gal hacia el lado externo de la membrana celular, debido a la fusión de *lacZ* con la parte final de la región codificante del dominio central transmembranal del Rv2874; los soncados totales de los cultivos de *M. smegmatis* transformada con cada uno de los plásmidos pJD9712, pJD9771 y el pJD9711 se utilizaron para detectar la β -gal con un anticuerpo anti β -gal (Roche) por inmunoblot. Sin embargo, el anticuerpo sólo detectó la β -gal del pJD9711 (figura 22), indicando que las actividades de β -gal obtenidas fueron debidas principalmente a un nivel bajo de la expresión de estas construcciones, descartando una expresión mayor a la observada con una β -gal en la parte exterior de la membrana celular sin actividad.

Por otra parte, para analizar si las bajas actividades de β -gal podrían también deberse a que las construcciones expresaron la β -gal en el exterior de la membrana celular; se construyeron otras tres fusiones traduccionales: el pJD9713, el pJD9714 y el pJD9715 (figuras 5c, 5d y 5e), con tres codones del gen Rv2874 fusionados con *lacZ* y 280, 598 y 2089 pb arriba del codón de inicio del Rv2874, respectivamente. Las actividades de β -gal de *M. smegmatis* mc²155 transformada con estas construcciones también fueron bajas (figura 21). Estos resultados nos hacen suponer que en *M. smegmatis*, el gen Rv2874 es expresado pero a un nivel basal. Además, la actividad expresada por el pJD9715 fue de 10.14 veces con respecto al vector, por lo que con este resultado podríamos suponer que la

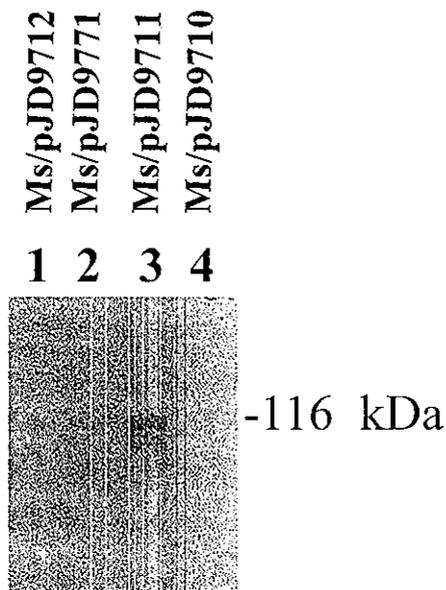


Figura 22. Inmunodetección de β -galactosidasa. La detección de la β -galactosidasa en las fusiones traduccionales con *lacZ*, fue llevada a cabo con un suero anti- β -galactosidasa, en los sonicados totales de *M. smegmatis* transformada con los plásmidos pJD9712 (1), pJD9771(2), pJD9711 (3) y pJD9710 (4).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

región 5' adicional de 1.48 kb arriba del Rv2874 contenida en el pJD9715 y ausente en los plásmidos pJD9713 y pJD9714, también contribuyó a elevar la expresión de este gen.

Análisis de la probable región promotora del gen Rv2874 de *M. tuberculosis*.

El análisis de la secuencia nucleotídica entre el *mpt83* y el Rv2874 de *M. tuberculosis*, mostró una región -10 probable (GGGCTG) a 91 pb arriba del codón ATG de inicio de la traducción del Rv2874, ésta presenta cuatro bases iguales (las cuales se indican subrayadas) con la región -10 del promotor del antígeno 85A de *M. tuberculosis* (CGCCTG) y con la región -10 del promotor *ask* de *M. smegmatis* (ACGCTG) reportadas por Kremer *et al.*, (1995) y Cirillo *et al.*, (1994), respectivamente (figura 23). Esta región -10 probable del Rv2874 también presenta bases idénticas con secuencias promotoras de *Streptomyces* como la región -10 del promotor de *afsA* (Horinouchi *et al.*, 1989) y del promotor 2 de *vph* (Strohl, 1992) (figura 23a). Estos genes frecuentemente no son expresados en *E. coli* (Strohl, 1992).

La región -35 probable del Rv2874 presenta solo 2 bases idénticas con la región -35 de los promotores 85A y *ask* micobacterianos, y cuatro bases con la región -35 de los promotores de *afsA* y *vph* de *Streptomyces* (figura 23a).

Por otra parte, también fue observada una secuencia -35 probable (GCGAACT) a 113-120 pb arriba del codón ATG de inicio de la traducción del Rv2874 que recuerda la región -35 probable (CGGAACT) propuesta para los genes que codifican los factores sigma E (Lonetto, 1994; Wei y Beer, 1995; Wu *et al.*, 1997; Manganelli *et al.*, 2001); sigma H (Raman *et al.*, 2001) y sigma R (Paget *et al.*, 1998); así como la región promotora de algunos genes de *M. tuberculosis* y *Streptomyces* inducidos por algunos de estos factores sigma (sigma E, sigma H y sigma R), en respuesta a condiciones de estrés (figura 23b).

Una secuencia similar está presente también a 149-157 pb arriba del codón de inicio GTG de la traducción del gen *dipZ* de *E. coli* (figura 23b).

Estos factores sigma pertenecen a la familia de factores sigma extracitoplásmicos o ECF (abreviado del inglés extracytoplasmic sigma factors), que se ha observado que regulan la expresión génica en respuesta a condiciones ambientales en diversas especies bacterianas, incluyendo la supervivencia seguida del estrés *in vivo* (Wu *et al.*, 1997; Jensen-Cain y Quinn *et al.*, 2001). Tres de estos factores sigma identificados en *M. tuberculosis* (sigma B, sigma E y sigma H) son inducidos por estrés a temperatura; además sigma B y sigma E responden a exposición a SDS y también sigma E y sigma H responden a estrés oxidativo (Raman *et al.*, 2001; Manganeli *et al.*, 2001)

Caracterización de la probable región -10 localizada en la región reguladora del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* por mutagénesis de sitio dirigida y por fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* estructural de *E. coli* sin promotor.

Con la finalidad de evaluar si la probable secuencia promotora -10 (GGGCTG) localizada a 91 pb arriba del codón ATG de inicio de la traducción del Rv2874, conducía la transcripción de este gen; se construyeron tres plásmidos: el pJD21A, el pJD21B y el pJD21C; conteniendo el primero, la probable secuencia -10 promotora; el segundo, la secuencia -10 con cuatro bases modificadas e indicadas con letras más negras (AAGCCA) y el tercero sin la probable secuencia -10; estas secuencias se fusionaron transcripcionalmente con el gen reportero *lacZ* sin promotor, como se describió en materiales y métodos (figuras 8a y 8b). Los cultivos de *M. smegmatis* transformada con las construcciones pJD20B y pJD21A, crecidos a mitad de la fase logarítmica, mostraron un incremento en la actividad de β -gal de 33 y 54 veces con respecto al control pJEM15. Por el contrario, la actividad de β -gal fue dramáticamente reducida cuando la secuencia de la

región -10 promotora probable fue cambiada (pJD21B) o eliminada (pJD21C) (figura 24). Estos resultados nos permiten sugerir que esta región contiene una secuencia importante para la activación del gen Rv2874, la cual podría constituir una secuencia promotora -10 del gen Rv2874.

Análisis de la expresión del probable operón *mpt83*-Rv2874-*mpt70* por medio de fusiones transcripcionales con el gen *lacZ* estructural de *E. coli*.

El gen Rv2874 de *M. tuberculosis* está localizado entre los genes *mpt83* y *mpt70*, éstos codifican para proteínas antigénicas, y que son importantes en la respuesta inmune durante las infecciones con el bacilo de la tuberculosis humana y bovina (Hewinson *et al.*, 1996). En el genoma de *M. tuberculosis* se localizan arriba del *mpt83* dos genes: el Rv2871 y el Rv2872, los cuales codifican proteínas hipotéticas con funciones desconocidas (figura 1), mientras que hacia abajo del *mpt70* está localizado el Rv2876, que codifica una proteína similar a una isoenzima glutamina sintetasa. Todos estos genes son transcritos en la misma orientación y podrían estar formando un operón.

Para dilucidar si la expresión del gen Rv2874 está relacionada con la expresión de los genes *mpt83* y *mpt70*, diferentes regiones de DNA conteniendo este probable operón, fueron fusionadas transcripcionalmente con el gen estructural *lacZ* contenido en el vector pJEM15, como se describió en materiales y métodos (figuras 6a-d y 7a-d).

La expresión del Rv2874 a partir de un promotor localizado arriba del *mpt83* fue examinada por comparación de las actividades de β -gal del pJD20B con el pJD20A y con el pJD20C. El incremento en la actividad de β -gal del pJD20A fue dos veces más alta que la observada con el pJD20B y con el pJD20C, lo cual sugiere la presencia de una o más secuencias promotoras localizadas arriba del *mpt83* (figura 24). Para explorar esta posibilidad, se realizaron construcciones con diferentes eliminaciones del extremo 5' con

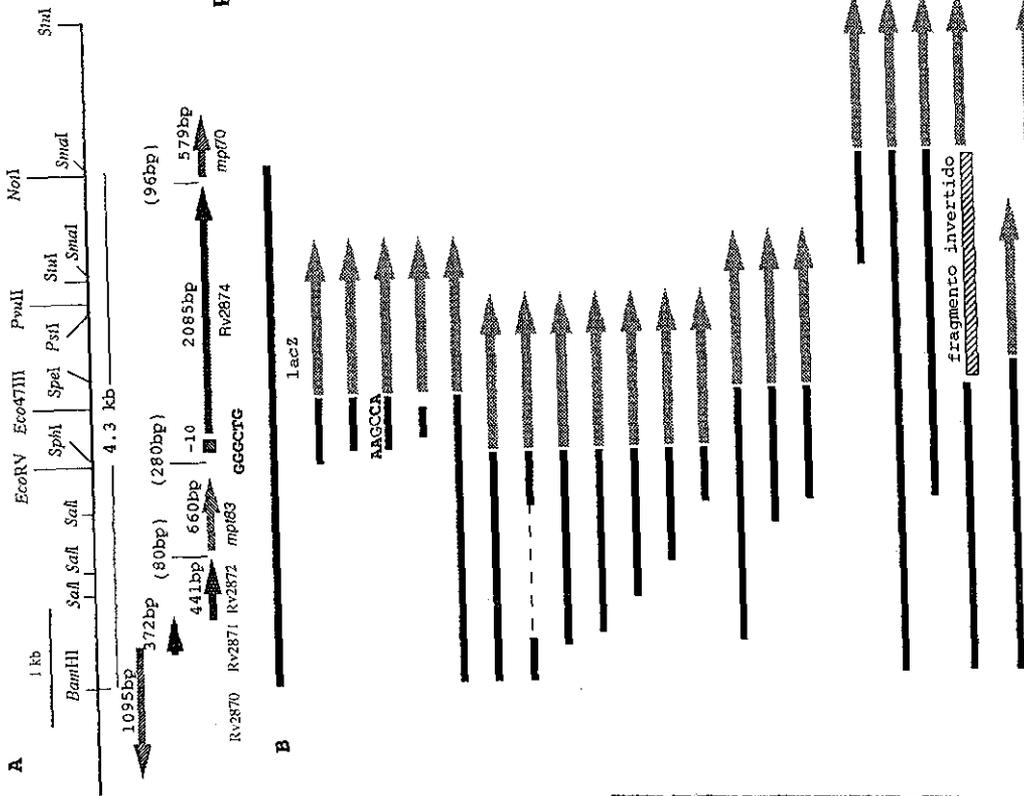


Figura 24. A: Esquema de la región cromosomal de *M. tuberculosis* H37Rv conteniendo el gen Rv2874. B: Fusiones transcripcionales del locus *mp183*-Rv2874-*mp70* con *lacZ* y el control negativo de expresión (pJEM15). La línea punteada indica la eliminación de un fragmento de DNA. Las unidades de β -gal y la expresión con respecto al control negativo son mostradas a la derecha de la figura. Los datos son presentados como el promedio de tres experimentos.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

respecto al *mpt83* y posteriormente las actividades de β -gal fueron evaluadas. Las actividades de β -gal disminuyeron pero no se abolieron: el pJD20I generó una actividad de β -gal 73 veces mayor que el control negativo, el pJD21F y el pJD21G, de 21 veces con respecto al control negativo; el pJD21H y el pJD20G, de 16 veces y el pJD20H de 12 veces, las cuales concuerdan con la presencia de secuencias promotoras arriba del Rv2871, Rv2872, y *mpt83*, e incluso abajo del *mpt83* (figura 24). El efecto de estos probables promotores sobre la expresión del Rv2874 fue también evaluada con las construcciones pJD21I, pJD21J y pJD21K. Las actividades de β -gal obtenidas fueron menores a las obtenidas con el pJD20A, indicando la existencia de un promotor localizado arriba del Rv2871 (figura 24).

Por otra parte, no se detectó actividad de β -gal con la construcción pJD20D (figura 24), la cual contiene 1110 pb arriba del codón de inicio de la traducción del *mpt70* y 83 pb de su región codificante. Este resultado se correlacionó con la expresión no detectable del *mpt70* en *M. smegmatis* conteniendo un fragmento de DNA de *M. tuberculosis* con el *mpt70* y una región 5' similar a la evaluada en esta construcción (Hewinson *et al.*, 1996); además apoya la idea de que estos genes podrían conformar una unidad transcripcional.

La influencia del probable promotor localizado arriba del Rv2871 sobre la expresión del *mpt70* fue también evaluada con las construcciones pJD20E y pJD20F, las cuales mostraron una dramática disminución en las actividades de β -gal (figura 24). Ambas construcciones tienen en común el gen completo Rv2874. Sin embargo, este efecto sobre las actividades de β -gal no fue observado con los plásmidos pJD20B y pJD20A, los cuales contienen solo 264 pb de la secuencia codificante del Rv2874. Esta observación nos hizo suponer que la disminución de la actividad de β -gal en estas construcciones (pJD20E y pJD20F), pudo ser debido a una secuencia localizada hacia abajo del sitio *Eco47III* de la región codificante del Rv2874, aún no identificada, la cual podría ejercer directa o

indirectamente, un efecto inhibitorio sobre la expresión del Rv2874 y también sobre el probable operón.

Con la finalidad de evaluar esta posibilidad, la secuencia de DNA de esta región fue clonada en sentido invertido en la construcción pJD21D. La actividad de β -gal en esta construcción fue incrementada tres veces con respecto a la actividad producida por el pJD20E (figura 24). Sin embargo, el nivel de actividad de β -gal obtenido no alcanzó el mismo nivel del pJD20A. Una posible explicación a este resultado podría ser, que la probable secuencia de DNA responsable del efecto inhibitorio de la expresión del Rv2874, aún en sentido invertido, siguió afectando (en menor grado) la expresión de este gen. Interesantemente, en la construcción pJD21E con 90 pb más hacia abajo del sitio *Eco*47111 de la región codificante del Rv2874, fueron suficientes para disminuir la actividad de β -gal a un 25% con respecto a la expresión obtenida con el pJD20A (figura 24).

