



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
FACULTAD DE QUÍMICA**

**CARACTERIZACIÓN CINÉTICA DE UNA CEPA TERMOINDUCIBLE  
RECOMBINANTE DE *ESCHERICHIA COLI* PRODUCTORA DE LA PROTEÍNA  
INMUNOGÉNICA CFP-10 DE *MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS* EN CULTIVO  
SUMERGIDO**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**Jennifer Enciso García**

**TUTOR:**

**Mauricio A. Trujillo Roldán**

**MÉXICO, D.F.**

**SEPTIEMBRE, 2013**

---



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:**           **Profesor: Marco Antonio Ortiz Jiménez**

**VOCAL:**               **Profesor: Alejandro Camacho Cruz**

**SECRETARIO:**       **Profesor: Mauricio Alberto Trujillo Roldán**

**1er. SUPLENTE:**      **Profesor: Ruth Edith Martín Fuentes**

**2° SUPLENTE:**       **Profesor: Beatriz Ruiz Villafán**

## **SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR Y BIOTECNOLOGÍA**

## **ASESOR DEL TEMA:**

**Dr. Mauricio A. Trujillo Roldán**

## **SUSTENTANTE (S):**

**Jennifer Enciso García**

---

# Índice

Índice de figuras y tablas.....	1
Abreviaturas y símbolos.....	4
Resumen.....	6
1. Introducción.....	7
2. <b>Antecedentes</b> .....	11
2.1 Historia de la tuberculosis .....	11
<b>2.2 Patogenia</b> .....	13
2.3 <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	15
2.3.1 Región RD1: ESAT-6 y CFP-10.....	16
2.3.2 CFP-10 como <b>proteína inmunogénica</b> .....	18
2.4 Expresión de proteínas heterólogas en <i>Escherichia coli</i> .....	20
2.4.1 Sistemas termoinducibles en <i>E. coli</i> : represor termolábil <b>cI857</b> .....	23
3. Justificación.....	27
4. Objetivos.....	27
<b>4.1 Objetivo general</b> .....	27
<b>4.2 Objetivos particulares</b> .....	27
5. <b>Hipótesis</b> .....	28
6. Estrategia experimental.....	29
7. Materiales y métodos.....	30
7.1 Cepa de <i>E. coli</i> recombinante pΔBlue_CFP-10.....	30
7.2 Determinación de peso seco y elaboración de una curva estándar de Peso seco vs. Densidad óptica.....	31
7.3 Cultivos en matraces agitados. Cinéticas de crecimiento...	31
7.4 Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento.....	32
7.5 Cuantificación de proteína total por método de Bradford...	32

---

7.6 Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE).....	33
7.7 Western Blot.....	33
7.8 Purificación de proteína por afinidad con níquel.....	34
7.9 Espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF).....	35
8. Resultados <b>y discusión</b> .....	36
8.1 Curva estándar y selección del medio de cultivo.....	36
8.2 Cinéticas de crecimiento con tres temperaturas de inducción y dos diferentes tiempos de inducción.....	39
8.3 Purificación de proteína por afinidad con níquel y análisis por MALDI-TOF.....	45
8.4 Secuenciación.....	48
8.5 Producción de la proteína <b>inducible de 26 kDa</b> .....	48
9. Conclusiones.....	50
10. <b>Perspectivas</b> .....	51
11. Bibliografía.....	52
<b>12. Bibliografía digital</b> .....	62

---

## Índice de figuras y tablas

<b>Figura 1.</b> Genes presentes en el locus RD1 y genes adyacentes a RD1 de <i>M. tuberculosis</i> . Las flechas indican el sentido de la transcripción. Adaptado de: Ganguly <i>et al.</i> , 2008.....	17
<b>Figura 2.</b> Frecuencia del uso de codones en <i>Escherichia coli</i> . Tomado de: Gene Infinity LLC, 2013.....	22
<b>Figura 3.</b> Representación de los promotores pL o pR bajo el control del represor termolábil cI857. Tomado de: Valdez-Cruz <i>et al.</i> , 2010...	24
<b>Figura 4.</b> Comparación esquematizada de la respuesta molecular durante la inducción química y la inducción térmica con sobreexpresión de proteína recombinante (PR). Tomado de: Valdéz-Cruz <i>et al.</i> , 2011.....	26
<b>Figura 5.</b> Representación de la construcción pΔBlue_CFP-10.....	30
<b>Figura 6.</b> Curva estándar de peso seco (g/L) vs. Absorbancia (D.O. 600 nm) de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10.....	36
<b>Figura 7.</b> Comparación de cinéticas de crecimiento en medio LB y en medio TB para elección del medio de cultivo óptimo para la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10.....	37
<b>Figura 8.</b> SDS-PAGE de muestras de las cinéticas de crecimiento en medio LB y medio TB.....	38

<b>Figura 9.</b> Cinéticas de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 37°C.....	40
<b>Figura 10.</b> Cinéticas de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 40°C....	41
<b>Figura 11.</b> Cinéticas de crecimiento de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 42°C ...	41
<b>Figura 12.</b> Comparación entre cinéticas de crecimiento de cultivos de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 inducidos a las 3 horas.....	42
<b>Figura 13.</b> Comparación entre cinéticas de crecimiento cultivos de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 inducidos a las 5 horas.....	43
<b>Figura 14.</b> Comparación de las velocidades específicas de crecimiento determinadas a partir de los cultivos de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 con distintas condiciones de inducción.....	44
<b>Figura 15.</b> Comparación de la biomasa final de los cultivos de la cepa de <i>E. coli</i> pΔBlue_CFP-10 con distintas condiciones de inducción.....	44
<b>Figura 16.</b> SDS-PAGE de las muestras obtenidas a partir de la purificación por afinidad con níquel.....	45
<b>Figura 17.</b> MALDI-TOF de muestra digerida con LysC realizado en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM.....	47

<b>Figura 18a y 18b.</b> SDS-PAGE de muestras de tiempos finales (25 horas) de cultivos inducidos a 37, 40 y 42 °C e inducción a las 3 y 5 horas de cultivo, por triplicado.....	49
<b>Figura 19.</b> Comparación del porcentaje de proteína de 26kDa obtenido por densitometría de SDS-PAGE.....	50
<b>Tabla 1.</b> Simulación de digestión de la proteína CFP-10 de <i>M. tuberculosis</i> H37Rv por LysC. ( <a href="http://www.uniprot.org/uniprot/C5EWW6">http://www.uniprot.org/uniprot/C5EWW6</a> ).....	46



## Abreviaturas y símbolos

$\mu$	Velocidad específica de crecimiento.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNdc	Ácido desoxirribonucleico de doble cadena.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal.
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato. Principal nucleótido para la obtención de energía celular.
BCG	Bacilo Calmette-Guérin.
BSA	Albúmina sérica bovina.
bTB	Tuberculosis bovina.
CFP-10	' <b>Culture filtrate protein</b> '. Proteína antigénica secretora de <i>Mycobacterium sp.</i> de aproximadamente 10kDa de peso molecular.
CI	Cuerpos de inclusión.
DO	Densidad óptica.
ESAT-6	' <b>Early secretory antigenic target</b> '. Proteína antigénica secretora de <i>Mycobacterium sp.</i> de aproximadamente 6kDa de peso molecular.
FDA	' <b>Food and drug administration</b> '
H37Ra	Cepa avirulenta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
H37Rv	Cepa virulenta de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .
hTB	Tuberculosis humana
Hsp	Proteínas de respuesta de choque térmico.
HSR	Respuesta de choque térmico.
IFN- $\gamma$	Interferón gamma. Citocina pro-inflamatoria.

IPTG	Isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido. Inductor químico.
kDa	Kilo Daltons. Unidad de peso molecular.
kpb	Kilo pares de bases. Unidad de longitud de ácidos nucleicos.
LB	Medio de cultivo complejo Luria-Bertani.
MALDI-TOF	'Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of <b>Flight</b> '. Método espectroscópico.
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad.
ORF	Marcos abiertos de lectura.
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa.
PPD	Derivado proteico purificado de <i>M. tuberculosis</i> lisadas por calor empleado como herramienta de diagnóstico de tuberculosis.
PR	Proteína recombinante.
RD1	' <b>Region of difference</b> '. Región de ADN codificante de los antígenos CFP-10 y ESAT-6, identificada en <i>M. tuberculosis</i> y <i>M. bovis</i> .
sSNP	Polimorfismos de nucleótido simple.
TB	Medio de cultivo complejo Terrific-Broth.
TNF	Factor de necrosis tumoral. Citocina pro-inflamatoria.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

## Resumen

La tuberculosis humana (hTB) y la tuberculosis bovina (bTB) son un problema de salud mundial con un importante impacto económico. Comparaciones hechas entre los genomas de *Mycobacterium tuberculosis* y *M. bovis* con la vacuna BCG identificaron la delección de una región de ADN codificante para proteínas secretoras, entre las cuales se encuentra la proteína inmunogénica CFP-10. El empleo de antígenos específicos, como CFP-10, ha abierto un campo de estudio para el mejoramiento de las herramientas de prevención y diagnóstico contra la hTB y bTB. Así mismo, el uso de las herramientas biotecnológicas adecuadas para la producción de proteínas recombinantes (PR), aumenta la posibilidad de su escalamiento, tal es el caso del uso de cepas recombinantes de *Escherichia coli* con promotores termoinducibles que disminuyen el costo de purificación de la proteína deseada. La finalidad de éste proyecto fue buscar en cultivo sumergido, las condiciones óptimas de inducción y medio de cultivo para la producción de una PR que podría ser CFP-10 de *M. tuberculosis* en *E. coli*.

Mediante la comparación de cinéticas de crecimiento, se eligió el medio Terrific-Broth frente a Luria-Bertani, para el crecimiento de la cepa recombinante de *E. coli*. Se realizaron cinéticas de crecimiento empleando distintas temperaturas de inducción (37, 40 y 42°C) a distintos tiempos de inducción (3 y 5 horas). Se observó que las mayores producciones de biomasa se alcanzaron induciendo a las 5 horas de cultivo y a una temperatura de 37 y 40°C. A partir de un cultivo en matraz convencional de 250 mL de medio se pretendió purificar la proteína CFP-10 por cromatografía de afinidad. Se analizaron las fracciones por SDS-PAGE, Western Blot y análisis por MALDI-TOF. Los resultados fueron que no se encontró la expresión de CFP-10 sugiriendo una mala construcción de la cepa, hecho que se corroboró por la secuenciación de la construcción. Sin embargo, se analizó la sobreexpresión, aparentemente termoinducida, de una proteína de 26 kDa que pudiera ser la proteína represora cl857.

## 1. Introducción

La tuberculosis humana (hTB), causada principalmente por *Mycobacterium tuberculosis*, es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad (Smith, 2003., Smith *et al.*, 2009) y es la segunda causa mundial de mortalidad causada por un agente infeccioso (WHO, 2012), presentando más de 8 millones de casos y cobrando alrededor de 1.5 millones de vidas anualmente en todo el mundo (WHO, 2012). Específicamente en México, durante el año 2011, se reportaron 26,000 casos nuevos de hTB, de los cuales se estima que 2.4% de los casos de hTB pulmonar fue causada por cepas multirresistentes (WHO, 2013). La hTB es considerada una enfermedad re-emergente debido a la aparición de brotes infecciosos a partir del año 2007 asociados al surgimiento de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a una amplia variedad de fármacos, al incremento en la incidencia de desnutrición, consumo de tabaco y de patologías inmunosupresoras como diabetes e infecciones con VIH (WHO, 2012, Corbett *et al.*, 2003).

Paralelamente, la tuberculosis bovina (bTB) causada por *Mycobacterium bovis* genera importantes pérdidas económicas alrededor del mundo por el sacrificio de cabezas de ganado, la disminución en la productividad de los animales infectados y la implementación de programas de control epidemiológico (Hope & Villareal-Ramos., 2008, Michel *et al.*, 2010). Una proporción desconocida de los casos de hTB es causada por *M. bovis* (Cosivi *et al.*, 1998), clínicamente indistinguibles de los casos provocados por *M. tuberculosis*. La transmisión zoonótica de bTB ocurre por el consumo y manejo de productos cárnicos y lácteos sin pasteurizar provenientes de animales infectados, y a través de aerosoles en la proximidad al ganado infectado (Cosivi *et al.*, 1998, Portillo-Gómez & Sosa-Iglesias, 2011).

La vacuna conocida como BCG o bacilo Calmette-Guérin es la medida preventiva más empleada en el mundo contra la hTB, anualmente se administran alrededor de 120 millones dosis (WHO, 2013). En la prevención de los casos de tuberculosis meníngea y miliar en niños, ésta vacuna ha demostrado tener una eficacia elevada (Trunz *et al.*, 2006). Sin embargo, en evaluaciones más generales realizadas en poblaciones vacunadas a distintas edades, se ha comprobado que su eficacia protectora oscila entre 0 y 80%, atribuido a las variaciones en la cepa de las preparaciones de BCG, diferencias nutricionales o genéticas entre poblaciones y a la influencia de factores ambientales (Fine, 1995).

Actualmente la tuberculosis no pueden ser diagnosticada diferencialmente según si se encuentra en estado activo o en estado de latencia (Dinnes *et al.*, 2007). La prueba diagnóstica empleada para identificar infección latente de tuberculosis es el test de tuberculina o prueba cutánea de PPD (Paterson, 1948). El PPD, al ser un precipitado de proteínas obtenidas de cultivos de *M. tuberculosis* lisadas por calor, consta de una amplia gama de antígenos presentes, tanto en micobacterias patógenas como en micobacterias ambientales (Aagaard *et al.*, 2010, MacIntyre, 2007), razón por la cual no logra diferenciar entre individuos sanos previamente vacunados con BCG o que han entrado en contacto con micobacterias ambientales, de aquellos con tuberculosis en estado de latencia (Brock *et al.*, 2001, Huebner *et al.*, 1993, Farhat *et al.*, 2006). Por otro lado, el diagnóstico de tuberculosis activa se lleva a cabo mediante baciloscopía y cultivo selectivo de muestras de tejidos, fluidos o secreciones de órganos de pacientes con manifestaciones clínicas y radiológicas. Algunas de las técnicas recientemente empleadas para agilizar el diagnóstico consisten en el uso de PCR, test inmunológicos basados en la respuesta inmunitaria de base celular y búsqueda de anticuerpos específicos (Perkins, 2000.,

Kulshrestha *et al.*, 2005). Los test serológicos basados en inmunodetección han reportado un intervalo de sensibilidad de 16-57% y especificidad de 62-100% (Pottumarthy *et al.*, 2000).