Los reducidos niveles de expresión de los genes *mpt83* y *mpt70* de *M. tuberculosis* H37Rv (Harboe y Nagai, 1984; Hewinson *et al.*, 1996), se correlacionan con la actividad de β -gal observada con el pJD20E y con el esfuerzo infructuoso de inmunodetectar la proteína codificada por el Rv2874 con el suero policlonal de ratón dirigido contra el dominio C-terminal recombinante codificado por el Rv2874, en los extractos sonicados y fracciones de membrana de *M. tuberculosis*, *M. bovis* BCG y *M. smegmatis* transformada con las construcciones conteniendo el gen Rv2874. Estos resultados nos permitieron suponer que, el gen Rv2874 podría estar regulando tanto su expresión como la del probable operón *mpt83*-Rv2874-*mpt70*, por medio de un mecanismo aún no establecido, el cual involucra la región codificante del Rv2874, localizada hacia abajo del sitio *Eco*47111.

Análisis de la cotranscripción del gen Rv2874 con el gen *mpt83* por RT-PCR.

La cotranscripción del *mpt83* y el Rv2874 se analizó por RT-PCR con el RNA de *M. tuberculosis* H37Rv, pero debido a la dificultad en la obtención de los productos de las reacciones de RT-PCR, debido a la baja concentración del RNAm de estos genes; se decidió llevar a cabo el análisis del arreglo de estos genes en una unidad transcripcional, con el RNA total de *M. smegmatis* transformada con algunas de las construcciones.

Usando una combinación de varios oligonucleótidos iniciadores comprendiendo diferentes regiones del probable operón (figura 25a), los productos de RT-PCR de los tamaños esperados fueron obtenidos con el RNA del pJD20A. Los fragmentos amplificados de 1279 pb, 1186 pb, 942 pb, 874 pb, 390 pb, 212 pb y 184 pb fueron obtenidos con los pares de oligonucleótidos MT18-MT16, MT11-MT10, MT11-MTD, MT18-MTC, MT11-MT16, MT9-MT10 y MTB-MTC, respectivamente (figura 25b y 25c). Estos resultados sugirieron que los genes Rv2871, Rv2872, *mpt83* y Rv2874 forman parte de un operón y que el RNA mensajero se inició arriba del Rv2871, lo cual también fue determinado por la falta de amplificación del fragmento de 1140 pb esperado con los oligonucleótidos MTA-MTC.

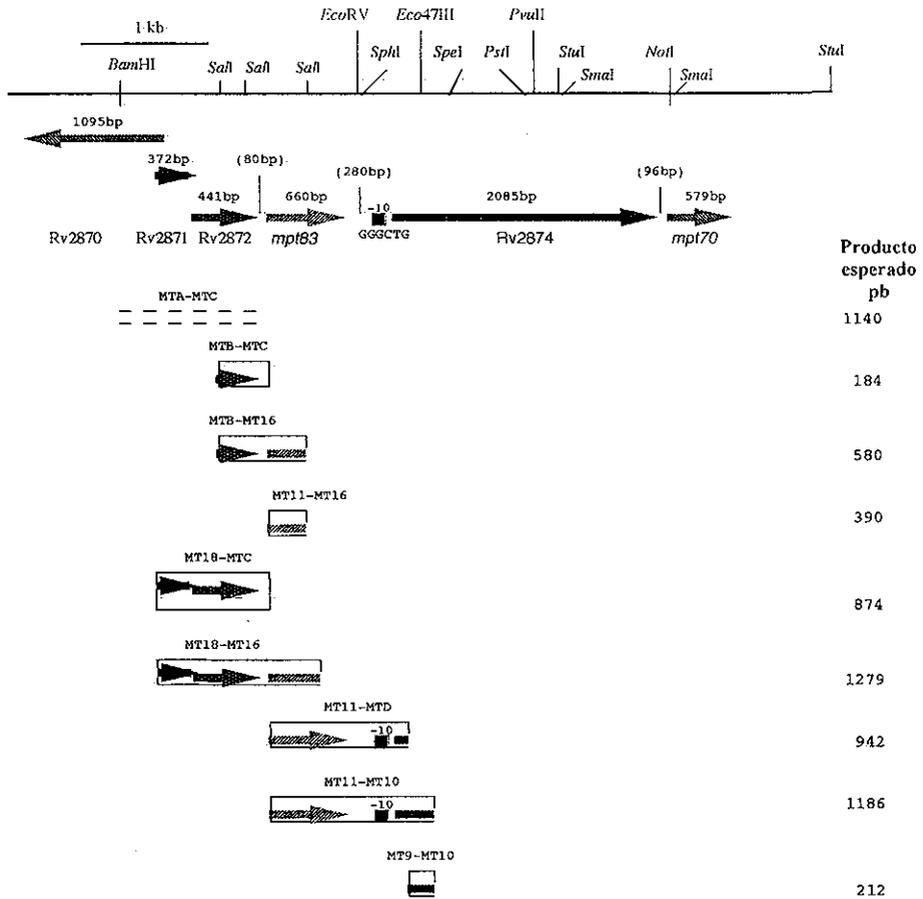
Por otra parte, para evaluar la posibilidad de elementos promotores adicionales dentro del probable operón, las reacciones de RT-PCR fueron llevadas a cabo con el RNA total de *M. smegmatis* transformada con el pJD21F y el pJD21H, usando los pares de oligonucleótidos MTB-MTC, MT11-MT16 y MTB-MT16. Los productos de RT-PCR esperados de 184 pb con el par MTB-MTC, de 390 pb con el par MT11-MT16 y de 580 pb con el par MTB-MT16 fueron amplificados con el RNA total de *M. smegmatis* transformada con el pJD21F, mientras que solo el producto de RT-PCR de 390 pb con el par MT11-MT16 fue amplificado con el RNA de *M. smegmatis* albergando el pJD21H (figura 25d y 25e). Estas observaciones apoyan la existencia de regiones promotoras

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

localizadas arriba del Rv2874 como se observó con las fusiones traduccionales y transcripcionales. Además estos resultados también apoyan la idea de que los genes *mpi83-Rv2874-mpi70* son parte de un operón, localizándose una región promotora arriba del Rv2871. Este supuesto operón también contiene promotores internos, los cuales podrían estar regulando en condiciones específicas la transcripción diferencial de estos genes.

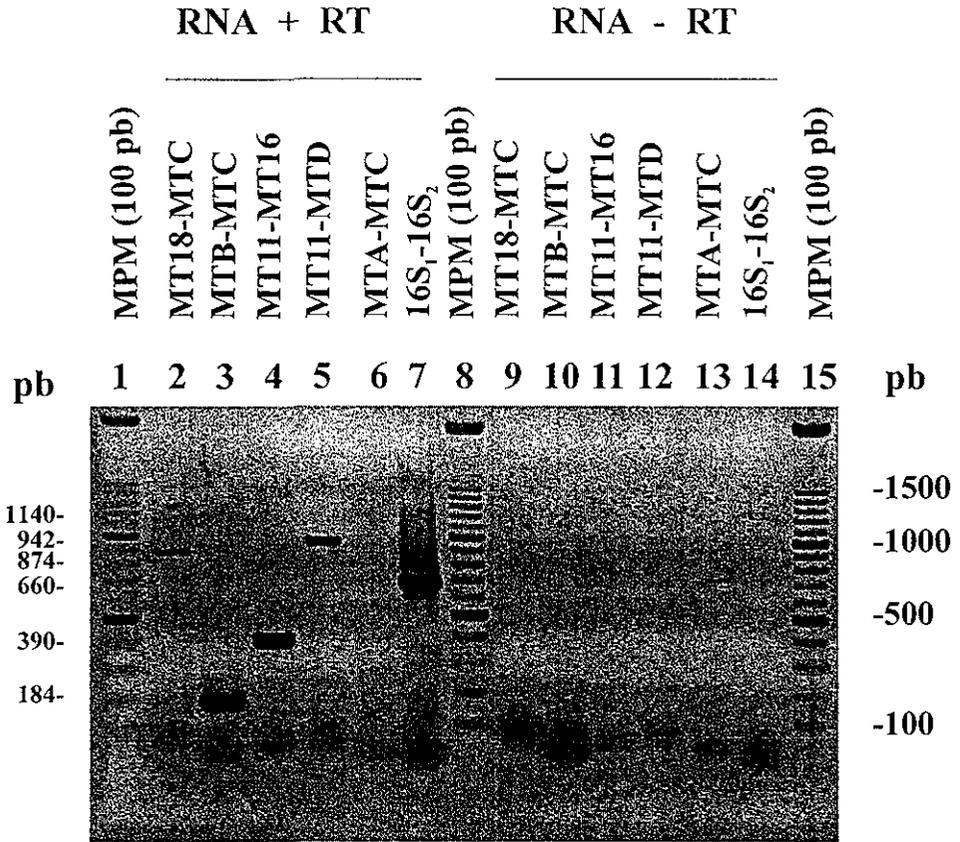
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(a).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

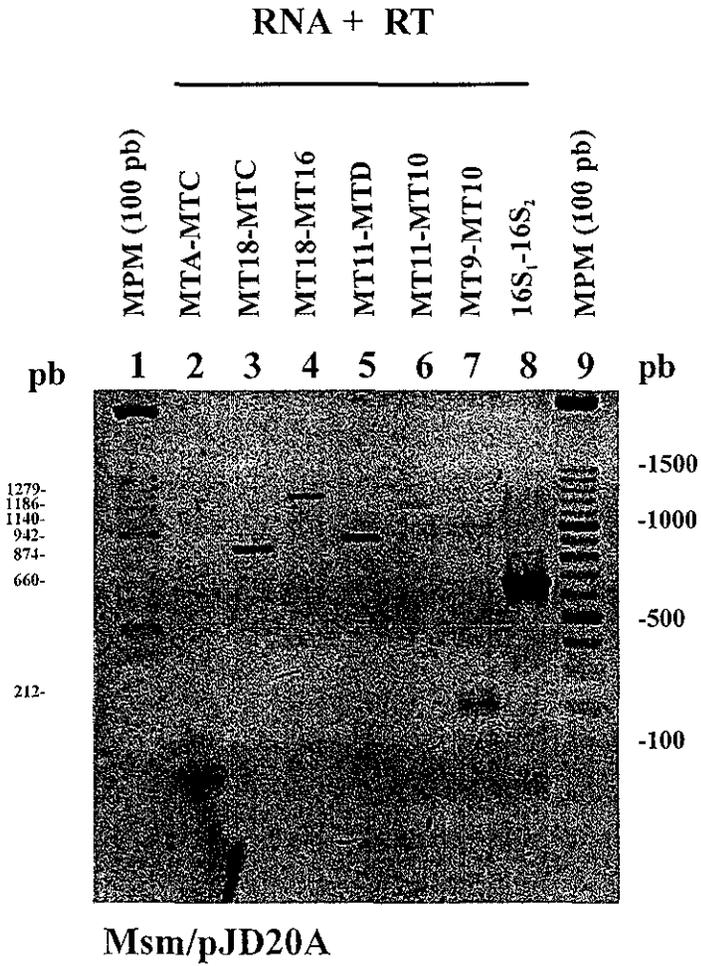
(b).



Msm/pJD20A

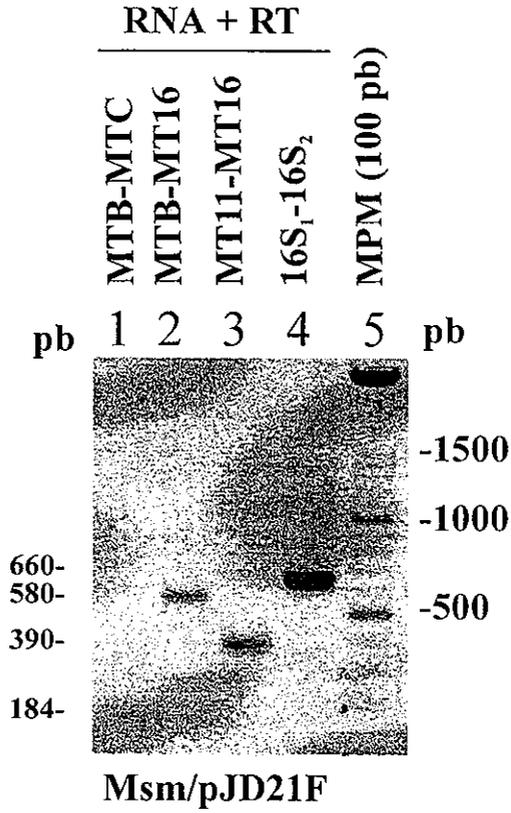
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(c).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(d).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

(e).

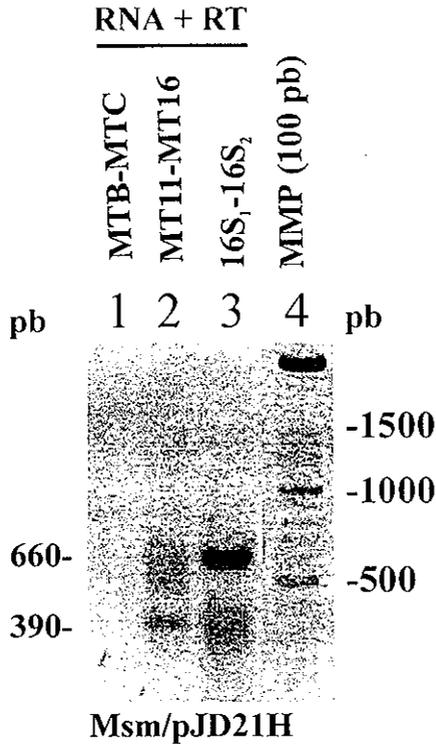


Figura 25. (a) Esquema de los productos de PCR obtenidos por RT-PCR. Los productos obtenidos son indicados con líneas sólidas y los no amplificados son indicados por una línea discontinúa. (b y c) Productos obtenidos por PCR a partir del RNA total de *M. smegmatis* transformada con el pJD20A y seguido de un paso de transcripción reversa (RNA+RT) o cuando el paso de transcripción reversa fue omitido (RNA-RT). Productos obtenidos por PCR a partir del RNA total de *M. smegmatis* transformada con el pJD21F (d) o el pJD21H (e); solo se muestran los productos obtenidos con el paso anterior de transcripción reversa (RNA+RT). Los pares de oligonucleótidos son mostrados arriba de los productos y sus tamaños son indicados a la derecha. (MPM) marcador de peso molecular de 100 pb (XIV de Roche).