Comparaciones hechas entre los genomas de *M. tuberculosis* y *M. bovis* con la vacuna de BCG identificaron la delección de una región de ADN de 9.5 kpb denominada RD1 (Behr *et al.*, 1999). RD1 tiene un papel importante en la virulencia, demostrado experimentalmente por la pérdida de virulencia de cepas mutadas en genes individuales de RD1. Además de la pérdida de virulencia de dichas cepas mutadas, se observó la eliminación completa de la secreción de CFP-10 y ESAT-6 en el sobrenadante de los cultivos (Guinn *et al.*, 2004). Se ha observado que CFP-10 y ESAT-6 forman un complejo 1:1 (Renshaw *et al.*, 2002), el cual interactúa con la superficie de los macrófagos *in vitro* (Renshaw *et al.*, 2005) sugiriendo que pueden afectar negativamente diversas funciones de las células huésped favoreciendo la residencia de las micobacterias en el interior de los macrófagos por largos periodos de tiempo (Van der Wel *et al.*, 2007). Cabe señalar que algunos estudios han sugerido que la administración del heterodímero podría presentar menor capacidad para estimular células T *in vitro*, respecto a la administración individual de las proteínas (Marei *et al.*, 2005). En pruebas realizadas en animales de Argentina, México e Irlanda del Norte se encontró que los animales que mostraban reactividad cruzada con otras micobacterias ambientales en la prueba de PPD bovino, no la mostraban frente a pruebas realizadas con los antígenos ESAT-6 y CFP-10, o bien se lograban detectar casos falsos negativos (Aagaard *et al.*, 2010). En humanos se han detectado patrones similares donde la utilización de estos antígenos aportaba resultados con un 73% de sensibilidad y 93% de especificidad (Van Pinxteren *et al.*, 2000).

La búsqueda de nuevas herramientas de diagnóstico y de vacunas eficientes contra la hTB y bTB implican un reto importante para la disminución de su impacto tanto a nivel de salud como a nivel económico. Las perspectivas en cuanto al uso de antígenos específicos, como CFP-10, son alcanzables mediante el uso de herramientas biotecnológicas, lo cual, nos permite producir proteínas recombinantes mediante procesos más productivos, menos costosos y fácilmente escalables.

La finalidad de éste proyecto es buscar, en cultivo sumergido, las condiciones óptimas de inducción y medio de crecimiento para la producción del antígeno CFP-10 de *M. tuberculosis* en *Escherichia coli*, uno de los huéspedes procariontes más empleado debido a que se encuentra muy bien caracterizada, tiene un bajo costo de cultivo, rápido y abundante crecimiento, capacidad de acumulación intracelular de proteínas heterólogas mayor al 20% de la proteína total y disponibilidad de una amplia gama de vectores de expresión, entre los cuales se encuentran los vectores con promotores termoinducibles (Schmidt, 2004). La termoinducción empleando promotores pL y pR derivados del fago lambda, virus dcADN que infecta a *E. coli*, es mediada por la proteína termolábil represora CI857, la cual de manera nativa, lleva a cabo la regulación genética entre el ciclo lítico o el ciclo lisogénico en el fago lambda (Makrides, 1996).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Historia de la tuberculosis**

Las pruebas de hTB de mayor antigüedad, consistentes en huesos aparentemente deformados como consecuencia de la tuberculosis, remontan a más de 4,000 años y fueron encontrados principalmente en Egipto y regiones neolíticas (Smith, 2003). Sin embargo, el registro más antiguo de tuberculosis, identificado por la sintomatología, corresponde a tabletas Asirias y escritos hipocráticos del siglo V y VII a.C. (Smith, 2003, Iseman, 1994). Se ha supuesto que la tuberculosis fue llevada a regiones asiáticas y europeas por la migración de ganaderos indo-europeos infectados zoonóticamente por el contacto con ganado tuberculoso (Stead, 1997).

Durante la segunda revolución industrial, la población europea fue víctima de numerosas epidemias de tuberculosis, las cuales se vieron disminuidas después de programas de remodelación de centros urbanos, el mejoramiento de servicios sanitarios y una posible selección natural hacia poblaciones resistentes a la tuberculosis (Lipsitch, 2002). Sin embargo, en las expediciones realizadas al nuevo continente durante el siglo XIX, las epidemias europeas se diseminaron a poblaciones que no habían adquirido la resistencia teniendo importantes consecuencias (Grigg, 1958, Stead, 1992).

El alto índice de mortalidad por hTB en el siglo XIX, desencadenó una serie de investigaciones sobre los posibles agentes y causas etiológicas de la enfermedad. En 1865, Jean-Antoine Villemin, médico francés, reportó haber inducido tuberculosis en conejos de laboratorio por medio de la inoculación de tejido tuberculoso de un cadáver humano (Smith, 2003). Por otra parte, Robert Koch reportó que la hTB era causada por



una bacteria. A pesar de las observaciones realizadas por Villemin y Koch, el médico francés, Herman Pidoux, afirmaba que la incidencia de hTB se debía a causas más sociales como la mala alimentación, deficiencias sanitarias y explotación laboral (Barnes, 2000). Fue hasta inicios del siglo XX cuando los trabajos de Edward Trudeau resolvieron la divergencia entre las causas etiológicas de la hTB, demostrando que podía inducirse la tuberculosis en conejos a partir de un cultivo purificado de *M. tuberculosis* (Trudeau, 1887). Sin embargo, la evolución de la enfermedad dependía de factores ambientales como limitación de alimento, presencia de luz, disponibilidad de espacio y aireación (Trudeau, 1887). Los hallazgos de E. Trudeau fueron la base del movimiento sanitario que comenzó en Europa como medida para el control de la hTB (Smith, 2003).

La vacuna empleada actualmente, fue desarrollada entre 1908 y 1921 por Calmette y Guérin mediante la realización de 230 pases *in vitro* de una cepa de *M. bovis* (Calmette & Guérin, 1920). Debido a la falta de métodos de conservación de la cepa atenuada en la época de su obtención, se realizaron aproximadamente 1000 pases adicionales hasta que se liofilizó en 1960 (Calmette & Guérin, 1920). El mantenimiento por pases continuos dio origen a cepas hermanas fenotípicamente diferentes, colectivamente conocidas como BCG (Behr *et al.*, 1999). Dicha diferenciación de la cepa podría explicar la variabilidad observada en la eficacia de la vacuna BCG y su reactividad cruzada, observada frecuentemente, con la prueba de tuberculina (Trunz *et al.*, 2006, Fine, 1995, Van Epps, 2006).

La hTB fué controlada a finales del siglo XIX e inicios del siglo XX, gracias al mejoramiento de las condiciones sanitarias, el comienzo de la era de los antibióticos en 1940 con los descubrimientos de Alexander

Fleming y René Dubos (Van Epps, 2006), y al uso de la vacuna BCG (Andersen, 2002).

A finales del siglo XX se observó un resurgimiento de hTB en el mundo asociada al aumento de poblaciones marginadas, a la incidencia de VIH y otras patologías que involucran una deficiencia en la respuesta inmune, principalmente de linfocitos T CD4<sup>+</sup> (WHO, 2012, Corbett *et al.*, 2003, Iseman, 1994). Los países más afectados han sido los países en vías de desarrollo por la falta de recursos humanos y económicos para la implementación de técnicas eficientes de diagnóstico y un seguimiento adecuado en la toma de antibióticos, lo cual, a su vez ha derivado en la aparición de cepas de *M. tuberculosis* resistentes a los antibióticos convencionales como isoniazida, rifampicina, estreptomycinina y etambutol (Iseman, 1994).

## **2.2. Patogenia**

En la actualidad, la mayor parte de las infecciones de hTB inician por la vía respiratoria (Smith, 2003, Smith *et al.*, 2009). Sin embargo, en etapas avanzadas tiende a diseminarse a otros órganos (Smith, 2003). En la primera etapa, 3 a 8 semanas después de la inhalación de *M. tuberculosis* contenida en aerosoles, las bacterias se diseminan por vía linfática hasta los nodos linfáticos encontrados en los pulmones e infectan los alveolos pulmonares, formando el complejo primario o foco de Ghon (Smith, 2003, Andersen, 2002). Las micobacterias inhiben por distintos mecanismos su destrucción en los macrófagos, uno de ellos es mediado por la secreción de sustancias como la proteína quinasa G, la cual inhibe la maduración del fagosoma (Houben *et al.*, 2006). También, se ha reportado que las cepas virulentas de *M. tuberculosis* tienen la capacidad de evitar la apoptosis e inducir la necrosis de las células infectadas, mecanismo que en comparación con la apoptosis permite el

crecimiento intracelular de *M. tuberculosis* (Kaku *et al.*, 2007). Una mayor cantidad de macrófagos reclutados, células dendríticas, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, fibroblastos y componentes de la matriz extracelular pueden agregarse alrededor de los macrófagos alveolares infectados formando granulomas que encapsulan la infección en una zona con pH ácido y baja disponibilidad de oxígeno (Cosma *et al.*, 2003). Sin embargo, muchas veces no se logra erradicar al microorganismo patógeno, generando lo que se conoce como tuberculosis latente (Grosset, 2003, Cosma *et al.*, 2003). Generalmente en los granulomas de *M. tuberculosis* en humano, se observa una región central necrótica, también pueden observarse granulomas fibróticos y calcificados, los cuales ocasionalmente contienen micobacterias vivas. La infección retenida en los granulomas, puede ser reactivada en situaciones de inmunosupresión del huésped o en presencia de patologías que comprometen el sistema inmune del paciente (Grosset, 2003). En la segunda etapa, de duración aproximada de 3 meses, las bacterias circulan a través del torrente sanguíneo a regiones extrapulmonares, generando complicaciones como meningitis tuberculosa o tuberculosis miliar (Smith, 2003). Durante la tercera etapa, duración aproximada de 3 a 7 meses, aunque puede retardarse hasta por 2 años, se lleva a cabo la inflamación de la pleura causando dolor agudo en el pecho. La inflamación pleural se adjudica a la diseminación hematógena de las micobacterias o a su paso a través del espacio subpleural hacia el espacio pleural en donde liberan antígenos que interaccionan con linfocito T CD4<sup>+</sup> sensibilizados desencadenando una respuesta inflamatoria (Smith, 2003). Las consecuencias principales de la hTB pulmonar, además del riesgo de diseminación a regiones extrapulmonares, son: daño y cavitación pulmonar, necrosis y sangrado (Smith, 2003., Smith *et al.*, 2009).

La patogenia de *M. bovis* se lleva a cabo de manera muy similar a *M. tuberculosis* (Michel *et al.*, 2010). La bTB, generalmente pulmonar, también lleva a la formación de lesiones granulomatosas con grados variables de necrosis, calcificación y encapsulación (Michel *et al.*, 2010). La falta de políticas e implementación de sistemas adecuados de identificación y control de la bTB, sobre todo en países en vías de desarrollo, incrementan el riesgo de infección en humanos (Hope & Villareal-Ramos., 2008, Michel *et al.*, 2010).

### **2.3. *Mycobacterium tuberculosis***

Las bacterias pertenecientes al complejo de *M. tuberculosis* son bacilos aerobios, gram positivos, no esporulados, intracelulares y con la característica de ácido-alcohol resistencia debido a la alta proporción de ácidos micólicos presentes en la membrana celular (Ryan & Ray, 2004). Entre las micobacterias pertenecientes al complejo existe un 99.9% de similitud a nivel de nucleótido y secuencias idénticas de ARNr 16S, pero difieren en el tipo de huéspedes que infectan, fenotipos y patogenicidad (Boddinghaus *et al.*, 1990, Sreevatsan *et al.*, 1997).

En el complejo de *M. tuberculosis* se encuentran bacterias exclusivamente humanas, como *M. tuberculosis*, *M. africanum* y *M. canetti*, patógenos de roedores, como *M. microti*, y patógenos de un amplio espectro de huéspedes, como *M. bovis* (Stead *et al.*, 1995). Debido a la alta conservación genética entre las distintas especies de micobacterias, se han sugerido distintas teorías sobre la evolución que pudo haber dado lugar a su especiación (Stead *et al.*, 1995). Específicamente, se ha sugerido que *M. tuberculosis*, el principal agente causal de la hTB, evolucionó de *M. bovis* por medio de una adaptación zoonótica (Stead *et al.*, 1995). Sin embargo, la secuenciación del genoma completo de *M. tuberculosis* y *M. bovis* llevó a la identificación

de polimorfismos de nucleótido simple (sSNP) que sugieren la co-evolución de ambas especies (Boddinghaus *et al.*, 1990, Sreevatsan *et al.*, 1997).

### **2.3.1. Región RD1: ESAT-6 y CFP-10**

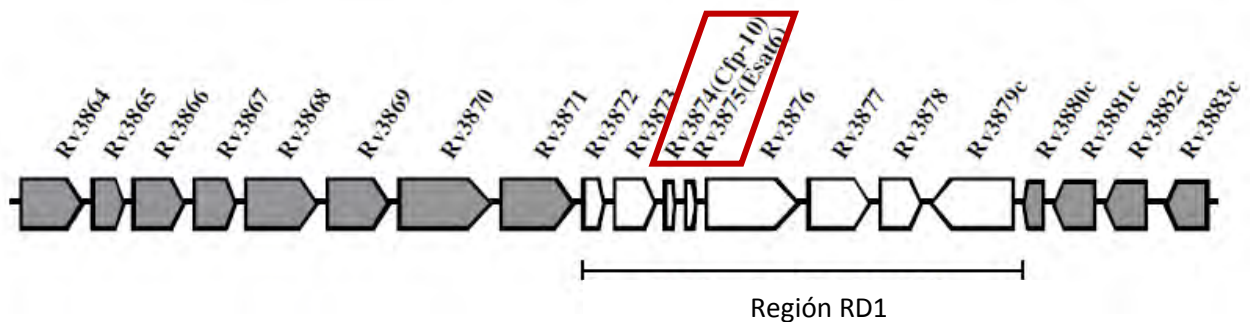
El resultado más sobresaliente de los análisis genómicos realizados entre la cepa virulenta H37R de *M. tuberculosis* (H37Rv), la cepa virulenta de *M. bovis* y las cepas BCG (Behr *et al.*, 1999, Gey Van Pittius *et al.*, 2001, Mahairas, *et al.*, 1996), fueron:

- o Identificación de 9 regiones de ADN presentes en *M. tuberculosis* H37Rv y ausentes en *M. bovis* (Mahairas, *et al.*, 1996). La colección de marcos abiertos de lectura (ORFs) ausentes en *M. bovis* abrió un amplio panorama de posibles aplicaciones, entre las cuales figuran el desarrollo de vacunas más efectivas y el mejoramiento de pruebas diagnósticas basadas en antígenos específicos derivados de genes exclusivos de *M. tuberculosis* (Aagaard *et al.*, 2010, Flores-Villalva *et al.*, 2012, Gey Van Pittius *et al.*, 2001, Kulshrestha *et al.*, 2005, Parthasarathy *et al.*, 2012, Van Pinxteren *et al.*, 2000).
- o Identificación de regiones de ADN presentes en *M. tuberculosis* y *M. bovis*, pero ausentes en BCG. La región ausente en todas las vacunas BCG analizadas y presente, tanto en *M. bovis*, como en *M. tuberculosis*, se denominó RD1 (RDs, del inglés 'region of difference') (Mahairas, *et al.*, 1996).

La región RD1 (Figura 1) tiene una longitud de 9,505 pb (Mahairas, *et al.*, 1996) y se cree que fue la primera mutación genética ocurrida durante los pases seriales que dieron origen a la cepa atenuada de la vacuna de Calmette y Guérin (Behr *et al.*, 1999, Brosch *et al.*, 2000). RD1 comprende del gen Rv3871 al gen Rv3879c, entre los cuales se

encuentran los genes codificantes de la proteína de 6 kDa ESAT-6 (gen Rv3875 o *esxA*) y la proteína homóloga L45 de 10 kDa, CFP-10 (gen Rv3874 o *esxB*) (Andersen *et al.*, 1995, Berthet *et al.*, 1998). Las proteínas para las cuales codifican los genes Rv3875, son antígenos estimulantes de células T y son expresadas de manera nativa como un heterodímero (Van Pinxteren *et al.*, 2000, Sorensen *et al.*, 1995).

En la cepa avirulenta H37R de *M. tuberculosis* (H37Ra), el locus RD1 se encuentra intacto, sin embargo la expresión de las proteínas codificadas por los genes del locus RD1 se encuentra disminuida en comparación al perfil de expresión de la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv (Mostowy *et al.*, 2004). Además, se ha observado que la generación de una cepa H37Rv knockout en RD1 (**H37Rv:ΔRD1**) atenúa su virulencia y disminuye la severidad de la necrosis en el sitio de infección (Mostowy *et al.*, 2004, Guinn *et al.*, 2004).



**Figura 1.** Genes presentes en el locus RD1 y genes adyacentes a RD1 de *M. tuberculosis*. Las flechas indican el sentido de la transcripción. Los bloques blancos representan los genes contenidos en RD1, región ausente en las cepas de BCG (Ganguly *et al.*, 2008). Los genes Rv3874 y Rv3875 codifican para las proteínas inmunogénicas CFP-10 y ESAT-6, respectivamente. El gen Rv3877 codifica para proteínas que conforman un sistema intermembranal de secreción de CFP-10 y ESAT-6 (Gey Van Pittius *et al.*, 2001). Adaptado de: Ganguly *et al.*, 2008.

En investigaciones realizadas para observar la participación de las proteínas codificadas por los genes contenidos en RD1 se observó que ESAT-6 de manera autóloga o en combinación con CFP-10 causa la desintegración de la membrana plasmática de la célula huésped. Es probable que ESAT-6 y CFP-10 sean secretados en el citoplasma y contribuyan a la inducción del daño en la membrana interna mitocondrial del hospedero, afectando el transporte de electrones y la fosforilación oxidativa, lo cual se traduce en la disminución de generación de ATP (Fine, 1995, Kaku *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2006). La reducción de ATP intracelular, en conjunto con el daño a la membrana mitocondrial podrían ser los factores inductores de la muerte celular por necrosis de las células infectadas por H37Rv (Fine, 1995, Kaku *et al.*, 2007, Chen *et al.*, 2006).

### **2.3.2. CFP-10 como proteína inmunogénica**

Con el objetivo de identificar proteínas candidatas para el mejoramiento de las herramientas de diagnóstico y generación de vacunas, se purificaron, a partir de fracciones de cultivos *M. tuberculosis* y de *M. bovis*, las proteínas antigénicas (Rv3871, Rv3872, Rv3873, CFP-10, ESAT-6 y Rv3878) pertenecientes al complejo RD-1 (Weldingh & Andersen, 1998). Estas proteínas fueron expresadas en *E. coli* para evaluar la producción de anticuerpos y generación de hipersensibilidad retardada en cobayos infectados con *M. tuberculosis* (Weldingh *et al.*, 1999). De ésta evaluación únicamente ESAT-6 y CFP-10 estimularon una respuesta cutánea importante, hecho que las posicionó como importantes candidatos para el desarrollo de nuevas herramientas de diagnóstico para tuberculosis (Weldingh & Andersen, 1999).

En el año 2010 se publicó un trabajo comparativo de diagnóstico *ex vivo* por ensayo de interferón gammas (IFN- $\gamma$ ) de bTB comparando la

eficiencia de detección de la prueba PPD en ganado contra los antígenos ESAT-6 y CFP-10 (Aagaard *et al.*, 2010). Los resultados mostraron que el 60% de los casos de diagnóstico negativo con prueba cutánea de PPD fueron falsos negativos al realizar el ensayo con los antígenos ESAT-6 y CFP-10 (Aagaard *et al.*, 2010). A su vez, en el año 2012, fueron publicados resultados de pruebas de diagnóstico cutáneas, realizadas con un coctel de ESAT-6 y CFP-10, *in vivo* en ganado infectado con *M. bovis* y con *M. avium*, causante de paratuberculosis (Flores-Villalva, 2012). Dichos experimentos mostraron la capacidad del coctel de ESAT-6 y CFP-10, para detectar bTB con mayor sensibilidad y especificidad que la prueba cutánea tradicional con PPD, al no dar resultados positivos en los bovinos paratuberculosos (Flores-Villalva, 2012). Por otro lado, diversos estudios realizados, tanto *in vitro* como *in vivo*, han demostrado que la proteína recombinante CFP-10 es un antígeno estimulador de células T que induce respuestas proliferativas en células inmunes y la producción de IFN- $\gamma$  por células mononucleares (Arlenham *et al.*, 2012, Brock *et al.*, 2001, Hemmati *et al.*, 2011, Kamath *et al.*, 2004, Marei *et al.*, 2005, Van Pinxteren *et al.*, 2000., Zhang *et al.*, 2010).

En estudios realizados para conocer la activación de células T *in vitro* por las proteínas ESAT-6, CFP-10 y el heterodímero ESAT-6/CFP-10, se se observó que el complejo ESAT-6/CFP-10 induce una menor producción de factor de necrosis tumoral (TNF) e IFN- $\gamma$  en comparación con las células T estimuladas con las proteínas CFP-10 y ESAT-6 individualmente (Marei *et al.*, 2005). La estabilidad del complejo ESAT-6/CFP-10, demostrada por la resistencia a la digestión por las catepsinas L y S, podría interferir con la presentación a las células CD4<sup>+</sup> a través de las moléculas de MHC clase II y probablemente también con la



presentación cruzada a las células CD8<sup>+</sup> a través de las moléculas de MHC clase I (Marei *et al.*, 2005).

#### **2.4. Expresión de proteínas heterólogas en *Escherichia coli***

A partir del comienzo de la biotecnología moderna en los años 70, se desarrollaron diversas técnicas para optimizar la producción de proteínas a nivel industrial, hecho que fue posible principalmente al descubrimiento del ADN recombinante por Berg, Cohen y Boyer (Demain & Vaishnav, 2009). De manera general, estas optimizaciones buscaron maximizar la producción de la proteína o del compuesto de interés mediante la manipulación de las condiciones de cultivo, la obtención de cepas sobreproductoras y la disminución de producción de compuestos proteolíticos y subproductos citotóxicos (Schmidt, 2004, Weldingh *et al.*, 1998). Muchas de las mejoras se lograron gracias a la producción de proteínas recombinantes en hospederos que cumplieran con las características deseadas para su cultivo (Demain & Vaishnav, 2009).

A pesar de la presencia de múltiples sistemas de expresión, la bacteria gram-negativa *E. coli* sigue siendo el hospedero procarionte preferido para la producción de proteínas recombinantes debido a que se encuentra muy bien caracterizada genética y fisiológicamente, tiene un bajo costo de cultivo, rápido y abundante crecimiento, capacidad de acumulación intracelular de proteínas heterólogas mayor al 20% de la proteína total y disponibilidad de una amplia gama de mutantes, vectores y promotores inducibles fuertes (Schmidt, 2004, Swartz, 1996). Sin embargo, la expresión en *E. coli* se ha enfrentado con diversas limitaciones como la citotoxicidad por producción de acetato, no realiza modificaciones post-traduccionales, producción de endotoxinas pirogénicas difíciles de eliminar y acumulación citosólica de proteína recombinante inactiva en agregados densos e insolubles, denominados

cuerpos de inclusión, como consecuencia de la falta de sistemas eficientes de secreción (Demain & Vaishnav, 2009). *E. coli* fue el sistema celular pionero de la expresión de proteínas terapéuticas al expresar exitosamente la somatostatina (Swartz, 1996). La insulina fue la primera proteína terapéutica aprobada por la FDA producida en *E. coli* (Swartz, 1996). Además, algunas cepas de laboratorio de *E. coli* son consideradas como organismos GRAS: por sus siglas en inglés Generally Recognized As Safe (Swartz, 1996).

Para producir una proteína recombinante se requiere clonar la secuencia de ADN codificante para el producto deseado en un plásmido que contenga como elementos esenciales: origen de replicación, promotor, región de clonación múltiple, gen reportero y/o gen de resistencia a antibiótico (Shi *et al.*, 2001). La presencia del gen reportero y de los genes de resistencia a antibióticos permite la selección de las clonas recombinantes. El promotor cumple la función de controlar el momento en que los microorganismos comienzan a expresar el gen codificante para el producto deseado, por lo cual en producción de proteínas recombinantes se busca emplear promotores fuertes y regulables (Shi *et al.*, 2001).

La sobreproducción de proteínas heterólogas, principalmente en microorganismos no secretores como *E. coli*, puede desencadenar diferentes tipos de respuesta, tales como la respuesta de choque térmico, la respuesta restrictiva y la respuesta SOS, que derivan en la disminución de la actividad metabólica de las células (Gill *et al.*, 2000, Hoffman & Rinas, 2004), disminución de la velocidad específica de crecimiento, la degradación ribosomal y alteraciones en el metabolismo central de carbono (Dong *et al.*, 1995). Por otra parte, diversos factores influyen significativamente en la expresión del gen deseado, uno de los

factores más importantes que se ha identificado es la diferencia en los patrones de codones entre especies, lo cual se refleja en el nivel intracelular de los ARN de transferencia (ARNt) requeridos para expresar la proteína recombinante y por lo tanto en el nivel de eficiencia de traducción (Figura 2) (Hannig & Makrides, 1998, Kane, 1995, Kurland & Gallant, 1996, Sorensen *et al.*, 1989, Terpe, 2006, Zahn, 1996). La baja expresión de una proteína heteróloga, debida a éste factor, se puede evitar mediante la modificación del codón, o codones, de uso poco frecuente con mutaciones silenciosas o la introducción de los genes codificantes para los ARNt requeridos en el plásmido (Hannig & Makrides, 1998, Kane, 1995, Zahn, 1996). El alto contenido de G/C es una causa importante de baja eficiencia de expresión de proteínas de *M. tuberculosis* en *E. coli* debida a la variación en el uso de patrones de codones entre ambas especies. En respuesta a ésta limitante, se han empleado exitosamente sistemas de vectores bicistrónicos, en los cuales, un cistrón es generalmente una secuencia rica en A/T mientras que el segundo cistrón contiene el gen para la expresión del producto deseado (Schoner *et al.*, 1990, Guo *et al.*, 2009).

UUU F 0.57	UCU S 0.11	UAU Y 0.53	UGU C 0.42
UUC F 0.43	UCC S 0.11	UAC Y 0.47	UGC C 0.58
UUA L 0.15	UCA S 0.15	UAA * 0.64	UGA * 0.36
UUG L 0.12	UCG S 0.16	UAG * 0.00	UGG W 1.00
CUU L 0.12	CCU P 0.17	CAU H 0.55	CGU R 0.36
CUC L 0.10	CCC P 0.13	CAC H 0.45	CGC R 0.44
CUA L 0.05	CCA P 0.14	CAA Q 0.30	CGA R 0.07
CUG L 0.46	CCG P 0.55	CAG Q 0.70	CGG R 0.07
AUU I 0.58	ACU T 0.16	AAU N 0.47	AGU S 0.14
AUC I 0.35	ACC T 0.47	AAC N 0.53	AGC S 0.33
AUA I 0.07	ACA T 0.13	AAA K 0.73	AGA R 0.02
AUG M 1.00	ACG T 0.24	AAG K 0.27	AGG R 0.03
GUU V 0.25	GCU A 0.11	GAU D 0.65	GGU G 0.29
GUC V 0.18	GCC A 0.31	GAC D 0.35	GGC G 0.46
GUA V 0.17	GCA A 0.21	GAA E 0.70	GGA G 0.13
GUG V 0.40	GCG A 0.38	GAG E 0.30	GGG G 0.12

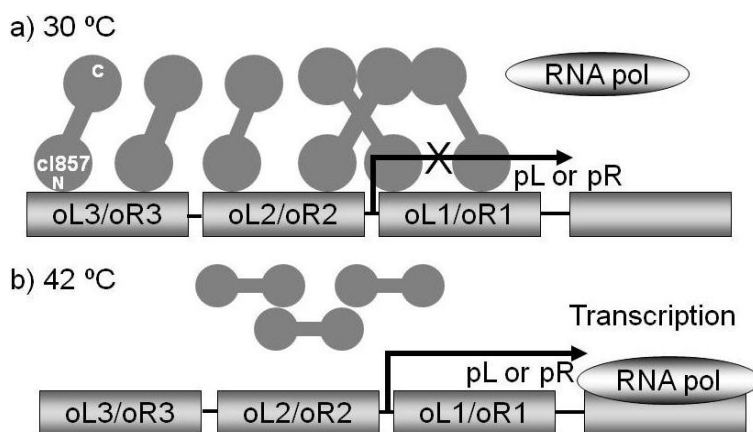
**Figura 2.** Frecuencia del uso de codones en *Escherichia coli*. Tomado de: Gene Infinity LLC, 2013.