DISCUSION

Los genes *mpt83* y *mpt70* codifican para proteínas antigénicas expresadas a bajos niveles en *M. tuberculosis* (Harboe y Nagai *et al.*, 1984; Hewinson *et al.*, 1996). La expresión de estas proteínas en *M. tuberculosis* ha sido confirmada indirectamente por el uso de un suero policlonal de ratones infectados con *M. tuberculosis* H37Rv viva, el cual reconoció por inmunoblot las proteínas homólogas MPB83 y MPB70 en lisados de *M. bovis* y *M. bovis* BCG Tokio, cepas que tienen una alta expresión de ambas proteínas. Sin embargo este suero policlonal no permitió identificar estas proteínas en los lisados de *M. tuberculosis* H37Rv (Hewinson *et al.*, 1996). Estos resultados son indicativos de que ambas proteínas en *M. tuberculosis* crecida *in vivo* son expresadas y son inmunogénicas.

En el presente trabajo, observamos la expresión del *mpt83* y del Rv2874 en *M. tuberculosis* crecida *in vitro* por RT-PCR. Sin embargo, no fue posible detectar la proteína hipotética de 72 kDa codificada por el Rv2874, en inmunoblot con un suero policlonal de ratón dirigido contra la proteína recombinante correspondiente al dominio C-terminal hidrofílico en sonicados totales y fracciones de membranas celulares de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG crecidas *in vitro*, además, no se pudo detectar en los cultivos de *M. smegmatis* transformada con este gen.

Estas observaciones se correlacionan con los bajos niveles de expresión del Rv2874, determinados por las actividades de β -gal que produjeron las fusiones del *locus* conteniendo este gen con el gen reportero *lacZ*. Además, estas observaciones también apoyan la idea de que este gen es transcrito en *M. tuberculosis* *in vitro* a bajos niveles como el *mpt83* y el *mpt70*, y los productos proteicos que codifican estos genes, por lo general no son detectados en los inmunoblot de sonicados totales de la mayoría de los aislados de *M.*

tuberculosis, con un antisuero específico contra *M. tuberculosis* o con un antisuero dirigido contra la MPB83 y la MPB70 (Hewinson *et al.*, 1996).

El gen Rv2874 de *M. tuberculosis* está flanqueado por los genes *mpt83* y *mpt70* y se ha propuesto que estos genes podrían estar formando parte de un operón.

Previamente se había considerado que el *mpt70* podría estar formando parte de un operón junto con el *mpt83* debido a las siguientes observaciones: 1) el *mpt83* está localizado a 2.4 kb arriba del *mpt70* y ambos genes son transcritos en la misma dirección, 2) la región reguladora del *mpb70* de subcepas de *M. bovis* BCG altas y bajas productoras de esta proteína, descritas por Matsuo *et al.*, 1995, y de *M. tuberculosis* descrita por Matsumoto *et al.*, 1995, son idénticas, 3) las cepas de *M. bovis* virulenta y *M. bovis* BCG que producen altos niveles de MPB70 también expresan altos niveles de MPB83, 4) la región 5' arriba del *mpt70* de 0.8 kb que contiene la región reguladora homóloga a la del *mpb70* descrita por Matsuo *et al.*, 1995, no condujo la expresión del *mpt70* en *M. smegmatis*, cuando esta secuencia nucleotídica fue subclonada en un vector lanzadera e introducida a esta micobacteria (Hewinson *et al.*, 1996).

Nuestras observaciones con respecto a la cotranscripción del *mpt83* y el Rv2874 de *M. tuberculosis*, son similares a estos reportes previos, en donde se sugiere que estos genes están organizados en un operón. De acuerdo con los resultados obtenidos por RT-PCR y correlacionados con las actividades de β -gal obtenidas con las diferentes fusiones con *lacZ* analizadas; el probable operón podría estar constituido por los genes Rv2871-Rv2872-*mpt83*-Rv2874-*mpt70*.

Los diferentes segmentos de DNA amplificados en las reacciones de RT-PCR, llevadas a cabo con el RNA total obtenido de *M. smegmatis* transformada con este locus (pJD20A), abarcaron desde el gen Rv2871 hasta el Rv2874, sugiriendo que el RNA mensajero de estos genes podría estar formando una unidad transcripcional. Sin embargo,

en este trabajo, la expresión del *mp170* no fue observada en las fusiones con *lacZ*, pero la integración de este gen en este probable operón, no puede descartarse. El efecto inhibitorio de la expresión del Rv2874 observada con la fusión *lacZ* (pJD21E), también podría haberse extendido hasta el *mp170*, pues en la construcción pJD20E, la actividad de *lacZ* fue reducida drásticamente. Además, la actividad de *lacZ* obtenida con el pJD20D, mostró que la secuencia arriba del *mp170* contenida en esta construcción, tampoco activó la transcripción de este gen en *M. smegmatis*. Esta observación concuerda con la detección de la proteína MPT70 con un anticuerpo monoclonal dirigido contra ésta, en *M. smegmatis* transformada con un cósmido conteniendo al *mp183* y al *mp170* y no con una construcción conteniendo solo al *mp170*, como en el pJD20D (Hewinson *et al.*, 1996). Así, la activación de este gen podría darse también como miembro de este probable operón.

Hacia abajo del *mp170* se localiza el gen Rv2876, el cual codifica para una proteína de 104 aminoácidos con similitud a glutamina sintetasa. Aún no se ha determinado si este gen también pudiera formar parte de este probable operón.

Si el Rv2874 de *M. tuberculosis* está formando parte de un operón con el *mp183* y el *mp170*, una expresión constitutiva basal de este probable operón en *M. tuberculosis* y subcepas de *M. bovis* BCG con producción baja de MPB83 y MPB70, puede ser el resultado de la transcripción conducida desde el promotor del operón y del promotor localizado arriba del Rv2874. En cambio, en *M. bovis* y en las subcepas de BCG con alta producción de las proteínas MPB83 y MPB70; un mecanismo por el cual, la transcripción de este operón sería incrementada para producir altos niveles de estas proteínas, podría ser que en estas subcepas existiera un regulador positivo de la transcripción de este operón, o que este hipotético activador transcripcional solo fuera activo en estas subcepas de *M. bovis* BCG.

Interesantemente, una diferencia importante entre las subcepas de *M. bovis* BCG Pasteur, Glaxo, Tice, Copenhague y Praga (con producción baja de las proteínas MPB83 y MPB70) y las subcepas de *M. bovis* BCG Tokyo, Brazil, Rusia, Suiza y Moreau (con producción alta de estas proteínas); es el fragmento genómico RD2 presente en las subcepas con alta producción de MPB83 y MPB70 y eliminado en las subcepas con baja producción. Este fragmento abarca los genes del Rv1978 al Rv1988, y entre estos está el gen Rv1985c, el cual codifica para un probable regulador transcripcional que presenta homología con el gen *lysR* (Behr *et al.*, 1999). Si el gen Rv1985c está relacionado con la expresión diferencial de los genes *mpb83* y *mpb70* entre estos dos grupos de subcepas de *M. bovis* BCG, y si en *M. tuberculosis* este gen Rv1985 también está desempeñando un papel en la expresión del probable operón con los genes *mpt83* y *mpt70*, es importante que en un futuro esto sea investigado.

Por otro lado, si el gen Rv2874 está formando parte de un operón junto con los genes *mpt83* y *mpt70*, en *M. bovis* virulenta y en subcepas de *M. bovis* BCG avirulentas que producen altos niveles de MPB83 y MPB70; la expresión de la proteína codificada por el gen Rv2874, probablemente debe ser regulada. Porque una producción alta de la proteína hipotética codificada por el Rv2874 de *M. tuberculosis*, podría tener un efecto citotóxico sobre la célula bacteriana debido a su asociación con la membrana.

En este trabajo se observó un efecto citotóxico en los cultivos de *E. coli* que expresan una proteína truncada recombinante correspondiente al dominio central transmembranal y el dominio N-terminal hidrofílico de la proteína codificada por el Rv2874, bajo un promotor inducible por IPTG. Un efecto similar se observó cuando la proteína DipZ de *E. coli* fue expresada en un vector con alto número de copias (Beck *et al.*, 1994). La expresión del gen Rv2874 podría ser regulada por un mecanismo que implica a la región codificante del Rv2874 (localizada hacia abajo del sitio *Eco47III*), la cual podría

contener una secuencia aún no identificada, que en sí misma podría constituir un represor o unir un represor.

Por otro lado, si la sobre-expresión de los genes *mpb83* y *mpb70* en las subcepas de *M. bovis* BCG con alta producción de las proteínas MPB83 y MPB70, no es debida a la acción de un activador transcripcional sobre el probable operón que los contiene, y la transcripción desde el probable promotor de este operón es únicamente basal, entonces otro mecanismo que podría estar implicado en la expresión diferencial de estos genes, podría ser a través de holoenzimas de la RNA polimerasa con factores sigma alternativos, solo presentes o activados en las subcepas con producción alta de MPB83 y MPB70, los cuales incrementarían el nivel de la transcripción de secuencias promotoras arriba del *mpb83* y del *mpb70*.

El hecho de que la secuencia nucleotídica entre los genes *mpt83-mpt70* y *mpb83-mpb70* es idéntica, excepto por una substitución nucleotídica de C por G en la posición 204 arriba del *mpt83*, y la inclusión de una C a 24 pb arriba del codón de inicio del *mpt83* (Hewinson *et al.*, 1996), podría descartar la posibilidad de la expresión diferencial debida a diferencias en las regiones reguladoras localizadas arriba de estos genes.

Por otra parte, la expresión diferencial de estos genes en ambos grupos de subcepas de *M. bovis* BCG, podría deberse a la acción de un activador transcripcional o factores sigma alternativos, únicamente presentes en las cepas con producción alta de la MPB83 y MPB70. Por ejemplo, el hecho de que los sitios de inicio de la transcripción del *mpb70* fueran detectados, por medio de la extensión de los oligonucleótidos iniciadores arriba de este gen en *M. bovis* BCG Tokio y no en *M. bovis* BCG Pasteur (Matsuo *et al.*, 1995), podría indicar que la activación de factores sigma alternativos dirigen la transcripción de este gen solo en *M. bovis* Tokyo. Secuencias promotoras arriba de los genes dentro de un operón que juegan un papel en su regulación no coordinada han sido descritos. Por

ejemplo, la expresión del operón *rpsU-dnaG-rpoD* en *E. coli* crecida a 30°C, es dirigida desde dos promotores P1 y P2 dependientes de sigma 70, localizados arriba del operón (*rpsU-dnaG-rpoD*), pero durante un estrés por calor, la transcripción de *rpoD* es conducida desde un promotor dependiente de sigma 32 arriba del gen *rpoD* (Lupski y Godson, 1984). El operón *gal* de *Streptomyces* (*galT-galE-glK*) también es transcrito por dos promotores los cuales son reconocidos por diferentes holoenzimas RNA polimerasas. La transcripción desde el promotor *gal* P1 localizado arriba de *galT* es inducido por glucosa y galactosa, pero la transcripción desde el promotor *gal* P2 arriba de *galE* es constitutiva (Mattern *et al.*, 1993).

La posibilidad de la existencia de promotores dentro del probable operón, fue observada por medio de las fusiones transcripcionales con *lacZ* y por medio de las reacciones de RT-PCR. Los resultados obtenidos sugirieron la presencia de promotores arriba del Rv2872, del *mpt83* y hacia debajo de esta última secuencia aparte de la probable región -10 del Rv2874.

Puesto que la región reguladora arriba del *mpt70*, es idéntica a la del *mpb70*, esta podría contener una secuencia promotora como la descrita por Matsuo *et al.*, (1995a) en el *mpb70*, la cual solo activó la transcripción de este gen en *M. bovis* BCG Tokio, pero no en *M. bovis* BCG. De esta manera, si las secuencias promotoras sugeridas arriba del Rv2872, del *mpb83*, del Rv2874 y del *mpb70* son dependientes de factores sigma alternativos, solo activos en las subcepas de *M. bovis* BCG con alta producción de MPB83 y MPB70, sería muy interesante determinarlo en un futuro.

Un factor sigma alternativo también podría estar involucrado en la activación de la expresión del gen Rv2874. En este trabajo nosotros identificamos una secuencia localizada a 113 pb hacia arriba del codón de inicio del gen Rv2874, la cual recuerda la región -35 consenso reconocida por factores sigma E, B y H de *M. tuberculosis* y sigma R de

Streptomyces coelicolor A3(2); lo cual nos permite suponer que este gen podría ser inducido por señales de estrés ambiental como los genes regulados por estos factores sigma. Durante el crecimiento de *M. tuberculosis in vivo*, diversos factores de estrés ambiental como el pH, la temperatura, especies reactivas de oxígeno y nitrógeno y otras condiciones de estrés encontradas en el medio interno del huésped (macrófago), pueden inducir la activación de factores sigma alternativos como sigma E, B y H.

En *M. smegmatis* el factor sigma E regula la transcripción de genes implicados en diversas respuestas al estrés *in vivo* (Wu *et al.*, 1997). La expresión del factor sigma E de *M. tuberculosis* es activada cuando *M. tuberculosis* está invadiendo macrófagos y es inducida *in vitro* por exposición a estrés oxidativo y por exposición a SDS, por lo que sigma E puede estar implicado en la patogénesis de esta bacteria (Jensen-Cain y Quinn, 2001; Manganelli *et al.*, 2001).

Además, se ha propuesto que una señal que induce la expresión del factor sigma E de *E. coli*, es dada por un exceso o un plegamiento anormal de proteínas de membrana externa en el espacio periplásmico o en la membrana externa (Mecsas *et al.*, 1993). La micobacteria carece de un espacio periplásmico, por lo que se ha propuesto que el factor sigma E juega un papel similar posiblemente respondiendo a la conformación y número de proteínas asociadas a la membrana (Wu *et al.*, 1997). Así, una elevación en la expresión del Rv2874 podría ser dirigida por el probable promotor dependiente del factor sigma E, localizado arriba del Rv2874 y al mismo tiempo, el número apropiado de la proteína codificada por el Rv2874 con la conformación correcta asociada en la membrana también sería regulado por una proteasa homóloga a DegP de *E. coli*, posiblemente HtrA de *M. tuberculosis*, la cual es expresada por un promotor también dependiente de sigma E.

El gen *hirA* y *sigE* de *M. tuberculosis* están contenidos dentro del mismo operón. Debido a este panorama, sería interesante determinar si el factor sigma E activa la transcripción del Rv2874 *in vitro* y cuando *M. tuberculosis* está infectando macrófagos.

Por otra parte, se ha descrito que el factor sigma alternativo H de *M. tuberculosis* y homólogo al factor sigma R de *S. coelicolor* A3 (2) (Paget *et al.*, 2001), regula la respuesta al estrés oxidativo y por calor, regulando también la inducción de la expresión del factor sigma E y sigma B (Raman *et al.*, 2001). Por lo que, se ha propuesto que el factor sigma H tiene un papel importante en la patogénesis de *M. tuberculosis*, debido a que desempeña un papel central en las respuestas al estrés oxidativo y por calor (Raman *et al.*, 2001). Entre las respuestas al estrés oxidativo, está la inducción del operón *trxB*A de *M. tuberculosis* y *S. coelicolor* A3(2), los cuales son inducidos por los factores sigma H y R respectivamente (Raman *et al.*, 2001; Paget *et al.*, 1998).

Sí la probable secuencia promotora arriba del gen Rv2874 que recuerda los promotores dependientes de sigma E, B y H, es activada por sigma H en respuesta al estrés oxidativo, también debe ser investigada. La proteína codificada por el Rv2874, podría desempeñar una función similar a las proteínas DipZ de otras bacterias, transfiriendo el poder reductor del citoplasma hacia el exterior de la célula a sistemas que lo requieren como la síntesis del citocromo c, y participando de esta manera con el sistema de tioredoxinas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG, por lo que también habría la posibilidad de que el factor sigma H pudiera estar regulando la expresión del gen Rv2874 en respuesta a estrés oxidativo.

Por otro lado, es probable la implicación del Rv2874 de *M. tuberculosis* en la biogénesis del citocromo c, como se ha descrito para la proteína DipZ de *E. coli* y *P. aeruginosa* (Crooke y Cole, 1995; Page *et al.*, 1997). La proteína hipotética codificada por

el Rv2874 como las proteínas DipZ de *E. coli* y *P. aeruginosa*, contiene un dominio central transmembranal homólogo a la proteína CcdA de *B. subtilis*, el cual es requerido para la biogénesis del citocromo tipo c; y un dominio C-terminal hidrofílico con un motivo de disulfuro isomerasa/tioredoxina.

El dominio transmembranal en la proteína codificada por el Rv2874 presenta las cisteínas conservadas en las hélices α transmembranales a y d, las cuales son observadas en las proteínas DipZ y CcdA. Se ha propuesto que estas cisteínas en el dominio de la proteína integrado a la membrana, podrían formar un puente disulfuro, el cual podría ser reducido por una tioredoxina del citoplasma, y luego ser reoxidado por la interacción con el sitio activo de tioredoxina en el dominio C-terminal hidrofílico de la proteína (Page *et al.*, 1997), en una forma similar como las proteínas CcdA y sus tioredoxinas periplasmicas asociadas se considera que actúan, transfiriendo el poder reductor del citoplasma al periplasma (Schiött *et al.*, 1997). El hecho de que la proteína DipZ de *E. coli* también está implicada en la transferencia de poder reductor del citoplasma al periplasma, en la oxidoreducción de puentes disulfuro de compuestos implicados en la biogénesis del citocromo c (Crooke y Cole, 1995) apoya la analogía entre esta clase de proteínas.

En *M. tuberculosis* no hay un espacio periplásmico, pero en el lado externo de la membrana celular existen proteínas asociadas a ésta por una molécula de lípido. Estas proteínas de los organismos Gram-positivos pueden ser los equivalentes funcionales de las proteínas periplásmicas de Gram-negativos y llevar a cabo procesos similares. Desde este punto de vista, la proteína codificada por el Rv2874 de *M. tuberculosis* podría estar implicada en la transferencia de poder reductor del citoplasma al lado externo de la membrana citoplásmica, para la biogénesis del citocromo, como se ha propuesto para las proteínas DipZ. Este proceso necesita que el motivo CXYCH del apocitocromo c, en el

lado externo de la membrana celular, sea reducido antes de unirse con el grupo hemo y en este paso está involucrada la proteína DipZ.

Considerando lo anterior, nosotros analizamos si el dominio C-terminal hidrofílico de la proteína codificada por el Rv2874 de *M. tuberculosis* presentaba una actividad de tioredoxina. Para este propósito, el dominio C-terminal hidrofílico recombinante de 36/40 kDa (His-Rv2874C₁), conteniendo el motivo de tioredoxina, con un tallo de polihistidina en la región N-terminal fue expresado, purificado por cromatografía de inmunoafinidad y usado en el ensayo de reducción de insulina.

En este ensayo, los puentes disulfuro intermoleculares entre las cadenas A y B que forman la insulina, son reducidos por una tioredoxina y forman un precipitado, el cual es detectado por un incremento de absorbancia a 650 nm. La actividad disulfuro reductasa no fue detectada con la proteína recombinante His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa en contraste con la tioredoxina de *E. coli*, la cual fue capaz de reducir las subunidades de insulina como se ha reportado previamente (Holmgren, 1979).

En este trabajo, la concentración del dominio C-terminal recombinante His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa de la proteína codificada por el Rv2874, fue similar a la tioredoxina de *E. coli* (1 μ M). No se pudieron utilizar concentraciones mayores de la proteína recombinante de 36/40 kDa debido a que esta proteína cuando se expresa forma cuerpos de inclusión, obteniéndose solo una pequeña cantidad de proteína recombinante soluble en el citoplasma.

Aunado a esto, debido a la necesidad de conservar la conformación nativa de la proteína requerida para el ensayo de insulina, ésta fue purificada por cromatografía de inmunoafinidad y no de los cuerpos de inclusión debido a que las sustancias químicas empleadas en este proceso, no preservan la conformación nativa de la proteína.

En un futuro, será importante determinar si un incremento en la concentración del dominio C-terminal recombinante de 36/40kDa podría catalizar la reducción de la insulina por DDT como la tioredoxina de *E. coli*.

La proteína TlpA de *B. japonicum* requirió una concentración treinta veces más alta que la tioredoxina de *E. coli* para demostrar actividad de tioredoxina en el ensayo de reducción de insulina (Rossmann *et al.*, 1997).

Por otro lado, las proteínas como HelX y Ccl2 de *R. capsulatus*, ambas con un motivo de tioredoxina y localizadas en el periplasma, cuando fueron sobre-expresadas y probadas en el ensayo de reducción de insulina, no redujeron los puentes disulfuro de la insulina (Monika *et al.*, 1997). Sin embargo, a pesar de la falta de actividad de estas proteínas con la insulina *in vitro*, HelX purificada redujo a Ccl2 y Ccl2 reducida fue subsecuentemente oxidada por el péptido del apocitocromo c que contiene el motivo CXYCH (Monika *et al.*, 1997). Estos resultados indicaron que los grupos disulfuro presentes en ambas proteínas son reactivos y que forman una vía de tioreducción específica para el apocitocromo c (Monika *et al.*, 1997). Si el dominio C-terminal recombinante de 36/40 kDa de la proteína codificada por el Rv2874 no redujo los puentes disulfuro intermoleculares entre las cadenas de insulina debido a que no actúa como una tioredoxina general y requiere como HelX su sustrato específico Ccl2, aún debe ser determinado.

Las proteínas de membrana CcdA asociadas a proteínas tioredoxinas como se mencionó anteriormente, recuerda dos dominios de la proteína codificada por el Rv2874, el dominio central transmembranal altamente hidrofóbico y el dominio C-terminal hidrofílico probablemente orientado hacia el periplasma y conteniendo un motivo de disulfuro isomerasa/tioredoxina. Estas observaciones sugieren que las proteínas DipZ, podrían llevar a cabo funciones similares a las proteínas CcdA/tioredoxina asociada *in vivo* (Page *et al.*, 1997). Esto explica el hecho de que en bacterias con ausencia del gen *ccdA* en su genoma

como *E. coli*, la proteína DipZ de *E. coli* es esencial para la biogénesis del citocromo c, en contraste con la proteína DipZ de *P. aeruginosa* en la que su ausencia funcional puede ser compensada por la actividad de la proteína CcdA y su proteína tioredoxina asociada (Page, *et al.*, 1997). Si en *M. tuberculosis*, la ausencia de funcionalidad de la proteína codificada por el Rv2874, podría ser compensada por la proteína CcdA de *M. tuberculosis* y su tioredoxina asociada, también debe ser determinado en un futuro.

Adicionalmente, la posibilidad de que la proteína codificada por el Rv2874 de *M. tuberculosis* este implicada en funciones relacionadas con las proteínas MPT83 y MPT70 debe ser considerada, debido a que los genes que están formando parte de un operón por lo general tienen funciones relacionadas. El MPT83 y el MPT70 son proteínas distintas pero con alta homología (63 % de identidad a nivel de aminoácidos). Aunque el MPT83 y el MPT70 son expresados a bajos niveles en *M. tuberculosis*, ambas proteínas son inmunogénicas (Hewinson *et al.*, 1996).

La proteína MPT83 madura en contraste con la MPT70 tiene un motivo consenso típico de lipoproteínas y un inserto único de 35 aminoácidos en su región amino terminal con un sitio de probable de glicosilación (Hewinson *et al.*, 1996). Así la forma de 26 kDa de MPT83 es una lipoproteína expuesta en la superficie y la MPT70 es una proteína no glicosilada de 22 kDa. Ambas proteínas presentan homología de secuencia de aminoácidos con el factor 2 específico de osteoblastos (OSF-2), el cual es una glicoproteína de superficie celular dimérica selectivamente expresada en el hueso y el tejido pulmonar y que actúa como una molécula de adhesión celular (Takeshita *et al.*, 1993).

Se ha propuesto que las proteínas MPT83 y MPT70 están implicadas en el tropismo de micobacterias al hueso (Matsumoto *et al.*, 1995; Ulstrup *et al.*, 1995), y debido a que la MPT83 es acilada a la superficie celular, esta proteína podría actuar como

un ligando para la adhesión al hueso, mientras que la MPT70 podría modificar las funciones metabólicas de la célula huésped (Hewinson *et al.*, 1996).

También se ha propuesto que estructuras de anillo de las moléculas MPT70 y MPT83 son formadas por uniones disulfuro internas (Wiker *et al.*, 1998). Las estructuras de anillo del MPT70 y del MPT83 podrían ser importantes para llevar a cabo sus funciones y la proteína codificada por el Rv2874 podría estar jugando un papel en la formación de estos puentes disulfuro. En el futuro, será necesario plantear experimentos genéticos y bioquímicos para evaluar la viabilidad de estas ideas.

CONCLUSIONES

En este trabajo se observó que el gen Rv2874 de *M. tuberculosis* solo se encuentra en el genoma de esta bacteria y en el de *M. bovis* BCG.

La proteína codificada por el Rv2874 de *M. tuberculosis* presenta similitud con las proteínas DipZ y podría desempeñar una función análoga a estas proteínas.

La proteína nativa codificada por el Rv2874 no pudo ser detectada en los sonicados totales, filtrados de cultivo o fracciones de membrana de *M. tuberculosis* o *M. bovis* BCG Pasteur.

La región C-terminal recombinante de la proteína codificada por el Rv2874 (His-Rv2874C₁ de 36/40 kDa), tampoco fue reconocida por los sueros de pacientes con tuberculosis pulmonar, sugiriendo este resultado que la proteína nativa podría no ser inmunogénica.

La proteína recombinante (His-Rv2874C₁), conteniendo el motivo de disulfuro isomerasas/tioredoxinas, no presentó actividad de tioredoxina.

La transcripción del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* se observó junto con la cotranscripción del gen *mpt83*.

La expresión del gen Rv2874 de *M. tuberculosis* en *M. smegmatis* se detectó con 195 pb de la región 5' arriba del codón de inicio del Rv2874, incrementándose al doble cuando se incluyeron 2.08 kb de la región 5' arriba de este gen. También se observó la cotranscripción del gen *mpt83* con el gen Rv2874.

Una secuencia similar a la región -10 de promotores de algunos genes de micobacteria y estreptomycetos fue localizada a 91 pb arriba del codón de inicio del

Rv2874. Mutaciones introducidas en esta región disminuyeron drásticamente la expresión de este gen.

Se identificó una secuencia (GCGAACT) localizada a 112 pb arriba del codón de inicio del gen Rv2874, la cual muestra analogía con la secuencia de la región -35 de promotores dependientes de factores sigma E y H de *M. tuberculosis* y sigma R de *S. coelicolor*.

La inclusión de la región codificante del gen Rv2874 localizada hacia abajo del sitio *Eco47III* (pJD20E, pJD20F, pJD21D y pJD21E), ocasionó la disminución drástica de la expresión. Esta región podría ejercer un efecto regulador en la expresión del gen Rv2874 y probablemente en la expresión de los genes de este *locus*.

Eliminaciones en la región 5' arriba del *locus* Rv2871-Rv2872-*mpt83*-Rv2874-*mpt70*, y en la región 5'arriba de algunos de estos genes, nos permitieron elucidar la probable existencia de regiones promotoras arriba del Rv2871, del Rv2872, del *mpt83*, y otra hacia abajo del *mpt83*.

Los genes Rv2871, Rv2872, *mpt83* y Rv2874, podrían conformar una unidad trascricional y por lo tanto formar un operón como nos lo sugieren los resultados obtenidos por RT-PCR.

PERSPECTIVAS

En este trabajo analizamos la expresión de los genes Rv2871, Rv2872, *mpt83*, Rv2874 y *mpt70* de *M. tuberculosis*, por medio de fusiones traduccionales y transcripcionales con el gen reportero *lacZ* de *E. coli*, evaluando la actividad de β -gal en *M. smegmatis* transformada independientemente con cada una de estas fusiones y a través de reacciones de RT-PCR con el RNA total obtenido de *M. smegmatis* transformada con algunas de estas fusiones transcripcionales.

Los resultados observados nos permiten sugerir que estos genes podrían estar conformando un operón, proponiendo además la posibilidad de que en éste, existan promotores arriba de los genes que lo constituyen.

Para analizar la expresión diferencial de los genes que codifican las proteínas MPB83 y MPB70; una subcepa de *M. bovis* BCG con alta producción de estas proteínas y otra con baja producción, podrían ser transformadas con las fusiones traduccionales y transcripcionales generadas en este trabajo y mediante la cuantificación de la β -gal, se podrían determinar las diferencias en cuanto a la expresión en estos dos grupos de subcepas. Si se observara una expresión elevada de estas fusiones en el grupo de alta producción de MPB83 y MPB70, podría obtenerse una cantidad de RNA suficiente para realizar experimentos de Northern blot y determinar, si efectivamente este conjunto de genes forman un operón. Una vez que se determine si hay una sola unidad transcripcional o varios transcritos, también podría hacerse con una suficiente cantidad de RNA, experimentos de extensión de oligonucleótidos complementarios al RNA mensajero y

determinar los posibles sitios de inicio de la transcripción y dilucidar las posibles secuencias promotoras responsables de la transcripción.

Los resultados que se obtengan en los estudios propuestos anteriormente, nos permitirían discernir, si la expresión diferencial de este probable operón, en estos dos grupos de subcepas de *M. bovis* BCG, es ocasionada por elementos intrínsecos de la secuencia del probable operón (elementos en cis) o por factores (elementos en trans) como activadores transcripcionales o factores sigma alternativos, presentes o activos solo en el grupo de subcepas de *M. bovis* BCG con alta producción de las proteínas MPB83 y MPB70.