### **2.4.1. Sistemas termoinducibles en *E. coli*: represor termolábil cI857**

Entre las numerosas ventajas de la expresión de proteínas recombinantes en *E. coli* se encuentra la disponibilidad de un amplio número de promotores fuertes de inducción, entre los más empleados se encuentra la inducción por adición de isopropil- $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosido (IPTG) o antibióticos como ampicilina o kanamicina (Aucoin *et al.*, 2006, Terpe, 2006). En el caso de estos dos sistemas de inducción la principal desventaja se encuentra en el costo de las sustancias inductoras, el costo de pasos adicionales en la purificación del producto y una mayor contaminación de los efluentes derivados de la producción (Aucoin *et al.*, 2006). Otros sistemas de inducción se basan en la reducción en la administración de algún nutriente o la modificación de factores fisicoquímicos como el pH, los cuales, pueden afectar el metabolismo del microorganismo productor y la biosíntesis de la proteína recombinante (Palomares *et al.*, 2004). Por su parte, los sistemas termoinducibles requieren de una sencilla manipulación, consistente en el incremento o disminución de temperatura de cultivo, modificación que no compromete la esterilidad, además de ser un sistema fácilmente escalable (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).

Los promotores termoinducibles más empleados son los promotores pL y pR derivados del fago lambda (Aucoin *et al.*, 2006). El fago lambda es un virus dcADN que infecta a *E. coli* por la vía lítica o por la vía lisogénica, su cromosoma circular está constituido por 48,502 pares de bases que codifican para los genes líticos tempranos, los genes líticos tardíos y los genes lisogénicos expresados por los promotores pL y pR para los genes líticos tardíos y, pR' y pRM para los genes lisogénicos (Ptashne *et al.*, 1980, Dodd *et al.*, 2005). La proteína que regula el cambio entre el ciclo lítico y el ciclo lisogénico en el fago lambda, es la proteína represora cI,

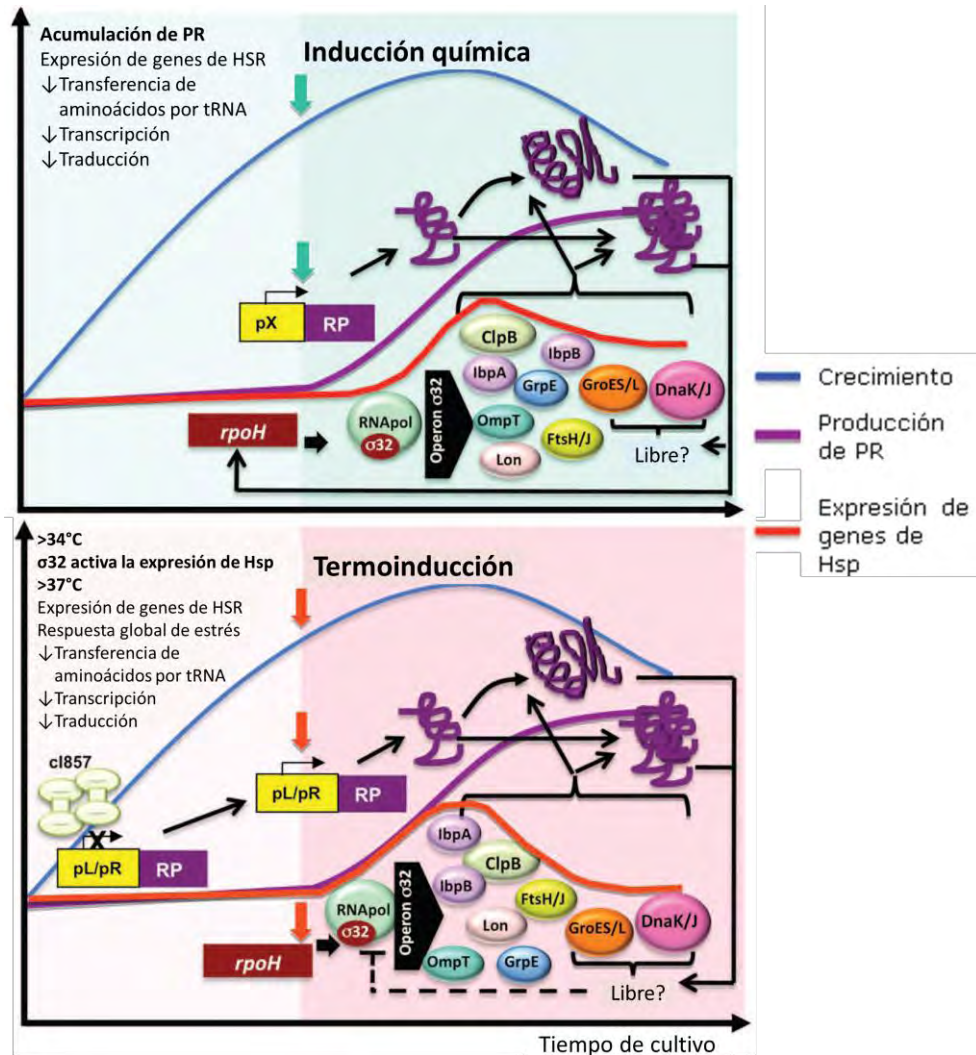
la cual está conformada por 236 aminoácidos distribuidos en dos dominios (Dodd *et al.*, 2005). Cuando se lleva a cabo el ciclo lisogénico, el represor *ci* inhibe la transcripción de los genes líticos impidiendo que la célula huésped sea lisada (Johnson *et al.*, 1979). La proteína *ci* tiene una interacción proteína-proteína a través de sus dominios C-terminales con las regiones *oR1*, *oR2*, *oL1* y *oL2* del operador, bloqueando los promotores *pR* y *pL*, respectivamente (Figura 3) (Dodd *et al.*, 2005, Johnson *et al.*, 1979, Meyer *et al.*, 1980, Valdez-Cruz *et al.*, 2010). El bloqueo de *pR* y *pL* permite la transcripción del gen *ci* al activarse su promotor *pRM* a través de un mecanismo dependiente de concentración, lo cual genera una auto-regulación positiva para el mantenimiento del estado lisogénico (Dodd *et al.*, 2001). Cuando la célula huésped activa la respuesta SOS, como consecuencia de daño al ADN, se induce la expresión de la proteína Rec-A que activa la autoescisión de *ci*, activando la vía lítica del fago lambda (Valdez-Cruz *et al.*, 2010, Shearwin *et al.*, 1998).



**Figura 3.** Representación de los promotores *pL* o *pR* bajo el control del represor termolábil *ci857*. a) El regulador *ci857* forma dímeros que interactúan con tres dominios del operador (*oL3/oR3*, *oL2/oR2* y *oL1/oR1*) reprimiendo la transcripción del gen localizado río abajo del promotor. b) La interacción de *ci857* es liberada al incrementar la temperatura por encima de 37°C, alcanzando la máxima cantidad de proteína represora a 42°C, permitiendo la transcripción del gen por la ARN polimerasa. Tomado de: Valdez-Cruz *et al.*, 2010.

En 1966, fueron identificadas mutantes termosensibles del fago lambda, las cuales podían ser inducidas al estado lítico mediante el incremento de temperatura (Lieb, 1996). A partir de una de esas mutantes, se identificó el represor termolábil cI857 (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). La diferencia del cI857 con el represor nativo cI es una mutación en el aminoácido 66, de alanina por treonina (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). El represor cI857 es inactivado a una temperatura mayor a 37°C, temperatura a la cual sufre cambios conformacionales que promueven su separación gradual de las regiones operadoras permitiendo la transcripción de los genes adyacentes al promotor (Valdez-Cruz *et al.*, 2010, Villalverde *et al.*, 1993). En particular la combinación cI857 y pL, o pR, tiene la ventaja de que una sola copia del gen cI857 en el cromosoma puede generar una cantidad suficiente de represor como para impedir completamente el reconocimiento de pL o pR incluso en casos donde el promotor se encuentra en plásmidos de alto número de copias (Remaut *et al.*, 1981). Además este sistema puede ser utilizado en otras bacterias gram negativas y dependiendo de la proteína recombinante, condiciones de cultivo y cepa productora se pueden llegar a obtener rendimientos mayores al 30% respecto a la cantidad proteína total celular (Villalverde *et al.*, 1993, Remaut *et al.*, 1981).

En los sistemas termoinducibles la inducción de respuestas celulares a estrés y desbalances metabólicos se ven incrementados de manera importante como consecuencia al incremento de temperatura, generalmente súbito, hasta alcanzar 37°C-42°C con la finalidad de asegurar una separación total del represor cI857 (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Una de las respuestas celulares más importantes, debidas a la termoinducción, es la respuesta de choque térmico (HSR), la cual ocurre tanto en inducción térmica como en sistemas de inducción química (Figura 4) (Valdez-Cruz *et al.*, 2010).



**Figura 4.** Comparación esquematizada de la respuesta molecular durante la inducción química y la inducción térmica con sobreexpresión de proteína recombinante (PR). El gen codificante para la PR se localiza río abajo del promotor pL, pR o algún promotor químicamente inducible. a) La acumulación de PR en un sistema inducido químicamente, genera sobreexpresión de proteínas de choque térmico (Hsp) mediada por la **molécula  $\sigma_{32}$** . b) En un cultivo termoinducido, inicialmente con un incremento de 30°C a 34°C, se induce la síntesis de Hsp **por la molécula  $\sigma_{32}$** , la cual es regulada por retroalimentación negativa por la sobreexpresión de DnaK/J y GroES/L (Hsp). Al alcanzar una temperatura de 37°C, el represor cI857 se desprende del promotor pL/pR y comienza la transcripción de la PR. Una fracción de la PR es plegada correctamente. Sin embargo, otra fracción no alcanza el plegamiento adecuado agregándose en cuerpos de inclusión. Los niveles de ARNm de Hsp aumenta después de la termoinducción, pero la mayoría de las Hsp disminuyen nuevamente su expresión después de un corto periodo de tiempo. Tomado de: Valdéz-Cruz *et al.*, 2011.

### **3. Justificación**

La falta de sensibilidad e inespecificidad de las pruebas de detección, el tiempo requerido para la confirmación de un diagnóstico de tuberculosis por cultivo de muestras y la alta variabilidad en la eficacia protectora de la vacuna BCG han impulsado la investigación para el desarrollo de métodos de diagnóstico y prevención para la hTB y la bTB. Al ser la tuberculosis, un problema de salud mundial, no sólo es necesario desarrollar nuevas herramientas, sino emplear sistemas de producción eficaces y económicamente viables, como la expresión en *E. coli* empleando un sistema de termoinducción que disminuye los costos, principalmente en el proceso de purificación de la proteína recombinante deseada.

### **4. Objetivos**

#### **4.1. Objetivo general**

- Caracterizar cinéticamente una cepa termoinducible recombinante de *E. coli* productora de la proteína inmunogénica CFP-10 de *M. tuberculosis* en cultivo sumergido en matraces agitados.

#### **4.2. Objetivos particulares**

- Seleccionar el medio de cultivo óptimo para el crecimiento de la cepa recombinante de *E. coli* productora de CFP-10 mediante la realización de cinéticas de crecimiento en medio Luria-Bertani y medio Terrific-Broth.
- Realizar cinéticas en el medio de crecimiento óptimo variando la temperatura de inducción (37, 40 y 42°C) y el tiempo de inducción (3 horas y 5 horas a partir del inicio del cultivo).

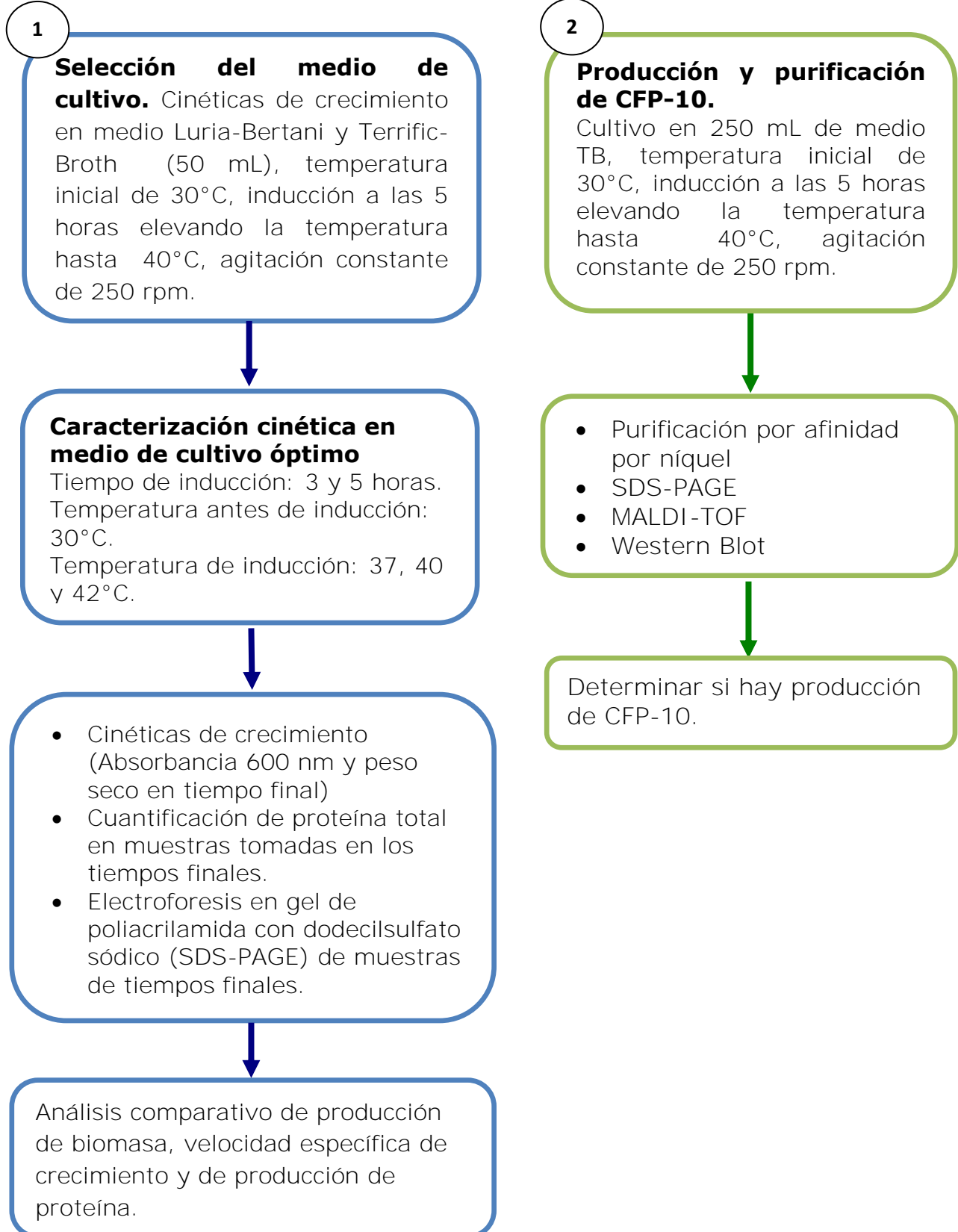


- Purificar por cromatografía de afinidad a la proteína CFP-10 clonada y expresada en la cepa recombinante de *E. coli* con marca de histidinas.
- Determinar las condiciones de cultivo e inducción bajo las cuales se obtiene una mayor producción de proteína recombinante CFP-10 en matraces agitados.