La participación de factores sigma alternativos en la transcripción del probable operón sugerido en este trabajo o de los genes que lo estarían constituyendo, podría abordarse, por medio de la determinación de la actividad de la β -gal generada por la expresión de las fusiones traduccionales y transcripcionales de diferentes regiones de este operón con el gen *lacZ*, en *M. smegmatis*, en *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG (alta productora) electroporadas con estas fusiones y sometidas a diferentes condiciones de estrés como choque térmico, exposición a SDS y estrés oxidativo; o cuando *M. tuberculosis* y *M. bovis* BCG están replicándose en macrófagos.

Por otro lado, para determinar si la expresión del gen Rv2874 es dependiente de algún factor sigma alternativo (E, B o H), debido a que en la región 5' arriba del Rv2874, se identificó una probable secuencia -35, reconocida por algunos de estos factores sigma; la transcripción *in vitro* de este gen, podría analizarse utilizando la polimerasa de RNA reconstituida con cada uno de los factores sigma.

Otra alternativa para analizar la expresión global de los genes de *M. bovis* BCG Tokio, podría ser por medio de las nuevas tecnologías, por ejemplo empleando los microarreglos genómicos construidos para *M. tuberculosis* con el RNA total de *M. bovis* BCG (con alta producción de MPB83 y MPB70), para determinar si en este grupo de subcepas de *M. bovis* BCG, los genes de este probable operón Rv2871-Rv2872-*mpt83*-Rv2874-*mpt70* son expresados al mismo nivel que los genes que codifican las proteína MPT83 y MPB70 y además determinar si estos genes son expresados en condiciones particulares de estrés, ya que en *M. tuberculosis*, debido al bajo nivel de expresión de estos genes, no se ha determinado si éstos responden a condiciones de estrés en esta clase de estudios.

Por otra parte, la evaluación del papel de la proteína codificada por el gen Rv2874 de *M. tuberculosis*; podría analizarse mediante la interrupción de este gen en el cromosoma de *M. tuberculosis* y estudiando el efecto de esta mutación, en *M. tuberculosis* expuesta a estrés oxidativo o valorando la capacidad de *M. tuberculosis* de infectar y replicarse dentro de macrófagos. Otra mutante similar podría generarse en la subcepa de *M. bovis* BCG Tokio y analizar si la producción de las proteínas MPB83 y MPB70 es alterada, porque probablemente, la proteína codificada por el Rv2874 podría estar implicada en la formación de los puentes disulfuro sugeridos para estas proteínas.

Con la utilización de una cepa de *E. coli dipZ* deficiente en la biogénesis del citocromo c; podría analizarse la posible función del gen estructural Rv2874 por medio de estudios de complementación, mediante la construcción de un gen quimérico, constituido por el gen estructural Rv2874 bajo el promotor del gen *dipZ* de *E. coli* y analizar la reversión del fenotipo.

Finalmente, será necesario realizar experimentos para determinar porque se observó una disminución drástica de las actividades de β -gal observadas con las construcciones pJD20E, pJD20F, JD21D y pJD21E, y así definir si esta disminución en los valores de β -gal, fueron ocasionados por la interacción de algún regulador negativo con alguna secuencia de la región codificante del gen Rv2874 presente en todas estas construcciones.

Todos estos estudios ayudaran a determinar como *M. bovis* BCG regula la expresión diferencial de los genes *mpb83* y *mpb70*. Además de establecer, si estos genes están conformando un operón y así determinar la importancia de la cotranscripción del gen Rv2874 con el *mpb83* y el *mpb70*, analizando también si la cotranscripción de estos genes es relevante para la sobrevivencia de la micobacteria en el proceso de patogénesis.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFIA

- Balasubramanian V, Pavelka MS Jr, Bardarov SS, Martin J, Weisbrod TR, McAdam RA, Bloom BR, Jacobs WR Jr. 1996. Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear recombination substrates. *J Bacteriol.* **178** (1): 273-9.
- Bardarov S, Kriakov J, Carriere C, Yu S, Vaamonde C, McAdam RA, Bloom BR, Hatfull GF, Jacobs WR Jr. 1997. Conditionally replicating mycobacteriophages: a system for transposon delivery to *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci USA.* **94** (20): 10961-6.
- Barry CE, Schroeder B. 2000. DNA microarrays: translational tools for understanding the biology of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* **8** (5): 209-210.
- Beck R, Crooke H, Jarsch M, Cole J, Burtcher H. 1994. Mutation in *dipZ* leads to reduced production of active human placental alkaline phosphatase in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett.* **124** (2): 209-14.
- Beckman DL, Kranz RG. 1993. Cytochromes c biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90** (6): 2179-83.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. 1999. Comparative genomics of BCG vaccines by whole-genome DNA microarray. *Science* **284** (5419): 1520-3.
- Bradford WZ, Martin JN, Reingold AL, Schecter GF, Hopewell PC, Small PM. 1996. The changing epidemiology of acquired drug-resistant tuberculosis in San Francisco, USA. *Lancet* **348** (9032): 928-31.

- Camacho LR, Ensergueix D, Perez E, Gicquel B, Guilhot C.** 1999. Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Mol Microbiol.* **34** (2): 257-67.
- Cirillo JD, Weisbrod TR, Pascopella L, Bloom BR, Jacobs WR Jr.** 1994. Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria. *Mol Microbiol.* **11** (4): 629-39.
- Cohn DL, Bustreo F, Raviglione MC.** 1997. Drug-resistant tuberculosis: review of the worldwide situation and the WHO/IUATLD Global Surveillance Project. International Union Against Tuberculosis and Lung Disease. *Clin Infect Dis.* **24** Suppl 1: S121-30.
- 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.** 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; **393**: 537-44.
- Crooke H, Cole J.** 1995. The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. *Mol Microbiol.* **15** (6): 1139-50.
- Daley CL, Small PM, Schecter GF, Schoolnik GK, McAdam RA, Jacobs WR Jr, Hopewell PC.** 1992. An outbreak of tuberculosis with accelerated progression among persons infected with the human immunodeficiency virus. An analysis using restriction-fragment-length polymorphisms. *N Engl J Med.* **326** (4): 231-5.

- Dannenberg AM Jr.** 1991. Delayed-type hypersensitivity and cell-mediated immunity in the pathogenesis of tuberculosis. *Immunol Today* **12** (7): 228-33.
- De Smet KA, Jamil S, Stoker NG.** 1993. Tropist3: a cosmid vector for simplified mapping of both G+C-rich and A+T-rich genomic DNA. *Gene* **136** (1-2): 215-9.
- Devereux J, Haerberli P, Smithies O. 1984. A comprehensive set of sequence analysis programs for the VAX. *Nucleic Acids Res* **12**: 387-395.
- Espitia C, Mancilla R.** 1989. Identification, isolation and partial characterization of *Mycobacterium tuberculosis* glycoprotein antigens. *Clin Exp Immunol* **77** (3): 378-83.
- Espitia C, Cervera I, Gonzalez R, Mancilla R.** 1989. A 38-kD *Mycobacterium tuberculosis* antigen associated with infection. Its isolation and serologic evaluation. *Clin Exp Immunol* **77** (3): 373-7.
- Espitia C, Espinosa R, Saavedra R, Mancilla R, Romain F, Laqueyrie A, Moreno C.** 1995. Antigenic and structural similarities between *Mycobacterium tuberculosis* 50- to 55-kilodalton and *Mycobacterium bovis* BCG 45- to 47-kilodalton antigens. *Infect Immun.* **63** (2): 580-4.
- Fabianek RA, Huber-Wunderlich M, Glockshuber R, Kunzler P, Hennecke H, Thony-Meyer L.** 1997. Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. *J Biol Chem.* **272** (7): 4467-73.
- Fifis T, Plackett P, Corner LA, Wood PR.** 1989. Purification of a major *Mycobacterium bovis* antigen for the diagnosis of bovine tuberculosis. *Scand J Immunol.* **29** (1): 91-101.

Fleischmann RD, Adams MD, White O, Clayton RA, Kirkness EF, Kerlavage AR, Bult CJ, Tomb JF, Dougherty BA, Merrick JM, McKenney K, Sutton G, FitzHugh W, Fields C, Gocayne JD, Scott J, Shirley R, Liu L, Glodek A, Kelley J, Weidman JF, Spiggs PT, Hedblom E, Cotton MD, Utterback TR, Hanna MC, Nguyen DT, Saudek DM, Brandon RC, Fine LD, Fritchman JL, Fuhrmann JL, Geoghagen NS, Gnehm CL, McDonald LA, Small KV, Fraser CM, Smith HO, Venter JC. 1995. Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* **269** (5223): 496-512.

Fonseca DP, Benaissa-Trouw B, van Engelen M, Kraaijeveld CA, Snippe H, Verheul AF. 2001. Induction of cell-mediated immunity against *Mycobacterium tuberculosis* using DNA vaccines encoding cytotoxic and helper T-cell epitopes of the 38-kilodalton protein. *Infect Immun.* **69** (8): 4839-45.

Gatfield J, Pieters J. 2000. Essential role for cholesterol in entry of mycobacteria into macrophages. *Science* **288** (5471): 1647-50.

Gros P, Skamene E, Forget A. 1981. Genetic control of natural resistance to *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *J Immunol.* **127** (6): 2417-21.

Hackam DJ, Rotstein OD, Zhang W, Gruenheid S, Gros P, Grinstein S. 1998. Host resistance to intracellular infection: mutation of natural resistance-associated macrophage protein 1 (Nramp1) impairs phagosomal acidification. *J Exp Med.* **188** (2): 351-64.

Harboe M, Nagai S. 1984. MPB70, a unique antigen of *Mycobacterium bovis* BCG. *Am Rev Respir Dis.* **129** (3): 444-52.

Harboe M, Nagai S, Wiker HG, Sletten K, Haga S. 1995. Homology between the MPB70 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol.* **42** (1): 46-51.

Harboe M, Oettinger T, Wiker HG, Rosenkrands I, Andersen P. 1996. Evidence for occurrence of the ESAT-6 protein in *Mycobacterium tuberculosis* and virulent *Mycobacterium bovis* and for its absence in *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* **64** (1): 16-22.

Harboe M, G. Wiker H G, Ulvund G, Lund-Pedersen B, Andersen A B, Hewinson R. G, and Nagai S. 1998. MPB70 and MPB83 as indicators of protein localization in mycobacterial cells. *Infect. Immun.* **66**: 289-296.

Hatfull GF, Jacobs WR Ed. 2000. Molecular genetic of mycobacteria. Washington, DC: ASMpress.

Hewinson RG, Michell SL, Russell WP, McAdam RA, Jacobs WR Jr. 1996. Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand J Immunol.* **43** (5): 490-9.

Highleyman L. 1998. Tuberculosis. Boletín de tratamientos experimentales contra el SIDA. Fundación anti SIDA de San Francisco: 1-17.

Holmgren A. 1979. Thioredoxin catalyzes the reduction of insulin disulfides by dithiothreitol and dihydrolipoamide. *J Biol Chem.* **254** (19): 9627-32.

Horinouchi S, Suzuki H, Nishiyama M, Beppu T. 1989. Nucleotide sequence and transcriptional analysis of the *Streptomyces griseus* gene (*afsA*) responsible for A-factor biosynthesis. *J Bacteriol.* **171** (2): 1206-10.

Jain S, Kaushal D, DasGupta SK, Tyagi AK. 1997. Construction of shuttle vectors for genetic manipulation and molecular analysis of mycobacteria. *Gene* **190** (1): 37-44.

- Jensen-Cain DM, Quinn FD.** 2001. Differential expression of sigE by *Mycobacterium tuberculosis* during intracellular growth. *Microb Pathog.* **30** (5): 271-8.
- Jungblut PR, Schaible UE, Mollenkopf HJ, Zimny-Arndt U, Raupach B, Mattow J, Halada P, Lamer S, Hagens K, Kaufmann SH.** 1999. Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Mol Microbiol.* **33** (6): 1103-17.
- Kamath AT, Feng CG, Macdonald M, Briscoe H, Britton WJ.** 1999. Differential protective efficacy of DNA vaccines expressing secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* **67** (4): 1702-7.
- Kremer L, Baulard A, Estaquier J, Content J, Capron A, Loch C.** 1995. Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J Bacteriol.* **177** (3): 642-53.
- Kyte J, Doolittle RF.** 1982. A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol.* **157** (1):105-32.
- Labidi A, David HL, Roulland-Dussoix D.** 1985. Restriction endonuclease mapping and cloning of *Mycobacterium fortuitum* var. *fortuitum* plasmid pAL5000. *Ann Inst Pasteur Microbiol.* **136B** (2): 209-15.
- Loferer H, Bott M, Hennecke H.** 1993. *Bradyrhizobium japonicum* TlpA, a novel membrane-anchored thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of cytochrome aa3 and development of symbiosis. *EMBO J.* **12** (9): 3373-83.
- Lonetto MA, Brown KL, Rudd KE, Buttner MJ.** 1994. Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase sigma factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc Natl Acad Sci USA* **91** (16): 7573-7.

- Lozes E, Huygen K, Content J, Denis O, Montgomery DL, Yawman AM, Vandebussche P, Van Vooren JP, Drowart A, Ulmer JB, Liu MA.** 1997. Immunogenicity and efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding the components of the secreted antigen 85 complex. *Vaccine* 15 (8): 830-3.
- Lupski JR and Godson GN.** 1984. The *rpsU-dnaG-rpoD* macromolecular synthesis operon of *E. coli*. *Cell* 39: 251-252.
- Mahairas GG, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK.** 1996. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol.* 178 (5): 1274-82.
- Manganelli R, Voskuil MI, Schoolnik GK, Smith I.** 2001. The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor sigma E: role in global gene expression and survival in macrophages. *Mol Microbiol.* 41 (2): 423-37.
- Matsumoto S, Matsuo T, Ohara N, Hotokezaka H, Naito M, Minami J, Yamada T.** 1995. Cloning and sequencing of a unique antigen MPT70 from *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and expression in BCG using *E. coli*-mycobacteria shuttle vector. *Scand J Immunol.* 41 (3): 281-7.
- Matsuo T, Matsumoto S, Ohara N, Kitaura H, Mizuno A, Yamada T.** 1995. Differential transcription of the MPB70 genes in two major groups of *Mycobacterium bovis* BCG substrains. *Microbiology* 141 (Pt 7): 1601-7.
- Matsuo T, Matsuo H, Ohara N, Matsumoto S, Kitaura H, Mizuno A, Yamada T.** 1996. Cloning and sequencing of an MPB70 homologue corresponding to MPB83 from *Mycobacterium bovis* BCG. *Scand J Immunol.* 43 (5): 483-9.

- Mattern S, Brawner ME, Westpheling J.** 1993. Identification of a complex operator for *galP1*, the glucose-sensitive, galactose-dependent promoter of the *Streptomyces* galactose operon. *J Bacteriol.* **175** (5): 1213-1220.
- McAdam R, Weisbrod T, Martin J, Scuderi JD, Brown AM, Cirillo JD, Bloom BR, Jacobs WR.** 1995. In vivo growth characteristics of leucine and methionine auxotrophic mutants of *Mycobacterium bovis* BCG generated by transposon mutagenesis. *Infect Immun.* **63** (3): 1004-1012.
- Mecsas J, Rouviere PE, Erickson JW, Donohue TJ, Gross CA.** 1993. The activity of sigma E, an *Escherichia coli* heat-inducible sigma-factor, is modulated by expression of outer membrane proteins. *Genes Dev.* **7** (12B): 2618-28.
- Miller JH.** 1972. Experiments in molecular genetics, Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Monika EM, Goldman BS, Beckman DL, Kranz RG.** 1997. A thioreduction pathway tethered to the membrane for periplasmic cytochromes c biogenesis; *in vitro* and *in vivo* studies. *J Mol Biol.* **271** (5): 679-92.
- Nagai S, Matsumoto J, Nagasuga T.** 1981. Specific skin-reactive protein from culture filtrate of *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun.* **31** (3): 1152-60.
- Pages JM, Lazdunski C.** 1982. Maturation of exported proteins in *Escherichia coli*. Requirement for energy, site and kinetics of processing. *Eur J Biochem.* **124** (3): 561-6.
- Page MD, Ferguson SJ.** 1997. *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulphide oxidoreductase required for c- and aa3-type cytochrome biogenesis; evidence for a reductase role *in vivo*. *Mol Microbiol.* **24** (5): 977-90.

- Page MD, Saunders NF, Ferguson SJ.** 1997. Disruption of the *Pseudomonas aeruginosa* *dipZ* gene, encoding a putative protein-disulfide reductase, leads to partial pleiotropic deficiency in c-type cytochrome biogenesis. *Microbiology* **143** (Pt 10):3111-22.
- Paget MS, Kang JG, Roe JH, Buttner MJ.** 1998. Sigma R, an RNA polymerase sigma factor that modulates expression of the thioredoxin system in response to oxidative stress in *Streptomyces coelicolor* A3(2). *EMBO J.* **17** (19): 5776-82.
- Pelicic V, Jackson M, Reytrat JM, Jacobs WR Jr, Gicquel B, Guilhot C.** 1997. Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94** (20): 10955-60.
- Pelicic V, Reytrat JM, Gicquel B.** 1998. Genetic advances for studying *Mycobacterium tuberculosis* pathogenicity. *Mol Microbiol* **28** (3): 413-20.
- Raman S, Song T, Puyang X, Bardarov S, Jacobs WR Jr, Husson RN.** 2001. The alternative sigma factor SigH regulates major components of oxidative and heat stress responses in *Mycobacterium tuberculosis*. *J Bacteriol.* **183** (20): 6119-25.
- Raviglione MC, Snider DE Jr, Kochi A.** 1995. Global epidemiology of tuberculosis. morbidity and mortality of a worldwide epidemic. *JAMA* **273** (3): 220-6.
- Roche PW, Triccas JA, Winter N.** 1995. BCG vaccination against tuberculosis: past disappointments and future hopes. *Trends Microbiol.* **3** (10): 397-401.
- Romain F, Laqueyrie A, Militzer P, Pescher P, Chavarot P, Lagranderie M, Auregan G, Gheorghiu M, Marchal G.** 1993. Identification of a *Mycobacterium bovis* BCG 45/47-kilodalton antigen complex, an immunodominant target for antibody response after immunization with living bacteria. *Infect Immun.* **61** (2): 742-50.

- Rossmann R, Stern D, Loferer H, Jacobi A, Glockshuber R, Hennecke H.** 1997. Replacement of Pro109 by His in TlpA , a thioredoxin-like protein from *Bradyrhizobium japonicum*, alters its redox properties but not its *in vivo* functions. *FEBS Lett.* **406** (3): 249-54.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd ed. USA. CSH Lab Press.
- Schiott T, von Wachenfeldt C, Hederstedt L.** 1997. Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol.* **179** (6): 1962-73.
- Schlesinger LS, Bellinger-Kawahara CG, Payne NR, Horwitz MA.** 1990. Phagocytosis of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by human monocyte complement receptors and complement component C3. *J Immunol.* **144** (7): 2771-80.
- Schlesinger LS.** 1993. Macrophage phagocytosis of virulent but not attenuated strains of *Mycobacterium tuberculosis* is mediated by mannose receptors in addition to complement receptors. *J Immunol.* **150** (7): 2920-30.
- Schlossberg D.** 2000. Tuberculosis e infecciones por micobacterias no tuberculosas. 1ª ed. McGraw Hill Interamericana Editores. México, D.F. 469 p.
- Shaphira SK, Chou J, Richaud FV, Casadaban MJ.** 1983. 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* **25**: 71-82.
- Silhavy, T.J., Berman M.L., Enquist L.W.** 1984. *Experiments with Gene Fusions*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.

- Small PM, Hopewell PC, Singh SP, Paz A, Parsonnet J, Ruston DC, Schecter GF, Daley CL, Schoolnik GK.** 1994. The epidemiology of tuberculosis in San Francisco. A population-based study using conventional and molecular methods. *N Engl J Med.* **330** (24): 1703-9
- Smith DW, Wiegand E, Navalkar R, Grover AA.** 1965. Host-parasite relationships in experimental airborne tuberculosis. I. Preliminary studies in BCG-vaccinated and nonvaccinated animals. *J Bacteriol.* **91** (2): 718-24.
- Snapper SB, Lugosi L, Jekkel A, Melton RE, Kieser T, Bloom BR, Jacobs WR Jr.** 1988. Lysogeny and transformation in mycobacteria: stable expression of foreign genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **85** (18): 6987-91.
- Stead WW.** 1997. Perspective: a molecular approach to tuberculosis control-- an idea that might work. *J Infect Dis.* **176** (3): 547-8.
- Stover CK, De la Cruz VF, Fuerst TR, et al.** 1991. New use of BCG for recombinant vaccines. *Nature*; **351**: 456-460.
- Strohl WR.** 1992. Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* **20** (5): 961-74.
- Sturgill-Koszycki S, Schlesinger PH, Chakraborty P, Haddix PL, Collins HL, Fok AK, Allen RD, Gluck SL, Heuser J, Russell DG.** 1994. Lack of acidification in *Mycobacterium* phagosomes produced by exclusion of the vesicular proton-ATPase. *Science* **263** (5147): 678-81.
- Takehita S, Kikuno R, Tezuka K, Amann E.** 1993. Osteoblast-specific factor 2: cloning of a putative bone adhesion protein with homology with the insect protein fasciclin I. *Biochem J.* **294** (Pt 1): 271-8.

- Tanghe A, D'Souza S, Rosseels V, Denis O, Ottenhoff TH, Dalemans W, Wheeler C, Hygen K.** 2001. Improved immunogenicity and protective efficacy of a tuberculosis DNA vaccine encoding Ag85 by protein boosting. *Infect Immun.* **69** (5): 3041-3047.
- Tascon RE, Colston MJ, Ragno S, Stavropoulos E, Gregory D, Lowrie DB.** 1996. Vaccination against tuberculosis by DNA injection. *Nat Med.* **2** (8): 888-92.
- Timm J, Lim EM, Gicquel B.** 1994. *Escherichia coli*-mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusions to *lacZ*: the pJEM series. *J Bacteriol.* **176** (21):6749-53.
- Torres A, Juarez MD, Cervantes R, Espitia C.** 2001. Molecular analysis of *Mycobacterium tuberculosis* phosphate specific transport system in *Mycobacterium smegmatis*. Characterization of recombinant 38 kDa (PstS-1). *Microb Pathog.* **30** (5): 289-97.
- Tullius MV, Harth G, Horwitz MA.** 2001. High extracellular levels of *Mycobacterium tuberculosis* glutamine synthetase and superoxide dismutase in actively growing cultures are due to high expression and extracellular stability rather than to a protein-specific export mechanism. *Infect Immun.* **69** (10): 6348-63.
- Ulstrup JC, Jeansson S, Wiker HG, Harboe M.** 1995. Relationship of secretion pattern and MPB70 homology with osteoblast-specific factor 2 to osteitis following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect Immun.* **63** (2):672-5.
- van Soolingen D, Hermans PW, de Haas PE, Soll DR, van Embden JD.** 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* **29** (11): 2578-86.

- Via LE, Deretic D, Ulmer RJ, Hibler NS, Huber LA, Deretic V.** 1997. Arrest of mycobacterial phagosome maturation is caused by a block in vesicle fusion between stages controlled by rab5 and rab7. *J Biol Chem.* 272 (20): 13326-31.
- Vidal SM, Malo D, Vogan K, Skamene E, Gros P.** 1993. Natural resistance to infection with intracellular parasites: isolation of a candidate for Bcg. *Cell.* 73 (3):469-85.
- von Heijne G.** 1992. Membrane protein structure prediction. hydrophobicity analysis and the positive-inside rule. *J Mol Biol.* 225 (2): 487-94.
- Vosloo W, Tippoo P, Hughes JE, Harriman N, Emms M, Beatty DW, Zappe H, Steyn LM.** 1997. Characterisation of a lipoprotein in *Mycobacterium bovis* (BCG) with sequence similarity to the secreted protein MPB70. *Gene* 188 (1): 123-8.
- Wei ZM, Beer SV.** 1995. *hrpL* activates *Erwinia amylovora hrp* gene transcription and is a member of the ECF subfamily of sigma factors. *J Bacteriol.* 177 (21): 6201-10.
- Wiker HG, Harboe M.** 1992. The antigen 85 complex: a major secretion product of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiol Rev.* 56 (4): 648-61.
- Wiker HG, Lyashchenko KP, Aksoy AM, Lightbody KA, Pollock JM, Komissarenko SV, Bobrovnik SO, Kolesnikova IN, Mykhalsky LO, Gennaro ML, Harboe M.** 1998. Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect Immun.* 66 (4) : 1445-52.
- Wilson M, DeRisi J, Kristensen HH, Imboden P, Rane S, Brown PO, Schoolnik GK.** 1999. Exploring drug-induced alterations in gene expression in *Mycobacterium tuberculosis* by microarray hybridization. *Proc Natl Acad Sci USA* 96 (22): 12833-8.

- World Health Organization.** Global tuberculosis control. WHO report 2001. Geneva, Switzerland, WHO/CDS/TB/2001. 287
- Wu QL, Kong D, Lam K, Husson RN.** 1997. A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J Bacteriol.* **179** (9): 2922-9.
- Xu S, Cooper A, Sturgill-Koszycki S, van Heyningen T, Chatterjee D, Orme I, Allen P, Russell DG.** 1994. Intracellular trafficking in *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium avium*-infected macrophages. *J Immunol.* **153** (6): 2568-78.
- Yanisch-Perron C, Vieira J, Messing J.** 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-19.
- Yeremeev VV, Lyadova IV, Nikonenko BV, Apt AS, Abou-Zeid C, Inwald J, Young DB.** 2000. The 19-kD antigen and protective immunity in a murine model of tuberculosis. *Clin Exp Immunol.* **120** (2): 274-9.
- Young DB, Garbe TR.** 1991a. Heat shock proteins and antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* **59** (9): 3086-93.
- Young DB, Garbe TR.** 1991b. Lipoprotein antigens of *Mycobacterium tuberculosis*. *Res Microbiol.* **142**: 55-65.
- Zhu X, Venkataprasad N, Thangaraj HS, Hill M, Singh M, Ivanyi J, Vordermeier HM.** 1997. Functions and specificity of T cells following nucleic acid vaccination of mice against *Mycobacterium tuberculosis* infection. *J Immunol.* **158** (12): 5921-6.



Characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* region containing the *mpt83* and *mpt70* genes¹

María Dolores Juárez, Ascensión Torres, Clara Espitia *

Departamento de Inmunología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Apartado Postal 70228, 04510 México D.F., México

Received 25 June 2001; accepted 11 July 2001

First published online 21 August 2001

Abstract

Like the products of the genes *mpt83* and *mpt70*, the putative protein encoded by the gene located between these genes was undetectable in *Mycobacterium tuberculosis* with an antiserum raised against the recombinant protein. The protein showed 100% homology with *M. tuberculosis* Rv2874 and similarities with CcdA and DipZ proteins involved in cytochrome-*c* biogenesis in bacteria. Expression analysis by RT-PCR and transcriptional fusions of Rv2874 and their neighbor genes Rv2871, Rv2872, *mpt83* and *mpt70* with *lacZ* suggest that these genes are part of an operon and their transcription is driven by promoter regions located 5' upstream of *mpt83* and of Rv2874 genes. © 2001 Federation of European Microbiological Societies. Published by Elsevier Science B.V. All rights reserved.

Keywords: *mpt83*; *mpt70*; *dipZ*; Cytochrome-*c* biogenesis; Operon; *Mycobacterium tuberculosis*

1. Introduction

The MPB70-MPT70/MPB83-MPT83 are highly homologous proteins of *Mycobacterium bovis* and *Mycobacterium tuberculosis*. The MPB70 is the major secreted antigen of *M. bovis*, while MPB83 is a cell wall lipoprotein [1]. The function of these proteins is unknown, but some evidence suggests they could be involved in bone tropism in mycobacteria [2,3]. These proteins are expressed at low levels in *M. tuberculosis* and in *M. bovis* BCG, strains Pasteur, Copenhagen and Glaxo and highly expressed in *M. bovis* and *M. bovis* BCG, strains Brazil, Moscow, Sweden and Tokyo [1]. Although MPT83 and MPT70 are expressed at low levels in vitro, they are highly immunogenic during infection of mice [1]. The mechanisms that regulate the expression of these genes are unknown. It is believed that these genes could form part of an operon, because they are transcribed in the same orientation, and because the expression of *mpt70* was not driven in *Myco-*

bacterium smegmatis from a DNA fragment containing only this gene, while its expression occurred from a cosmid vector containing both genes [1]. On the other hand, the 2.4-kb region between the *mpt83* and *mpt70* contains the sequence Rv2874 encoding a putative integral membrane protein, which could form part of this putative operon.

In this study, we carried out transcriptional fusions of the genes of this region with the structural *Escherichia coli lacZ* gene in order to study the expression of these *M. tuberculosis* genes in *M. smegmatis*.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms and culture conditions

E. coli DH5 α IQ and XL1-Blue MRF' were used as host for the recombinant plasmids. The mycobacteria strains used in this work were obtained from ATCC. *M. tuberculosis* H37Ra, *M. tuberculosis* H37Rv, *M. bovis* BCG (Glaxo), *Mycobacterium avium*, *Mycobacterium chelonae*, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium kansasii*, *Mycobacterium intracellulare* and *Mycobacterium phlei*, were grown in Löwestein-Jensen media for DNA extraction. *M. smegmatis* mc²155 was used as the host strain for the plasmid pJEM15 [4] and their derivatives.

* Corresponding author. Tel.: +52 (5) 6223884; Fax: +52 (5) 6223369. E-mail address: espitia@servidor.unam.mx (C. Espitia).