## **5. Hipótesis**

La evaluación de diferentes condiciones de cultivo y de inducción para la producción de CFP-10 en *Escherichia coli* recombinante nos permitirá encontrar las condiciones óptimas para alcanzar una productividad que justifique el escalamiento de la producción de CFP-10 empleando un promotor termoinducible con la finalidad de emplear la proteína en vacunas y/o sistemas de diagnóstico para humanos y ganado.

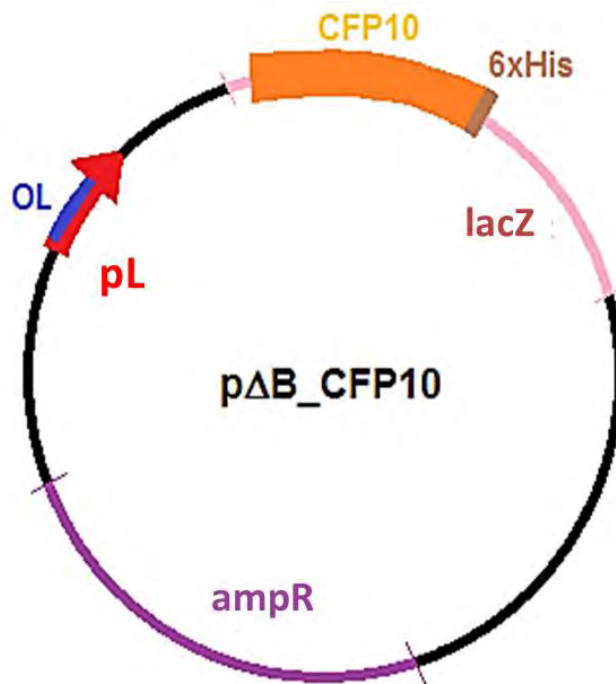
## 6. Estrategia experimental



## 7. Materiales y métodos

### 7.1. Cepa de *E. coli* recombinante pΔBlue\_CFP-10

La cepa pΔBlue\_CFP-10 (Figura 5) fue transformada por un estudiante de Maestría en Ciencias Bioquímicas en el Departamento de Biología Molecular y Biotecnología, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. La construcción se realizó insertando el gen codificante para CFP-10 en el plásmido termoinducible pΔBlue a partir del plásmido pANY propiedad de Mr. Gene (<http://www.mrgene.com>). La secuencia codificante para la proteína CFP-10 proveniente del plásmido pANY fue optimizada para poder ser traducida correctamente considerando codones de uso frecuente en el sistema de *E. coli*, además contiene una secuencia adicional de poli histidina en el extremo carbonilo terminal.



**Figura 5.** Representación de la construcción pΔBlue\_CFP-10. La flecha roja y barra azul indican la región operadora y promotora, respectivamente. El gen codificante para la proteína CFP-10 (naranja) seguido del tallo de 6 histidinas (café) interrumpe al gen reportero *lacZ* (rosa). En morado se marca el gen de resistencia a ampicilina, *ampR*.

## **7.2. Determinación de peso seco y elaboración de una curva estándar de Peso seco vs. Densidad óptica.**

A partir de un pre-cultivo de 14 horas de *E. coli* productora de CFP-10 en medio TB, se inocularon 5 matraces de 250 mL con 45 mL de medio TB y se crecieron a 30°C. Se tomaron los matraces a distintos tiempos y se determinó la absorbancia a 600 nm. Posteriormente, el cultivo se filtró al vacío a través de membranas de 0.42 µm de diámetro de poro previamente secadas por 24 horas en estufa a 65°C y pesadas. Se dejaron secar durante 24 horas a 65°C. Se graficó Peso seco (g/mL) vs. Absorbancia (600 nm) para obtener la curva estándar.

## **7.3. Cultivos en matraces agitados. Cinéticas de crecimiento**

Se creció la cepa *E. coli pΔBlue\_CFP-10* en 5 mL de medio TB y medio LB, a pH de 7.5 con ampicilina (50 µg/mL) durante 14 horas a 30°C y agitación de 200 rpm, hasta alcanzar una densidad óptica (DO) entre 1.5 y 2.0 a 600 nm.

A partir del inóculo de 14 horas se inocularon matraces Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 45 mL de medio TB y LB con ampicilina (50 µg/mL), ajustando el volumen de inóculo para obtener una DO inicial de 0.2 a 600 nm aproximadamente. Se incubaron a temperatura constante de 30°C y velocidad de agitación de 250 rpm. Se realizaron cinéticas de crecimiento por triplicado variando la temperatura de inducción a 37, 40 y 42°C y variando el tiempo de inducción a las 3 y 5 horas de crecimiento, dejando el cultivo a la temperatura de inducción hasta el final de la cinética. Se siguió la cinética de crecimiento, midiendo DO a 600nm cada hora durante 8 horas de cultivo y en el tiempo final (25 horas). La determinación de absorbancia, a partir de las dos horas de cultivo se realizó con diluciones 1:2, 1:4, 1:5 y un 1:10, con el fin de tener una lectura por debajo de 1.0 unidad de DO.

En la primera cinética realizada para comparar el crecimiento en medio TB y medio LB se indujo a una temperatura de 40°C a las 5 horas de crecimiento. Se tomaron 0.5 mL de muestra para análisis de proteína en el tiempo de inducción, una hora después del tiempo de inducción, tres horas después del tiempo de inducción y en el tiempo final del cultivo, a las 25 horas de haber inoculado. En el resto de las cinéticas se empleó el medio de cultivo que mostró mayor crecimiento y se tomaron 0.5 mL de muestra en el tiempo final para análisis de proteína.

#### **7.4. Cálculo de las velocidades específicas de crecimiento**

La velocidad específica de crecimiento ( $\mu$ ), fue calculada a partir de los datos de biomasa obtenidos en los cultivos de 50 mL de medio TB en matraces agitados de 250 mL por 25 horas, graficando el logaritmo natural de la biomasa (DO 600 nm) vs el tiempo (h), tomando como fase exponencial los datos entre el tiempo 1 y el tiempo 5 de cultivo. El valor de la  $\mu$  corresponde al valor de la pendiente de los datos graficados.

#### **7.5. Cuantificación de proteína total por método de Bradford**

A partir de las muestras de los tiempos finales de las cinéticas de crecimiento, se cuantificó la cantidad de proteína total empleando el reactivo “Protein Assay Dye Reagent Concentrates” (Bio-Rad®) siguiendo el protocolo estándar descrito por Bradford, basado en la afinidad de las proteínas por el azul de Coomassie (Bradford, 1976). Se realizó una curva estándar con disoluciones de albúmina sérica bovina (BSA) de 0.22, 0.45 y 0.9 mg/mL. A 20  $\mu$ L de cada disolución se añadió 1 mL de reactivo de Bradford previamente diluido con agua destilada (1:5). Después de 5 minutos, se leyó la absorbancia a 595 nm.

Las muestras obtenidas a partir de los cultivos se lisaron en el sonicador Soniprep150 (MSE®) empleando una amplitud de 10 micrones durante 1 minuto en baño de hielo. A 20 µL de muestra se añadió 1 mL de reactivo de Bradford (1:5). Después de 5 minutos, se leyó la absorbancia a 595 nm. Los valores de absorbancia obtenidos se extrapolaron en la curva estándar.

### **7.6. Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE)**

Los geles de SDS-PAGE se prepararon al 18% de poliacrilamida (Towbin *et al.*, 1979). Se colocaron los geles en la cámara de electroforesis sumergidos en buffer de corrida. Las muestras de 0.5 mL tomadas de los cultivos en matraces agitados al tiempo final (25 horas), fueron centrifugadas en el equipo Centrifuge 5804 R (Eppendorf®) a 10,000 rpm, 5 minutos y resuspendidas en 0.5 mL de agua destilada. Se tomó el volumen equivalente a 20 µg de proteína total de cada muestra, cuantificada por método de Bradford, y se mezcló con buffer de muestra 2x. Se colocó una muestra por carril y en un carril se colocaron 4 µL de marcador de peso molecular.

Se corrió la electroforesis a 100 mA empleando el equipo PowerPac 200 (Bio-Rad®). Al finalizar, los geles fueron teñidos con Coomassie coloidal (Coomassie blue R-250, Bio-Rad®).

### **7.7. Western Blot**

Después de realizar electroforesis SDS-PAGE, las proteínas se transfirieron a una membrana de PVDF Immobilon™ (Millipore®), previamente activada con metanol por 30 segundos. La transferencia se realizó a 110V por 60 minutos, empleando el equipo Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell (Bio-Rad®), en donde se colocó un filtro mojado

en buffer de transferencia, el gel, la membrana activada y un segundo filtro mojado en buffer de transferencia.

Una vez transferidas las proteínas en la membrana, se realizó un bloqueo de 1 hora a temperatura ambiente con BSA al 3% (m/v) en buffer Tris pH=7.6. Se añadió la solución con el anticuerpo primario anti-histidinas (dilución 1:1000) en buffer Tris-BSA 3% y se dejó incubar por 1 hora. Posteriormente se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con buffer Tris-Tween 0.1%. Se aplicó el anticuerpo secundario (anti-mouseIgG, dilución 1:5000) acoplado a peroxidasa, en una solución de buffer Tris-BSA 3% y se incubó por 1 hora. Al término de la incubación se realizaron tres lavados sucesivos de 5 minutos cada uno con buffer Tris-Tween 0.1%. Se realizó un último lavado con buffer Tris, se dejó secar la membrana y se procedió a revelar con **3,3'**-diaminobencidina (Sigma-Aldrich®) permitiendo la reacción por 10 minutos.

### **7.8. Purificación de proteína por afinidad con níquel**

Con el objetivo de obtener suficiente cantidad de proteína para purificar e identificarla, se realizó un cultivo en un matraz de 2 L con 250 mL de medio TB a 30°C hasta el momento de inducción, realizado a las 5 horas a 40°C. A las 25 horas de cultivo se llevó a cabo una purificación en cromatografía de afinidad a níquel bajo condiciones desnaturizantes, empleando el kit de "Ni-NTA Superflow" (QIAGEN®) de purificación de proteínas marcadas con tallo de histidinas. Se centrifugaron los 250 mL de cultivo, el sobrenadante fue desechado y el pellet se resuspendió en 10 mL de buffer de lisis. Se incubó en baño de hielo por 30 min. Posteriormente, se centrifugó a 10,000 x g por 30 min. a 4 °C. El sobrenadante se colocó en la columna de cromatografía. Se colocaron 2

volúmenes de 5 mL de buffer de lavado y 4 volúmenes de 0.5 mL de buffer de elución para eluir la proteína. Se recolectaron fracciones de los lavados y de la elución.

### **7.9. Espectrometría de masas con analizador de tiempo de vuelo y desorción mediante láser asistida por matriz (MALDI-TOF).**

Las fracciones recolectadas en la purificación de la proteína marcada con tallo de histidinas se corrieron en SDS-PAGE y se cortó el fragmento de gel en el cual probablemente se encontraba la proteína inmunogénica a CFP-10. El fragmento de gel fue desteñado con una solución de buffer de carbonatos (100 mM) y metanol al 50%, deshidratado con acetonitrilo y rehidratado con buffer de carbonatos (50 mM). La muestra se digirió con LysC 1:1000 (Roche, No. Cat. 11047825001), permitiendo la digestión durante 12 horas.

La muestra digerida se analizó por MALDI-TOF (Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight) en un equipo Bruker del Instituto de Química de la UNAM por la Química Eréndira García Ríos.

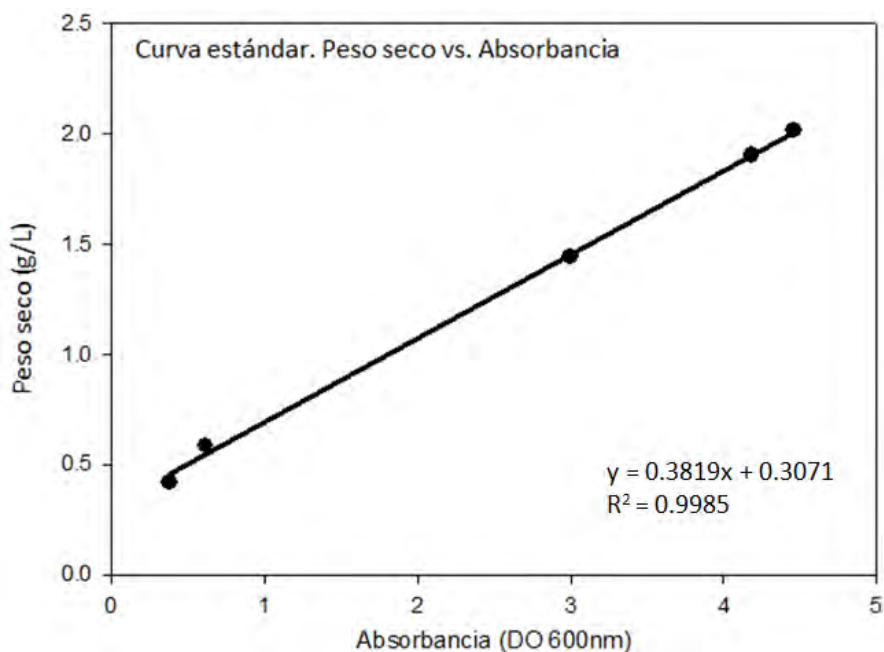


## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Curva estándar y selección del medio de cultivo

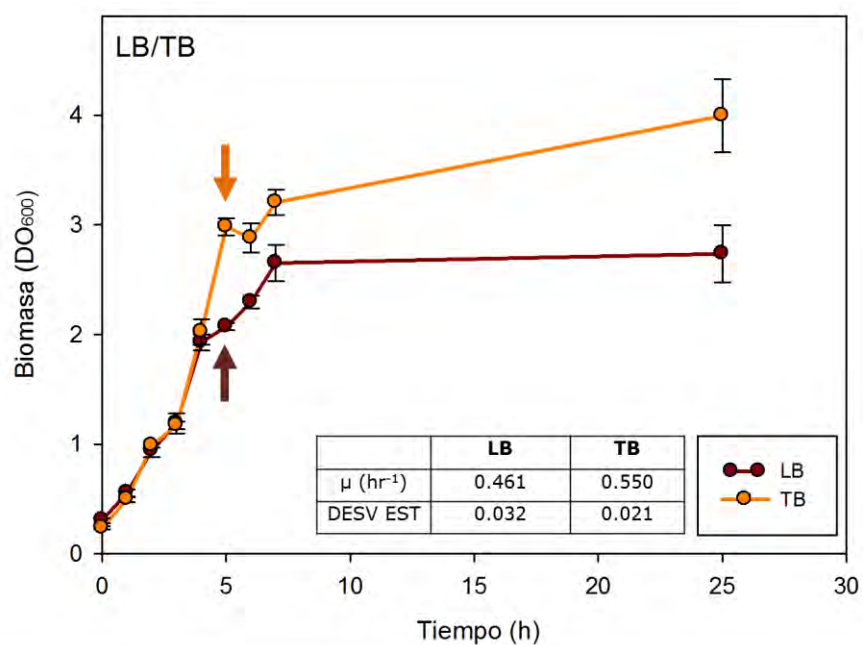
Para determinar el efecto de la termoinducción en el crecimiento y productividad de la cepa recombinante de *E. coli* p $\Delta$ Blue\_CFP-10 primero fue necesario comparar dos medios de cultivos empleados para el crecimiento de *E. coli* recombinante para encontrar el medio óptimo de producción de biomasa, con la finalidad de incrementar la posibilidad de obtener, en experimentos posteriores, una cantidad de proteína suficiente para los análisis requeridos.