¹ The GenBank accession number for the sequence reported in this paper is AF189006.

2.2. Isolation and cloning of the DNA region containing the *mpt83-Rv2874-mpt70* putative operon

We used a previously isolated 0.7-kb DNA fragment from the *M. tuberculosis* λ gt11 DNA library which contains the gene located immediately upstream of *mpt70*. This DNA fragment was used as a probe to screen a cosmid library of *M. tuberculosis* H37Rv in Tropicist 3 [5]. A 4.3-kb *Bam*HI–*Not*I fragment released from a positive cosmid clone containing *mpt83* and truncated *mpt70* was subcloned in pBK-CMV vector to generate pJD201. The DNA sequence of this fragment corresponds to the *M. tuberculosis* genomic sequence positions 3182758–3187112 [6].

2.3. DNA extraction and Southern blot analysis

Chromosomal DNA was extracted from the different mycobacterial strains as described previously [7]. Southern blot was carried out following standard methods. The 1.6-kb *Eco*RV–*Sma*I fragment, containing 195 bp upstream of the Rv2874 start codon, and 1422 bp of its coding region were used as a probe.

2.4. Constructions of the *lacZ* fusions and β -galactosidase (β -gal) assay

Different lengths of DNA fragments of the putative *mpt83-Rv2874-mpt70* operon from pJD201 were transcriptionally fused to the promoter-less *lacZ* gene in the pJEM15 vector as follows: The 1.99-kb *Eco*47III–*Sma*I segment was deleted from pJD201 to produce pJD2011 and after self-ligation to obtain pJD2012, a 2.36-kb *Bam*HI–*Kpn*I fragment was released and subcloned in pJEM15 to obtain pJD20A. The 1.95-kb *Bam*HI–*Sph*I fragment was deleted from pJD20A to produce pJD20B. The 2.45-kb *Eco*RV–*Sma*I fragment was deleted from pJD201, and after self-ligation, a 1.9-kb *Bam*HI–*Kpn*I fragment was released and subcloned in pJEM15 to produce pJD20C. The 0.94-kb *Stu*I–*Kpn*I and a 4.3-kb *Bam*HI–*Kpn*I fragments released from pJD201 were subcloned in pJEM15 to obtain pJD20D and pJD20E, respectively. The 2.9-kb *Kpn*I–*Sa*I fragment with the *Sa*I end gap-filled was released from the pJD201 and was subcloned in pJEM15 to obtain pJD20F. Partial digestion of pJD20C with *Sac*II to delete 1-kb, 0.94-kb and 1.41-kb fragments produced pJD20G, pJD20I and pJD20H, respectively. pJD20I was digested with *Eco*47III, and then it was partially digested with *Cl*aI and the end-gap was filled. Then, a 1.99-kb fragment was released and subcloned in inverted direction into the *Eco*47III–*Sma*I sites of pJD201; after that, a 4.35-kb *Bam*HI–*Kpn*I fragment was released and subcloned in pJEM15 to obtain pJD21D. The pJD21E plasmid was obtained by digestion of pJD20E with *Spe*I–*Not*I, and after filling the end-gaps, the plasmid was self-ligated. To obtain pJD21F, pJD21G, pJD21H, pJD21I, pJD21J

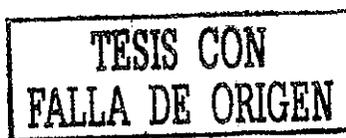
and pJD21K, the pJD2012 and pJD2011 plasmids, were digested with *Spe*I and after filling the end-gaps with thio-dNTP's for protection, they were digested with *Bam*HI and treated with the Stratagene exonuclease III/Mung Bean Nuclease Deletion Kit to obtain 5'-end deletions. The pJD2012-derived plasmids with 5'-end deletions of 0.3 kb, 0.4 kb and 0.78 kb and those derived from pJD2011 with 5'-end deletions of 0.29 kb, 1.3 kb and 1.5 kb were digested with *Pst*I–*Kpn*I and the released fragments were cloned in pUC18. Then, pJD2012-derived plasmids were digested with *Sph*I–*Kpn*I and the released fragments were cloned into similarly digested pJEM15 to obtain pJD21F, pJD21G and pJD21H, respectively. The plasmids derived from pJD2011 were digested with *Hin*dIII, and after filling the end-gaps, the *Kpn*I fragments were released and subcloned into the *Sca*I–*Kpn*I sites of pJEM15 to obtain the plasmid pJD21I, pJD21J and pJD21K.

The constructions of pJD21A containing the putative –10 promoter of Rv2874, pJD21B harboring the putative –10 promoter with four bases changed and pJD21C lacking the –10 sequence, were obtained by PCR amplification by using a common reversed R1 primer located 280 bp from the Rv2874 start codon (5'-GTT GGC GGT ACC GCT CAC GCG AGC GCT G-3') and the following forward primers: F2 for pJD21A, located 96 bp upstream of the Rv2874 start codon (5'-CCG ATA TCG CGA ACT GCG CAA CAA CAC CGC CG-3'); F3m for pJD21B, located 86 bp from the Rv2874 start codon (the changed bases are in bold) (5'-CGG ATA TCG CGA ACT GCG CAA CAA CAC CGC CAA GCC ACT ACG-3') and F1 for pJD21C, located 69 bp upstream of the Rv2874 start codon (5'-CTA CGG CGC CAG CTG GCC GGC G-3'). The F2 and F3m primers were tagged with *Eco*RV, and the F1 and R1 primers were tagged with *Pvu*II and *Kpn*I sites, respectively. The PCR products digested appropriately were cloned into the *Sca*I–*Kpn*I sites of pJEM15 and the inserts were confirmed by DNA sequencing.

M. smegmatis was then transformed by electroporation with the different recombinant plasmids and cultures were grown at 37°C in Middlebrook 7H9 broth (Difco) with 50 μ g ml⁻¹ of kanamycin and supplemented with 0.5% glycerol, 2% glucose and 0.05% Tween 80. β -Gal assays, were performed with 200 μ l of cultures grown at exponential phase as described by Miller [8]. β -Gal units were calculated using the formula $1000 \times OD_{420nm} / \text{time (min)} \times 0.1 \times OD_{600nm}$.

2.5. Recombinant His-Rv2874-C and production of a mouse antiserum

A 1.76-kb *Pvu*II–*Hin*dIII fragment encoding the C-terminal domain of the Rv2874 was fused in frame downstream of an N-terminal polyhistidine tag in pQE32 (Qiagen) to obtain the pJD9714. *E. coli* cells harboring the plasmid pJD9714 were grown at 30°C in Luria–Bertani



150

medium to an OD_{600nm} of 0.5, then 1 mM isopropyl β -D-thiogalactopyranoside was added. After further incubation for 5 h, the His-Rv2874-C was purified by nickel-affinity chromatography and used to produce a polyclonal antiserum in Balb/C mice. Expression and antibody recognition of the recombinant protein was carried out by SDS-PAGE and Western blot, using 5 μ g of the *E. coli* extract, and 1 μ g of purified recombinant protein.

2.6. RT-PCR

The total RNA was obtained with the RNeasy kit (Qiagen) from *M. smegmatis* grown at exponential phase, and transformed with pJD20A, pJD21F and pJD21H constructions. The RT-PCR reactions were carried out by standard procedures using the following primers: MTA, located 240 bp upstream of Rv2871 (5'-CGT CGG ATC AGC ACT AGG GGA TGT CGC-3'); MTB, located 338 bp downstream of the Rv2872 start codon (5'-GCG CTA GAG TAC TAC GCA ACC TGG-3'); MTC, located upstream of the *mpt83* start codon (5'-TCA TCG CTT CGG ATC CTT TGC TTC TGC G-3'); MT18, located downstream of the Rv2871 start codon (5'-GTC CAC CAC CTC-3'); MT16, located 377 bp downstream of the *mpt83* start codon (5'-GTC GAA TGC GGC GTT GGT G-3'); MT11, located 5 bp downstream of the *mpt83* start codon (5'-CGT TCA GGC CAA ACC GGC CGC-3'); MT9, located 46 bp downstream of the Rv2874 start codon (5'-GAT GCG GGA TTG CAC CCG CGA CC-3'); and MT10, located 257 bp from the Rv2874 start codon (5'-GTT GAC AGA GTC GGT TC-3'). The primers 16S1 (5'-GTG CCA GCA CCC GGG GTA ATA CG-3') and 16S2 (5'-CGA GTT GAC CCC GGG AGT CTC TC-3') were used as internal control of gene expression of mycobacteria 16S RNA. In negative controls reverse transcriptase was omitted.

3. Results and discussion

3.1. Cloning and analysis of the nucleotide sequence of the Rv2874

Recently, we isolated and sequenced a gene located between the *mpt83* and the *mpt70* genes (accession number AF189006). This gene showed 100% homology with the Rv2874 reported in the *M. tuberculosis* genome database [6]. By Southern blot analysis, only one copy of Rv2874 was detected in strains of the *M. tuberculosis* complex, as described by the *mpt83* and the *mpt70* (Fig. 1).

Computer analysis of the putative protein encoded by Rv2874 showed an integral membrane protein with an N-terminal domain of about 115 amino acids, a central highly hydrophobic domain of approximately 232 amino acids with conserved cysteine residues and six potential membrane-spanning segments, as predicted by the hydro-

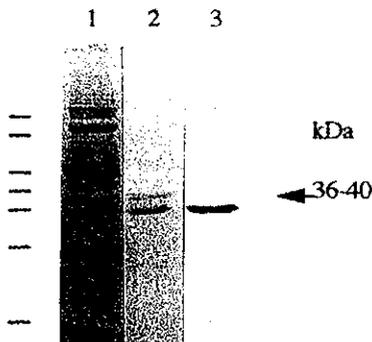


Fig. 3. Recombinant expression and purification of the His-Rv2874-C. Coomassie blue stain of 12% SDS-PAGE with the total cell lysates of *E. coli* DH5 α (Q) (lane 1); transformed bacterial lysate containing His-Rv2874-C of 36–40 kDa (lane 2). Western blot antibody recognition with hyperimmune anti-His-Rv2874-C of nickel-purified His-Rv2874-C (lane 3). Horizontal lines at the left represent molecular mass markers at 92, 66, 55, 42, 40, 31 and 21 kDa.

pathy scale [9], and a C-terminal hydrophilic domain of about 348 amino acid residues, with a disulfide isomerase/thioredoxin-like motif (CINC). This protein shows amino acid sequence homology and a well-defined domain structure similar to proteins involved in cytochrome-c biogenesis like DipZ from *E. coli* [10], *Haemophilus influenzae* [11] and *Pseudomonas aeruginosa* [12]. In addition, the central domain was 21–28% homologous with CcdA-like proteins from *Bacillus subtilis*, *H. influenzae*, *Mycobacterium leprae*, *Synechocystis* sp., *M. tuberculosis*, and *Porphyra purpurea* [13] (Fig. 2A). The C-terminal domain with the CINC motif shows similarity with the thioredoxin/disulfide isomerase-like motif from the periplasmic C-terminal domain of DipZ proteins [10,12] and from thioredoxin proteins of *Bradyrhizobium japonicum* TlpA [14], *B. japonicum* Cyey [15], *Rhodobacter capsulatus* HelX [16] and *Paracoccus denitrificans* CcmG [17] (Fig. 2B).

In view of the presence of the thioredoxin motif in Rv2874, we investigated the disulfide reductase activity in the recombinant His-Rv2874-C thioredoxin domain expressed in *E. coli*, and purified by affinity chromatography (Fig. 3). Although we were unable to detect disulfide reductase activity by a reduction of the insulin disulfide bond assay (data not shown), we can not exclude the possibility that enzymatic activity may be present in vitro or in vivo under specific conditions.

3.2. Analysis of the putative *mpt83*-Rv2874-*mpt70* operon expression by transcriptional fusions with the structural *lacZ* gene

The *M. tuberculosis* Rv2874 lies between the *mpt83* and *mpt70* genes, which encode immunogenic proteins that are important targets of humoral and cellular immune re-

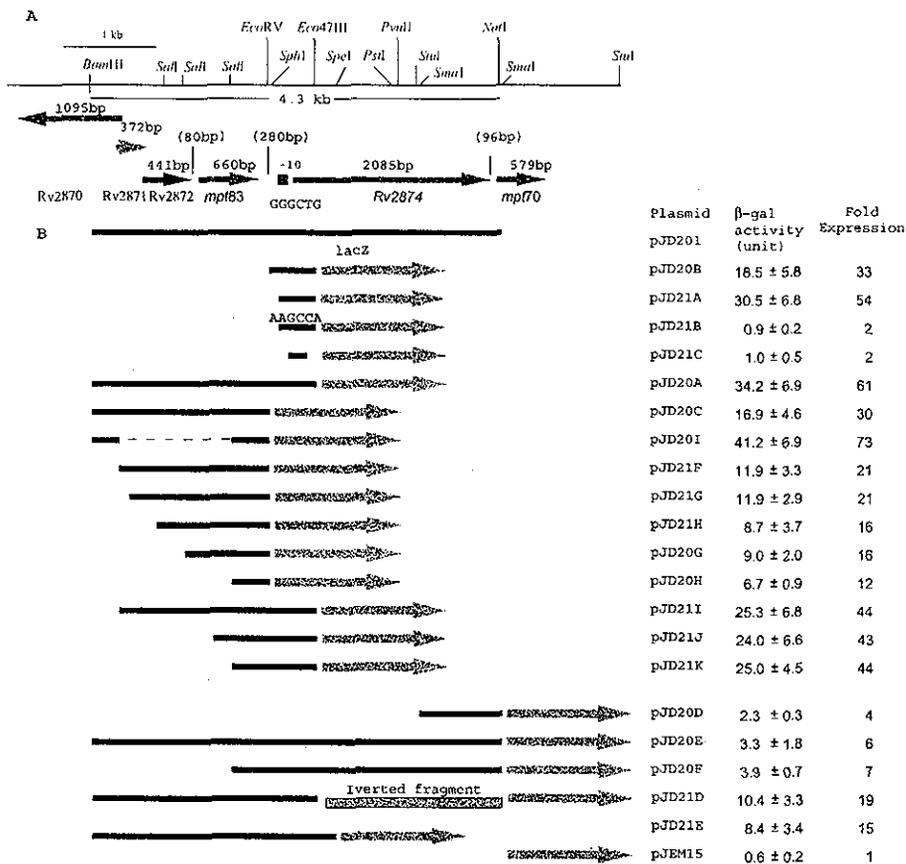


Fig. 4. A: Schematic diagram of the chromosomal region of *M. tuberculosis* H37Rv containing the Rv2874 gene. Orientation of the gene transcription is indicated by arrows. B: Plasmid constructions harboring transcriptional Rv2874-*lacZ* fusions and negative control expression plasmid pJEM15. Dashed line indicates the deletion of a DNA fragment. The β-gal (unit) and fold expression are shown at the right of the figure. Data are presented as means of three experiments.

sponses during infection with bovine and human tubercle bacilli [1]. In the *M. tuberculosis* genome, upstream of the *mpt83*, are two genes: the Rv2871 and the Rv2872, which encode hypothetical proteins with unknown functions (Fig. 4A). Downstream of *mpt70* is the Rv2876, encoding a protein similar to a glutamine synthetase isoenzyme. All of these genes are transcribed in the same orientation and it is believed that they are organized in an operon. Analysis of the sequence located between *mpt83* and Rv2874 showed a putative mycobacterial -10 region (GGGCTG) located 91 bp upstream of the Rv2874 translation start codon, which matches with four bases of the -10 region from *M. tuberculosis* antigen 85A promoter (CGCCTG) [18] with *M. smegmatis* *ask* promoter (ACGCTG) [19] and with *Streptomyces* *afsA* and *vph* promoter 2 [20].

To assess if this putative promoter sequence drives the

transcription of Rv2874, and to determine if their neighboring genes are organized in a transcriptional unit, different transcriptional fusions of the DNA region with the *lacZ* reporter gene were carried out. β-Gal activities for all the constructions are shown in Fig. 4B. Constructions which contain the putative -10 region (pJD20B and pJD21A) showed an increase in β-gal activity of 33- and 54-fold compared with the control pJEM15. In contrast, β-gal activity was nearly undetectable when the -10 region was mutated (pJD21B) or deleted (pJD21C). These results suggest that this region is the -10 promoter element of Rv2874. On the other hand, it is worth mentioning that a putative -35 region (GAACTG), 113–118 bp upstream of the Rv2874 start codon, resembles the -35 region (GAACCT) recognized by Sigma E factors [21], which regulate gene expression in response to environmen-

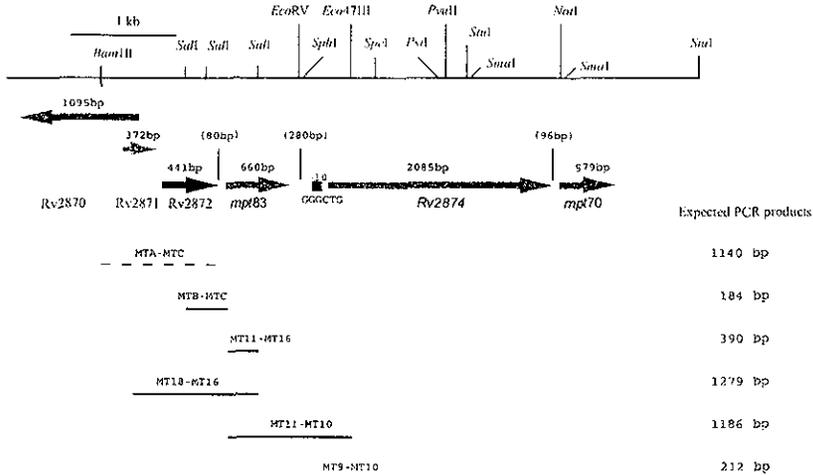


Fig. 5. Schematic diagram of the expected PCR products obtained by RT-PCR. The PCR products obtained are indicated by solid lines. The PCR product not amplified is indicated by dashed line.

tal conditions in several bacterial species including mycobacteria [22]. The presence of this sequence upstream of *Rv2874*, could be an indication that this gene responds to environmental signals.

The influence of the promoter activity located upstream of *mpt83* was also examined by comparison of β -gal activity of pJD20B with pJD20A and pJD20C. The increase in β -gal activity of pJD20A was twice higher than that observed with pJD20B and with pJD20C, which suggests the presence of one or more promoter sequences upstream of *mpt83*. The decrease, but not lost, of β -gal activities by 5'-end deletions with constructions pJD20I, 73-fold; pJD21F and pJD21G, 21-fold; pJD21H and pJD20G, 16-fold and pJD20H, 12-fold agree with the presence of promoters upstream of *Rv2871*, *Rv2872* and *mpt83* and also downstream of *mpt83*. The effect of the putative promoters over the transcription of *Rv2874* was then evaluated with constructions pJD21I, pJD21J and pLD21K. Their β -gal activities were similar but lower than pJD20A, suggesting the existence of an operon promoter located upstream of *Rv2871*.

On the other hand, no β -gal activity was found with the construction pJD20D which contains 1110 bp upstream of the *mpt70* start codon and 83 bp of its coding region. This result is in agreement with the undetected expression of *mpt70* from a DNA fragment containing a similar upstream region in *M. smegmatis* [1] and supports the existence of an operon array of these genes. The influence of the putative operon promoter in the expression of *mpt70* was also studied with constructions pJD20E and pJD20F, which showed a dramatic decrease in β -gal activity. Since both constructions have the complete coding sequence of the *Rv2874* in common and this effect was not observed

with pJD20B and pJD20A (without this region), then the lack of expression of these constructions could be attributable to the action of a negative regulatory DNA element located downstream of the *Eco47III* site of the *Rv2874* encoding region. In order to assess this possibility, the DNA sequence of this region was cloned inverted (pJD21D). The β -gal activity in this construction was increased three-fold with respect to pJD20E, however, the activity was not recovered at the same level as for pJD20A; it could be explained by the attenuation of the transcriptional negative regulatory DNA element in this region, when the DNA sequence is inverted. Interestingly, the presence of 118 codons of the *Rv2874* N-terminal region (pJD21E) was sufficient to decrease the β -gal activity.

The low expression levels reported for the *mpt83* and *mpt70* genes in *M. tuberculosis* H37Rv [1] are in agreement with the β -gal activity observed with the pJD20E construction and with the unsuccessful effort to immunodetect the protein product of the *Rv2874* gene with an antiserum raised against the recombinant His-*Rv2874*-C of 36/40 kDa, in sonicated extracts or membrane fractions from *M. tuberculosis* H37Rv or *M. bovis* BCG done in this study (not shown).

3.3. Analysis of the co-transcription of *Rv2874* with the *mpt83* by RT-PCR

In this study, the co-transcriptional analysis of the *mpt83* and the *Rv2874* by RT-PCR with RNA extracted from *M. tuberculosis* H37Rv was unsuccessfully due to the low level of expression of these genes. However, the total RNA obtained from *M. smegmatis* transformed with different constructions allowed us to study the possibility of

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

154

an operon array of these genes by RT-PCR (Fig. 5). Using the primer combination, which encompasses different regions, PCR products of the expected size were obtained with the cDNA from pJD20A. Amplified fragments of 1279, 1186 and 212 bp were obtained with the primer pairs MT18-MT16, MT11-MT10, MT9-MT10, respectively. These results suggest that Rv2871, Rv2872, *mpt83* and Rv2874 are being transcribed as part of an operon, and the mRNA begins after the site of MTA hybridization (240 bp upstream of the Rv2871), as deduced by the lack of amplification of the 1140-bp fragment expected with MTA-MTC primers (not shown). Finally, to assess the possibility that additional promoter elements were located within this putative operon, RT-PCR were carried out with the total RNA from the *M. smegmatis* transformed with pJD21F and pJD21H, by using the primer pairs MTB-MTC, and MT11-MT16. Faint PCR products of the expected size of 184 bp for MTB-MTC primers and 390 bp for MT11-MT16 primers were amplified with the RNA from *M. smegmatis* harboring the pJD21F, while only the PCR band of 390 bp for MT11-MT16 primers was amplified with the RNA from *M. smegmatis* harboring the pJD21H. These observations suggest the existence of promoter regions located upstream of Rv2874, as observed with the transcriptional fusion studies.

This study supports the idea that the *mpt83*-Rv2874-*mpt70* are part of a large operon with a promoter located upstream of the Rv2871 and with internal promoters which could be playing a specific role in differential transcription which remains to be determined. This organization also suggests the existence of a functional relationship between the Rv2874 and MPT83/MPT70. Both proteins have been implicated in bone tropism in mycobacteria [2,3], and the mature MPB70 and MPB83 could be forming ring structures by internal disulfide bonding [23]. Because of its potential thio-reductive functions, it is possible that Rv2874 could be playing a role in the formation of the MPB70 and MPB83 internal disulfide bridges.

Acknowledgements

We thank L. Servin and M. Bradbury for critical reading of the manuscript, G. Acero and M. Baca for technical assistance and A.P. Gaytan and E. Lopez-Bustos for oligonucleotide synthesis. The Tropist 3 was kindly provided by K. De Smet, the pMV261 vector and *M. smegmatis* mc²155 by W.R. Jacobs Jr. This research was supported by the DGAPA Grant (No. IN207195) and PADEP (No. 030311) from the Universidad Nacional Autónoma de México.

References

- [1] Hewinson, R.G., Michell, S.L., Russell, W.P., McAdam, R.A. and Jacobs, W.R. Jr. (1996) Molecular characterization of MPT83: a seroreactive antigen of *Mycobacterium tuberculosis* with homology to MPT70. *Scand. J. Immunol.* 43, 490–499.
- [2] Matsumoto, S., Matsuo, T., Ohara, N., Hotokezaka, H., Naito, M., Minami, J. and Yamada, T. (1995) Cloning and sequencing of a unique antigen MPT70 from *Mycobacterium tuberculosis* H37RV and expression in BCG using *E. coli*-Mycobacteria shuttle vector. *Scand. J. Immunol.* 41, 281–287.
- [3] Ulstrup, J.C., Jeansson, S., Wiker, H.G. and Harboe, M. (1995) Relationship of secretion pattern and MPB70 homology with osteoblast-specific factor 2 to osteitis following *Mycobacterium bovis* BCG vaccination. *Infect. Immun.* 63, 672–675.
- [4] Tim, J., Lim, E.M. and Gicquel, B. (1994) *Escherichia coli* mycobacteria shuttle vector for operon and gene fusions to *lacZ*: the pJEM series. *J. Bacteriol.* 176, 6749–6753.
- [5] De Smet, K.A., Jamil, S. and Stoker, N.G. (1993) Tropist3: a cosmid vector for simplified mapping of both G+C rich and A+T rich genomic DNA. *Gene* 136, 215–219.
- [6] Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V., Eiglmeier, K., Gas, S., Barry 3rd, C.E., Tekaiia, 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, M.A., Rajandream, M.-A., Rogers, J., Rutter, S., Seeger, K., Skelton, J., Squares, S., Squares, R., Sulston, J.E., Taylor, K., Whitehead, S. and Barrell, B.G. (1998) Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature* 393, 537–544.
- [7] van Soolingen, D., Hermans, P.W., de Haas, P.E., Soll, D.R. and van Embden, J.D. (1991) Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis*: complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* 11, 2578–2586.
- [8] Miller, J.H. (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- [9] Kyte, J. and Doolittle, R.F. (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J. Mol. Biol.* 157, 105–132.
- [10] Croke, H. and Cole, J. (1995) The biogenesis of c-type cytochromes in *Escherichia coli* requires a membrane-bound protein, DipZ, with a protein disulphide isomerase-like domain. *Mol. Microbiol.* 15, 1139–1150.
- [11] Fleischman, R.D., Adams, M.D., White, O., Clayton, R.A., Kirkness, E.F., Kerlavage, A.R., Bult, C.J., Tomb, J.F., Dougherty, B.A., Merrick, J.M., McKenney, K., Sutton, G.G., FitzHugh, W., Fields, C.A., Gocayne, J.D., Scott, J.D., Shirley, R., Liu, L.I., Glodek, A., Kelley, J.M., Weidman, J.F., Phillips, C.A., Spriggs, T., Hedblom, E., Cotton, M.D., Utterback, T., Hanna, M.C., Nguyen, D.T., Saudek, D.M., Brandon, R.C., Fine, L.D., Fritchman, J.L., Fuhrmann, J.L., Geoghagen, N.S., Gnehm, C.L., McDonald, L.A., Small, K.V., Fraser, C.M., Smith, H.O. and Venter, J.C. (1995) Whole-genome random sequencing and assembly of *Haemophilus influenzae* Rd. *Science* 269, 496–512.
- [12] Page, M.D., Saunders, N.F. and Ferguson, S. (1997) Disruption of the *Pseudomonas aeruginosa* *dipZ* gene, encoding a putative protein-disulfide reductase, leads to partial pleiotropic deficiency in c-type cytochrome biogenesis. *Microbiology* 143, 3111–3122.
- [13] Schiött, T., von Wachenfeldt, C. and Hederstedt, L. (1997) Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 179, 1962–1973.
- [14] Loferer, H., Bott, M. and Hennecke, H. (1993) *Bradyrhizobium japonicum* TlpA, a novel membrane-anchored thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of cytochrome aa3 and development of symbiosis. *EMBL J.* 12, 3373–3383.
- [15] Fabianek, R.A., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., Künzler, P., Hennecke, H. and Thöny-Meyer, L. (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CysY protein, a membrane-anchored

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

155

- periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochrome. *J. Biol. Chem.* 272, 4467–4473.
- [16] Beckman, D.L. and Kranz, R.G. (1993) Cytochrome *c* biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 2179–2183.
- [17] Page, M.D. and Ferguson, S.J. (1997) *Paracoccus denitrificans* CcmG is a periplasmic protein-disulphide oxidoreductase required for c- and aa3-type cytochrome biogenesis, evidence for a reductase role in vivo. *Mol. Microbiol.* 24, 977–990.
- [18] Kremer, L., Baulard, A., Estaquier, J., Content, J., Capron, A. and Locht, C. (1995) Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* 85A antigen promoter region. *J. Bacteriol.* 177, 642–653.
- [19] Cirillo, J.D., Weisbrod, T.R., Pascopella, L., Bloom, B.R. and Jacobs Jr., W.R. (1994) Isolation and characterization of the aspartokinase and aspartate semialdehyde dehydrogenase operon from mycobacteria. *Mol. Microbiol.* 11, 629–639.
- [20] Strohl, W.R. (1992) Compilation and analysis of DNA sequences associated with apparent streptomycete promoters. *Nucleic Acids Res.* 20, 961–974.
- [21] Lonetto, M.A., Brown, K.L., Rudd, K.E. and Buttner, M.J. (1994) Analysis of the *Streptomyces coelicolor* sigE gene reveals the existence of a subfamily of eubacterial RNA polymerase factors involved in the regulation of extracytoplasmic functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91, 7573–7577.
- [22] Wu, Q.L., Kong, D., Lam, K. and Husson, R.N. (1997) A mycobacterial extracytoplasmic function sigma factor involved in survival following stress. *J. Bacteriol.* 179, 2922–2929.
- [23] Wiker, H.G., Lyashchenko, K.P., Aksoy, A.M., Lightbody, K.A., Pollock, J.M., Komissarenko, S.V., Bobrovnik, S.O., Kolesnikova, I.N., Mykhalsky, L.O., Gennaro, M.L. and Harboe, M. (1998) Immunochemical characterization of the MPB70/80 and MPB83 proteins of *Mycobacterium bovis*. *Infect. Immun.* 66, 1445–1452.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

156