La comparación de absorbancia-peso seco de todas las cinéticas de crecimiento realizadas en el trabajo experimental se compararon con los datos obtenidos en la curva estándar de Peso seco vs. Absorbancia (Figura 6).



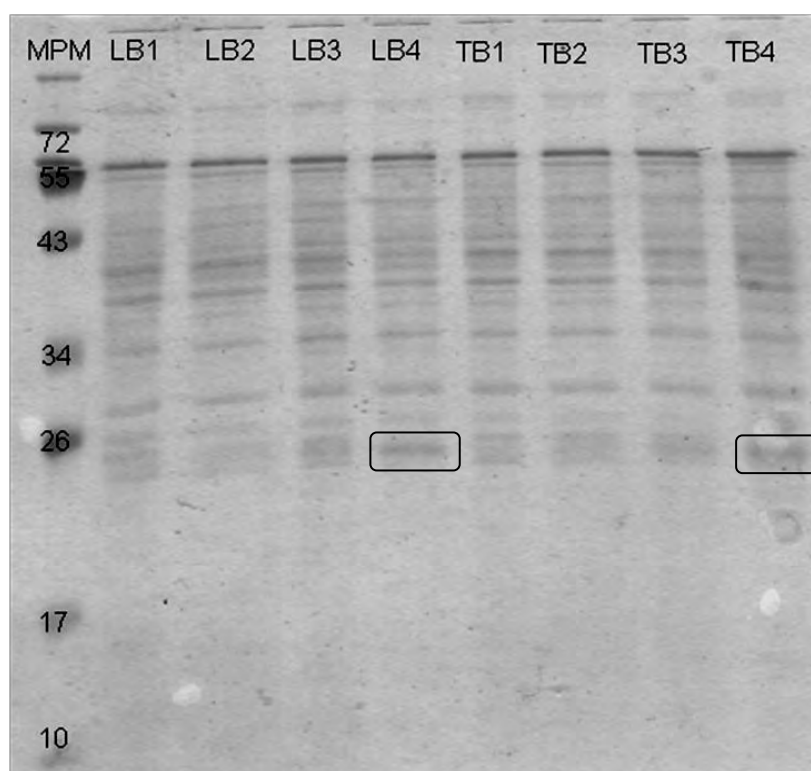
**Figura 6.** Curva estándar de peso seco (g/L) vs. Absorbancia (DO 600 nm) de la cepa de *E. coli* p $\Delta$ Blue\_CFP-10. Se sacrificaron uno a uno, a distintos tiempos de cultivo, 5 matraces con 50 mL de medio TB inoculados con *E. coli* p $\Delta$ Blue\_CFP-10, se cuantificó la absorbancia a 600 nm y se cuantificó el peso seco de los 50 mL de cultivo.

La comparación realizada entre el crecimiento de la cepa en los medios complejos LB y TB se muestra en la figura 7, en la cual se observa que el crecimiento en medio TB es mayor al crecimiento en medio LB. Se alcanza una mayor cantidad de biomasa desde la fase exponencial de la cinética, traduciéndose en un mayor valor de  $\mu$ . Éste resultado concuerda con lo reportado en otros estudios de caracterización y optimización en la producción de proteínas recombinantes en *E. coli* (Madurawe *et al.*, 2000, Tripathi *et al.*, 2008). La optimización del crecimiento en medio TB se debe principalmente a que hay una mayor disponibilidad de carbono y nitrógeno proporcionado por una mayor cantidad de extracto de levadura y triptona que las que componen al medio LB (Sezonov *et al.*, 2007). A su vez, la adición de sales de fosfato en el medio TB, amortigua el cambio de pH en el medio de cultivo (Madurawe *et al.*, 2000, Tripathi *et al.*, 2008).



**Figura 7.** Comparación de cinéticas de crecimiento en medio LB y en medio TB para elección del medio de cultivo óptimo para la cepa de *E. coli* p $\Delta$ Blue\_CFP-10. Cinéticas realizadas a temperatura constante de 30°C, hasta el momento de inducción (5 horas) en el que se incrementó la temperatura a 40°C. Tanto el crecimiento como la  $\mu$  son mayores en el cultivo realizado en medio TB.

Las muestras tomadas antes y después de la inducción térmica se corrieron en SDS-PAGE (Figura 8) para observar si alguna proteína incrementaba su concentración después del incremento de temperatura. La imagen muestra una banda que aumentó su intensidad a las 25 horas de cultivo a un peso aproximado de 26 kDa, tanto en las cinéticas en medio LB, como en medio TB. La banda observada a la altura de 26 kDa sugirió la producción de la proteína inmunogénica CFP-10, la cual a pesar de tener un peso teórico de 10 kDa se ha reportado que, después de purificar, corre a la altura de las proteínas de 26 kDa (Hemmati *et al.*, 2011).



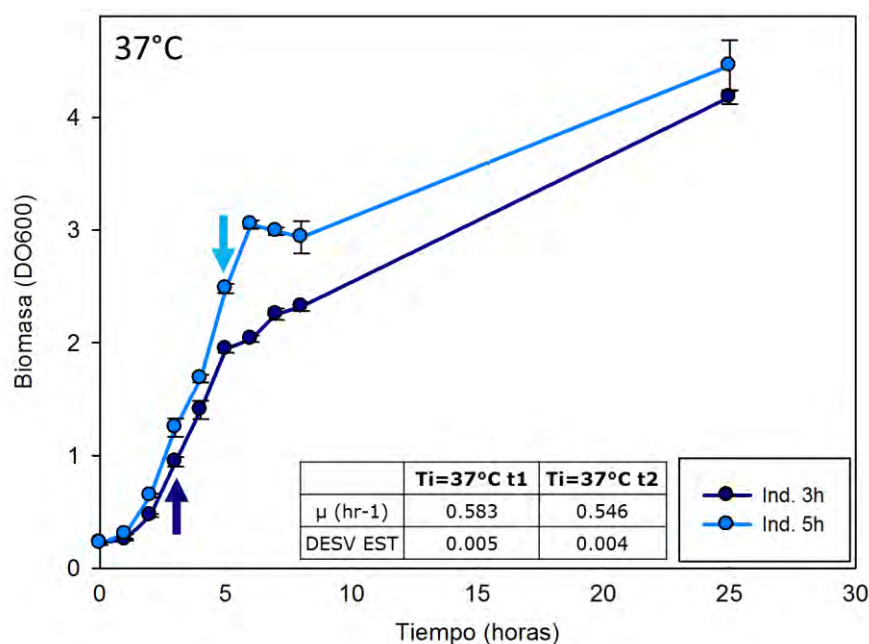
**Figura 8.** SDS-PAGE de muestras de las cinéticas de crecimiento en medio LB y medio TB. Muestras obtenidas antes del tiempo de inducción (LB1, TB1), en el tiempo de inducción (LB2, TB2), 3 horas después del tiempo de inducción (LB3, TB3) y en el tiempo final (LB4, TB4) de las cinéticas de crecimiento reportadas en la Figura 7. El primer carril corresponde al marcador de peso molecular (MPM). Se observa una banda de sobreexpresión a la altura aproximada de 26 kDa.

## 8.2. Cinéticas de crecimiento con tres temperaturas de inducción y dos diferentes tiempos de inducción

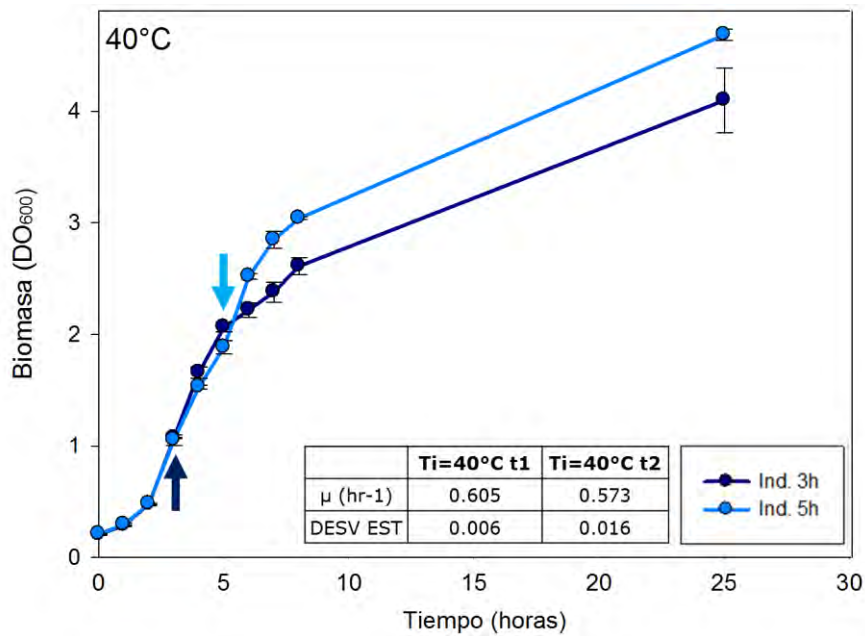
Con el objetivo de determinar la influencia de la temperatura de inducción y del tiempo de inducción de los cultivos de la cepa *E. coli* p $\Delta$ Blue\_CFP-10, se realizaron cinéticas de crecimiento de biomasa en matraces agitados de 50 mL, con medio TB, inducidos a diferentes temperaturas (37, 40 y 42°C; Figuras 9, 10 y 11) y a diferentes tiempos (3 y 5 horas). En la cinética de crecimiento de los cultivos inducidos a 37 y 40°C se observa que en la inducción a las 5 horas del cultivo, se alcanza una mayor producción de biomasa final en comparación con los cultivos inducidos a la misma temperatura pero a las 3 horas de cultivo. Al incrementar la temperatura de 30°C a 37°C, o 40°C se da lugar a la fase estacionaria a una densidad celular menor que si el cultivo se continúa a 30°C (Aucoin *et al.*, 2006). En la cinética de crecimiento correspondiente a la inducción a 42°C (Figura 11) no se observa una diferencia entre los cultivos inducidos a las 3 horas y los inducidos a las 5 horas.

Se ha reportado que el sistema de HSR permanece inactivo a una temperatura de 30°C, pero al elevar de 30 a 34°C comienza la inducción de la síntesis de las proteínas de Hsp (Caspeta *et al.*, 2009, Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Al alcanzar los 37°C se libera el represor cI857 y comienza a sintetizarse la proteína recombinante, lo cual se traduce en el comienzo de acumulación de proteína recombinante (Valdez-Cruz *et al.*, 2010., Valdez-Cruz *et al.*, 2011). Al alcanzar una temperatura de 42°C la sobreproducción de proteína recombinante causa importantes desbalances metabólicos generando una respuesta global a estrés, lo cual se traduce en la disminución de  $\mu$ , activación de la respuesta SOS y disminución de la viabilidad celular (Valdez-Cruz *et al.*, 2010). Al incrementar la temperatura a las 3 horas de cultivo, inducimos la

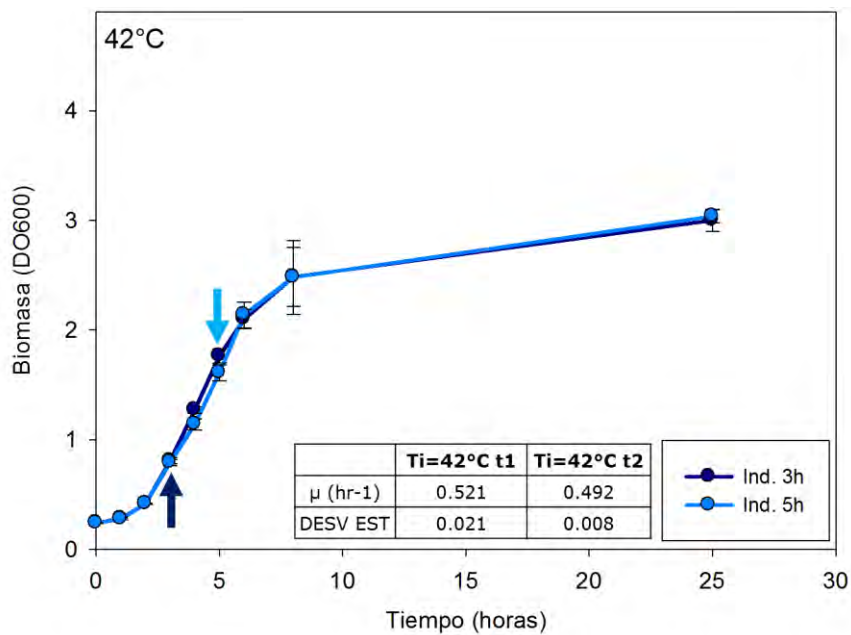
respuesta HSR antes de que el cultivo alcance su máximo crecimiento en la fase exponencial. Sin embargo, la velocidad específica de crecimiento, calculada a partir de las absorbancias entre el tiempo 1 y el tiempo 4, es mayor en los cultivos inducidos a las 3 horas. Esto puede deberse al incremento paulatino de la temperatura, lo cual, inicialmente genera un incremento en el metabolismo celular, para después dar lugar a la activación de la HSR anteriormente mencionadas. Si el cambio de temperatura fuera más abrupto y homogéneo en el medio esperaríamos que la velocidad específica de crecimiento fuera menor en la termoinducción a las 3 horas, ya que se ha demostrado que la activación de la HSR es dependiente tanto de la temperatura, como de la tasa de calentamiento (Caspeta *et al.*, 2009).



**Figura 9.** Cinéticas de crecimiento de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 37°C. Cinéticas realizadas en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial de 30°C, con inducción térmica (→) a las 3 y 5 horas de cultivo. El valor de  $\mu$  es mayor en el cultivo inducido a las 3 horas.

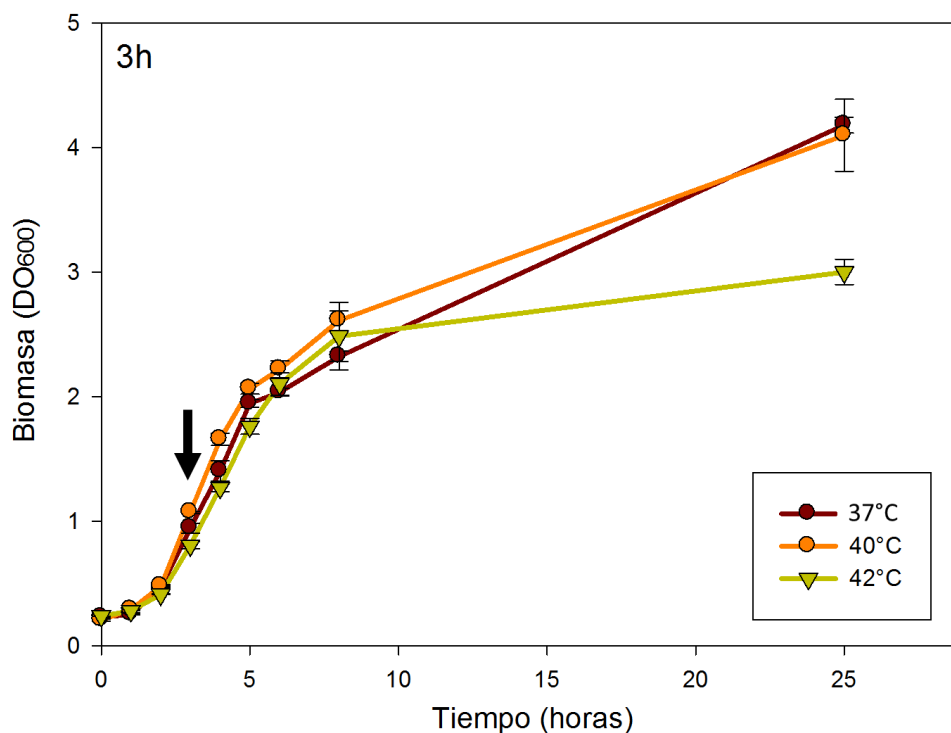


**Figura 10.** Cinéticas de crecimiento de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 40°C. Cinéticas realizadas en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial de 30°C, con inducción térmica (→) a las 3 y 5 horas de cultivo. El valor de  $\mu$  es mayor en el cultivo inducido a las 3 horas.

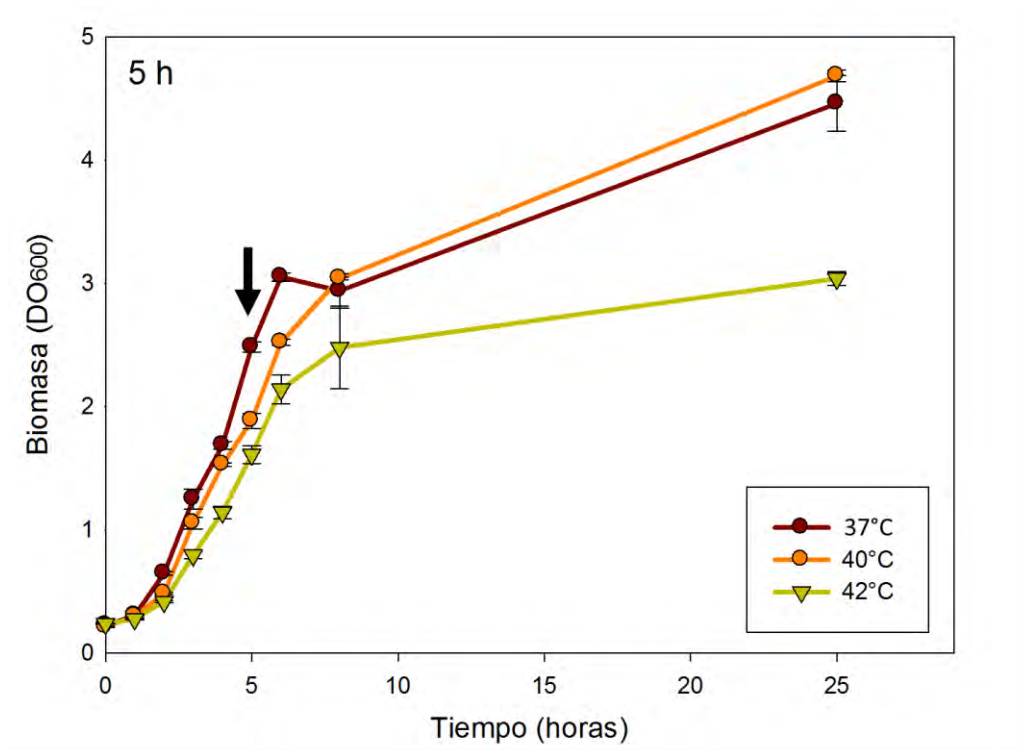


**Figura 11.** Cinéticas de crecimiento de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 empleando una temperatura de inducción de 42°C. Cinéticas realizadas en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial de 30°C, con inducción térmica (→) a las 3 y 5 horas de cultivo. No hay una diferencia significativa entre los valores de  $\mu$ .

Al comparar los cultivos inducidos a las 3 horas pero a diferentes temperaturas (Figura 12) se observa que la inducción a 42 °C afecta de manera notable la producción de biomasa, hecho reportado por distintos grupos de trabajo (Aucoin *et al.*, 2006, Valdez-Cruz *et al.*, 2010) mientras que la inducción a temperaturas de 37 y 40°C no afecta el crecimiento e incluso no hay una diferencia significativa en las cinéticas de ambos tipos de cultivos. La comparación entre los cultivos inducidos a las 5 horas (Figura 13), muestra la misma tendencia que la comparación de los cultivos inducidos a las 3 horas, en ambos casos se observa un mayor crecimiento en los cultivos inducidos a 37 y 40°C.



**Figura 12.** Comparación entre cinéticas de crecimiento de cultivos de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 inducidos a las 3 horas. Cultivos realizados en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial de 30°C y termoinducidos a 37, 40 y 42°C.



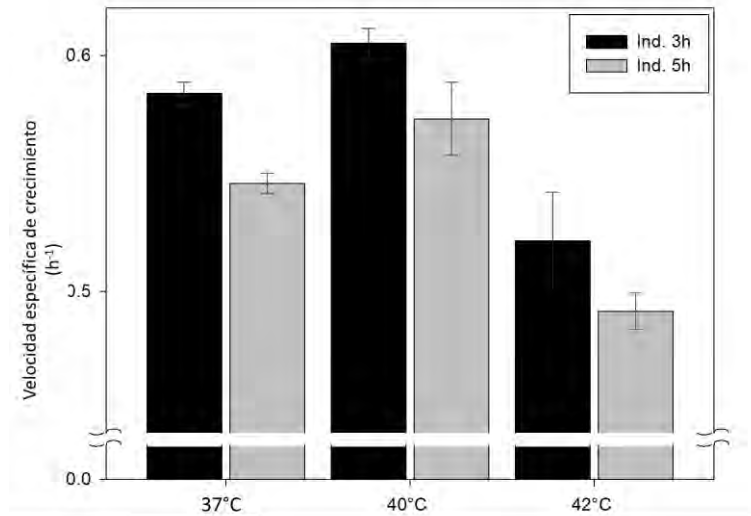
**Figura 13.** Comparación entre cinéticas de crecimiento cultivos de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 inducidos a las 5 horas. Cultivos realizados en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial de 30°C y termoinducidos a 37, 40 y 42°C.

En la figura 14 se presenta la comparación de las  $\mu$ . Los cultivos inducidos a las 3 horas alcanzan un mayor valor de  $\mu$ . En los cultivos inducidos a 42°C se alcanza el menor valor de  $\mu$ , afectados por la desnaturalización de proteínas y la activación de la HSR (Caspeta *et al.*, 2009, Valdez-Cruz *et al.*, 2010, Valdez-Cruz *et al.*, 2011).

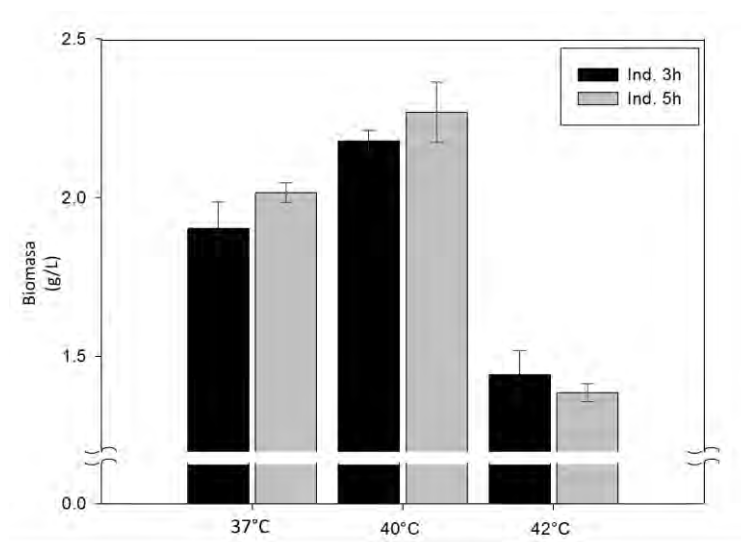
En el tiempo final (25 horas), se determinó el peso seco de los 50 mL de cultivo de todas las cinéticas, los datos se compararon en la figura 16. La mayor producción de biomasa se obtuvo en los cultivos inducidos a 40 °C y la menor producción se obtuvo en los cultivos inducidos a 42 °C. El incremento de temperatura a 42 °C, como se mencionó anteriormente, afecta el metabolismo celular por desnaturalización proteica, la activación de la HSR y activación de la respuesta SOS



(Caspeta *et al.*, 2009, Valdez-Cruz *et al.*, 2010, Valdez-Cruz *et al.*, 2011), lo cual se traduce en una disminución de la viabilidad celular y disminución en la producción de biomasa (Rudolph *et al.*, 2010).



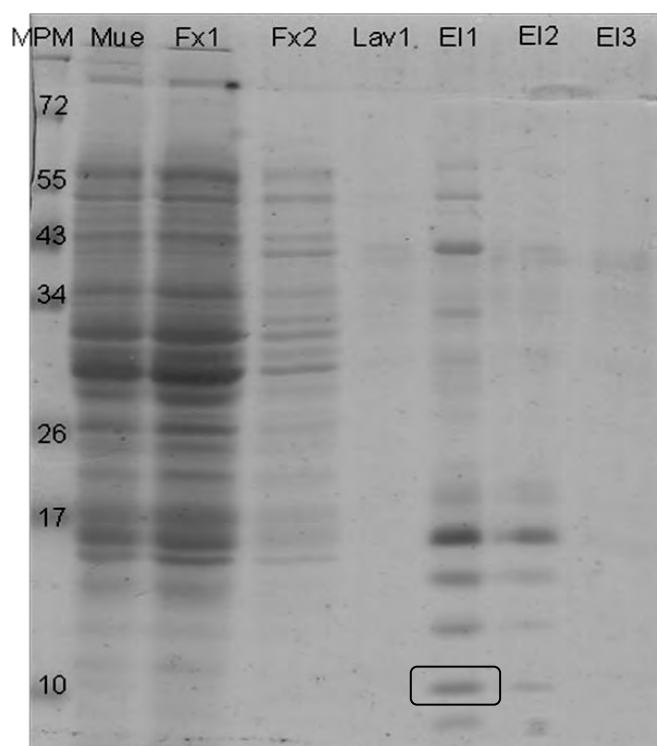
**Figura 14.** Comparación de las velocidades específicas de crecimiento determinadas a partir de los cultivos de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 con distintas condiciones de inducción. Cultivos realizados en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial 30°C, inducidos a 37, 40 y 42°C, a las 3 (barras negras) y 5 horas (barras grises).



**Figura 15.** Comparación de la biomasa final de los cultivos de la cepa de *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 con distintas condiciones de inducción. Cultivos realizados en medio TB, 200 rpm de agitación, temperatura inicial 30°C, inducidos a 37, 40 y 42°C, a las 3 (barras negras) y 5 horas (barras grises).

### 8.3. Purificación de proteína y análisis por MALDI-TOF

A partir del cultivo en 250 mL de medio TB se realizó la purificación por afinidad con níquel usando el kit "Ni-NTA Superflow" (QIAGEN®). Las fracciones recolectadas en la purificación se corrieron en SDS-PAGE (Figura 16). En el gel SDS-PAGE se observa el progreso de la purificación. Se esperaba observar en los carriles de elución una sola banda correspondiente a CFP-10 a la altura de 26 kDa (Hemmati, 2011). Sin embargo, en los carriles de elución se observa un bandeo, entre los cuales no se encontraba la banda de 26 kDa pero se encontró una banda a la altura de 10 kDa, el peso teórico de la proteína de interés (Dillon *et al.*, 2000).



**Figura 16.** SDS-PAGE de las muestras obtenidas a partir de la purificación por afinidad con níquel. Los carriles contienen el marcador de peso molecular (MPM), la muestra del cultivo antes de la purificación (Mue), la 1a y 2da fracción de proteína no retenida por la columna (Fx1, Fx2), el primer lavado (Lav), la 1a, 2da y 3a elución (EI1, EI2, EI3). El fragmento del gel en donde se encontraba la banda señalada (10 kDa, carril EI1) fue cortado, desteñado y digerido con LysC para ser analizado por MALDI-TOF.

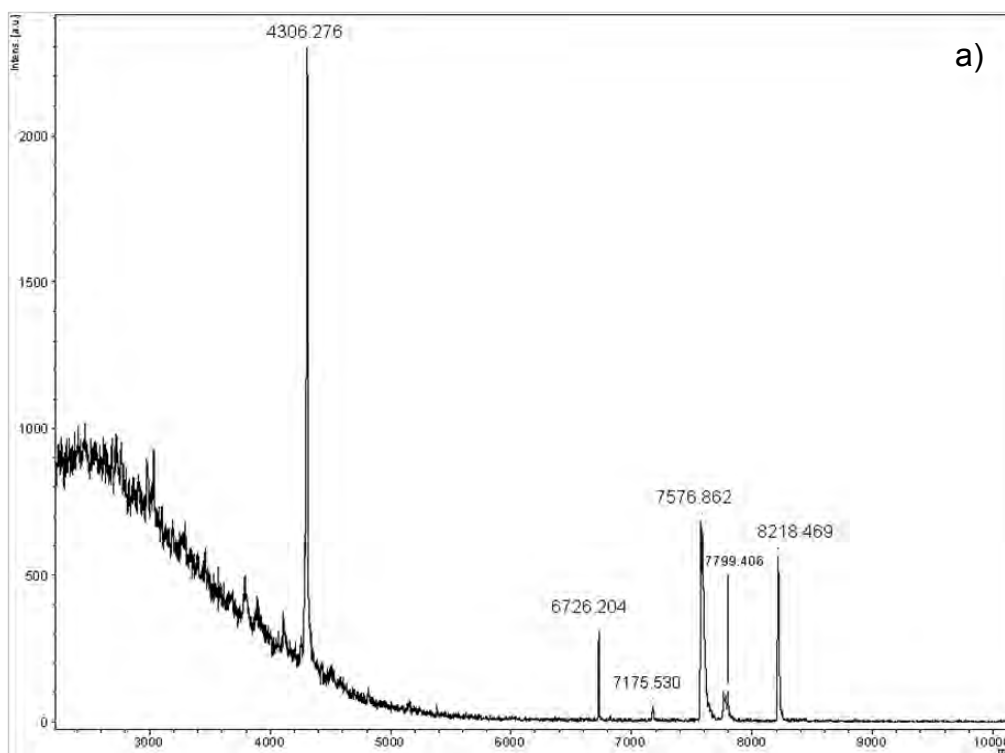
Considerando que para la purificación se empleó un cultivo de mayor volumen, la banda a la altura de 10 kDa pudo haberse hecho visible por estar más concentrada en comparación al SDS-PAGE corrido a partir de los cultivos de 50 mL en medio LB y medio TB (Figura 8). Con base en ésta teoría, se cortó la banda de 10 kDa del carril de elución 1 (E1) y digerimos la proteína con LysC. Se realizó un MALDI-TOF a la muestra digerida (Figura 17) y se compararon los valores obtenidos con los valores extraídos de la simulación de digestión de CFP-10 por LysC realizada con la herramienta PeptideCutter de ExPASy, Bioinformatics Resource Portal ([http://web.expasy.org/peptide\\_cutter/](http://web.expasy.org/peptide_cutter/)) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Simulación de digestión de la proteína CFP-10 de *M. tuberculosis* H37Rv por LysC. (<http://www.uniprot.org/uniprot/C5EWW6>)

Posición de corte	Enzima	Secuencia peptídica resultante	Longitud de fragmento [aa]	Masa del fragmento [Da]
5	LysC	MAEMK	5	608.769
26	LysC	TDAATLAQEAGN FERISGDLK	21	2207.382
64	LysC	TOIDOVESTAGS LQGWRGAAGT AAQAAVVRFOEA ANK	38	3917.267
66	LysC	QK	2	274.32
100	Final de secuencia	QELDEISTNIRQA GVOYSRADEEQ QQALSSQMGF	34	3858.122

Entre los valores del MALDI-TOF no se encontraron masas que correspondieran a los fragmentos grandes esperados (2207.382, 3917.267 y 3858.122 Da) o a la masa de la proteína CFP-10 completa, con o sin cola de histidinas (10.8 y 11.62 kDa, respectivamente). Lo

cual nos indicó que la proteína de interés CFP-10 no correspondía a la banda de 10 kDa. Además, las masas de los fragmentos de la tabla 1 oscilan entre los 600 y 4000 Da, región que en el análisis de MALDI-TOF muestra demasiado ruido. Por otro lado, al no encontrar la banda de 26 kDa en el SDS-PAGE de las fracciones de purificación, excluimos que la proteína CFP-10 correspondiera a la banda señalada en la figura 8.



**Figura 17.** MALDI-TOF de muestra digerida con LysC realizado en el Laboratorio de Cromatografía del Instituto de Química de la UNAM. La muestra se obtuvo de la banda de 10 kDa en el SDS-PAGE (Figura 16). Ninguna de las señales observadas corresponde a alguna de las masas de los fragmentos simulados en la tabla 1.

Para confirmar la presencia o ausencia de la proteína CFP-10 en los geles SDS-PAGE de la purificación, se corrieron nuevos geles de la muestra antes y durante el proceso de purificación. Se realizaron Western Blots empleando anticuerpo contra marca de histidinas. Sin embargo, no se observó ninguna banda en el momento del revelado.

Los resultados de los Western Blots junto con los resultados de MALDI-TOF sugieren que probablemente la cepa no se encontraba correctamente armada y no expresa CFP-10.

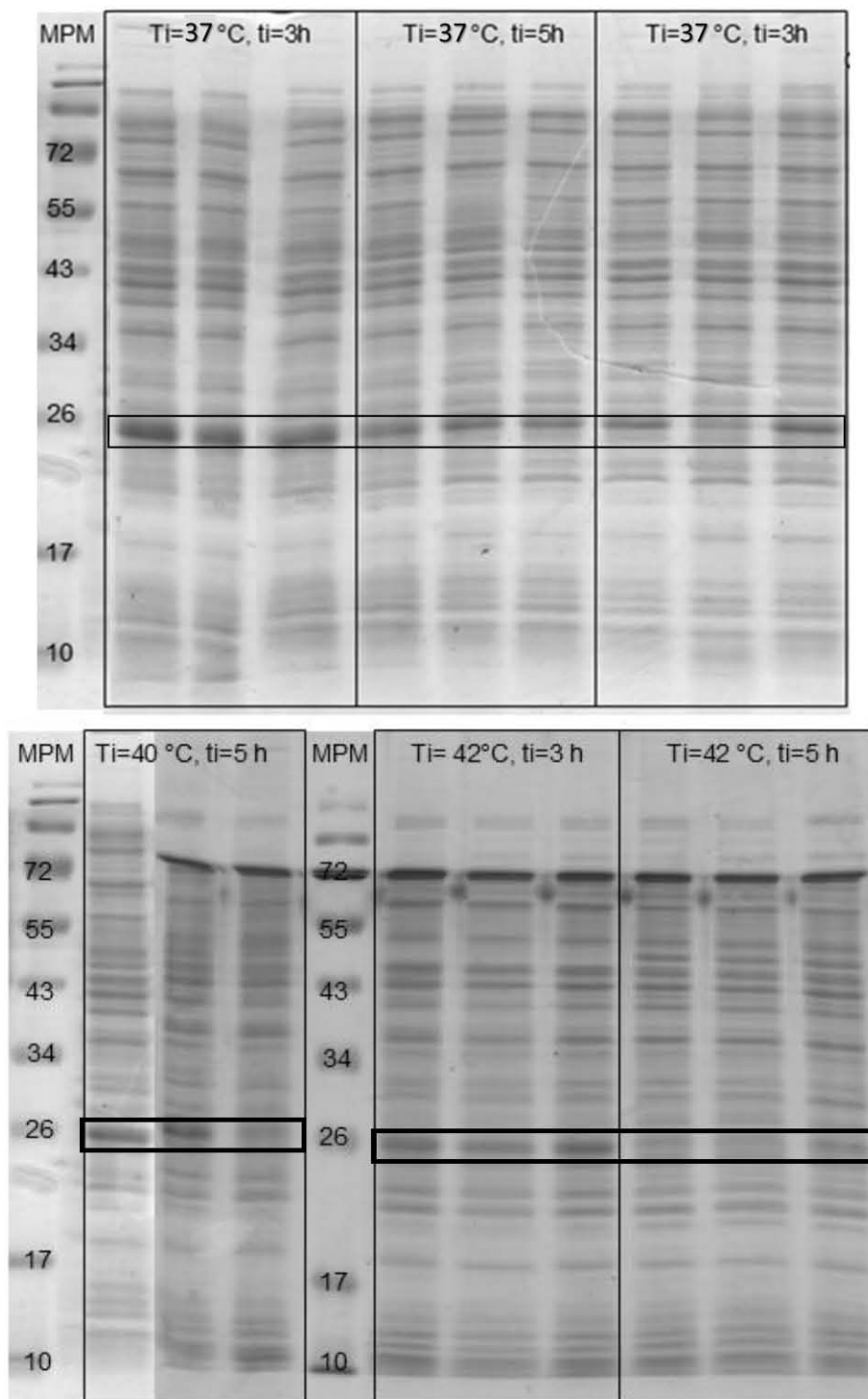
#### **8.4. Secuenciación**

Con el objetivo de rectificar si la construcción de la cepa *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 fue construida correctamente, se mandó secuenciar al Instituto de Biotecnología de la UNAM. La secuenciación mostró que el gen *esxB* no fue insertado en el sentido correcto, lo cual da lugar a la expresión de un polipéptido diferente a CFP-10 que podría explicar la banda sobreexpresada de 26 kDa (Figura 8). Por otra parte, la banda de 26 kDa podría deberse a la presencia de cl857, proteína de 237 aa de longitud y de peso molecular aproximado de 26 kDa (Protein, NCBI).

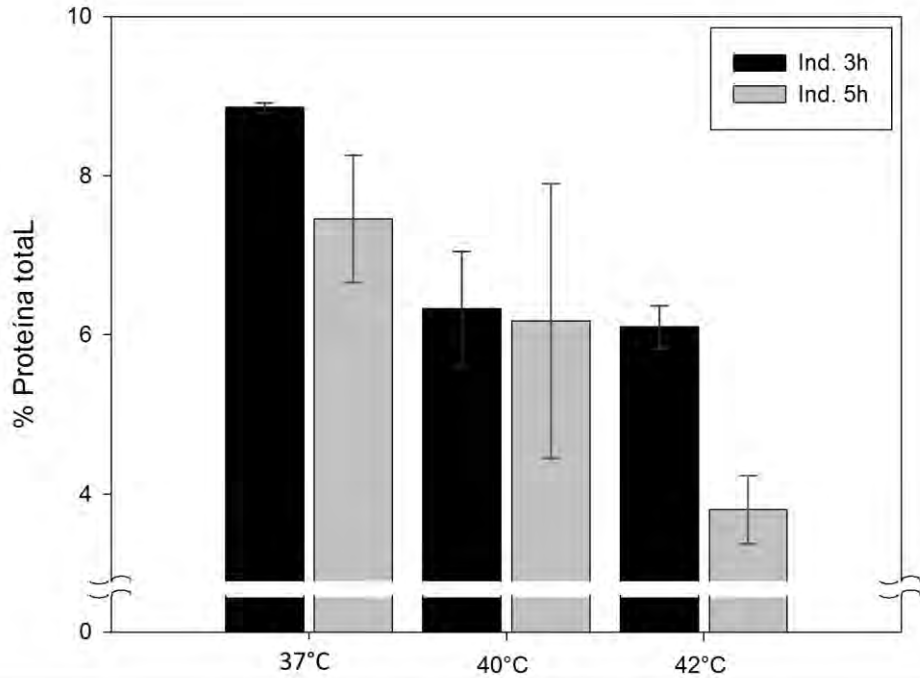
#### **8.5. Producción de la proteína inducible de 26 kDa**

Las muestras obtenidas en el tiempo final de las cinéticas de crecimiento en 50 mL de medio TB a 30°C e inducidas a distintas temperaturas y distintos tiempos, se corrieron en SDS-PAGE (Figura 18a y 18b). Posteriormente, los geles fueron escaneados y se realizó un análisis de densitometría con el programa ImageJ. En el análisis de densitometría se comparó la saturación, equivalente a la concentración, de las bandas de 26 kDa, proteína aparentemente sobreexpresada después de la termoinducción (Figura 8). En la figura 19 se presentan los resultados de la densitometría. Se observa una diferencia significativa entre la concentración de la banda de 26 kDa de los cultivos inducidos a 37°C y 40°C y en los cultivos inducidos a 42°C, independientemente del momento de inducción. La diferencia en la producción de biomasa por la termoinducción a 42°C también se ve reflejada en la concentración de proteína de 26 kDa. La mayor concentración de la proteína de 26 kDa se observa en los cultivos inducidos a 37°C a las 3 horas de haber

inoculado, a pesar de que la producción de biomasa es menor que en los cultivos inducidos a 40°C.



**Figura 18a y 18b.** SDS-PAGE de muestras de tiempos finales (25 horas) de cultivos inducidos a 37, 40 y 42 °C e inducción a las 3 y 5 horas de cultivo, por triplicado.



**Figura 19.** Comparación del porcentaje de proteína de 26kDa obtenido por densitometría de SDS-PAGE. Porcentaje obtenido con respecto a la cantidad de proteína total en el tiempo final de los cultivos en medio TB inducidos a 37, 40 y 42°C, a las 3 horas (barras negras) y 5 horas (barras grises).

## 9. Conclusiones

- Al comparar el crecimiento de la cepa *E. coli* pΔBlue\_CFP-10 en medio de cultivo Luria-Bertani ( $1.12 \pm 0.03$  g/L) y medio Terrific-Broth ( $1.81 \pm 0.12$  g/L), se obtuvo una mayor producción de biomasa en el tiempo final en el medio TB.
- La cepa empleada para la realización de este trabajo experimental no se encuentra construida correctamente, por lo cual no se produjo la proteína deseada. Sin embargo, si cuenta con el promotor y con el incremento termo-dependiente de la concentración de una proteína de peso aproximado de 26 kDa que podría ser la proteína represora cI857, lo cual nos permitió realizar la caracterización basándonos en la cantidad de proteína expresada.

- La temperatura de inducción a 40°C es a la cual se obtiene una mayor producción de biomasa y se alcanza una mayor velocidad específica de crecimiento.
- La inducción a las 3 horas o 5 horas del cultivo no influye de manera significativa en la producción de biomasa, sin embargo, la inducción a las 3 horas de cultivo incrementa la velocidad específica de crecimiento en los cultivos inducidos a una temperatura de 37 y de 40 °C.
- La inducción a 42 °C probablemente no optimizaría la producción de una proteína heteróloga, debido a que disminuye significativamente la producción de biomasa y la concentración de la proteína de 26 kDa es menor en comparación a los cultivos inducidos a 37 y a 40 °C.
- El cultivo inducido a 37°C, a las 3 horas de cultivo podrían ser condiciones prometedoras para la producción de una proteína heteróloga como CFP-10.

## 10. Perspectivas

- Realizar una nueva construcción de la cepa *E. coli* pΔBlue\_CFP-10.
- Identificar si la proteína de 26 kDa corresponde a la proteína represora cl857.
- Realizar la termoinducción por lapsos definidos de tiempo, seguidos por un retorno a la temperatura de cultivo inicial, ya que se ha sugerido que esto puede favorecer el incremento en la producción de biomasa y como consecuencia una producción de proteína recombinante mayor (Aucoin *et al.*, 2006., Caspeta *et al.*, 2009)



## 11. Bibliografía

- Aagaard C, Govaerts M, Meikle V, Gutiérrez-Pabello JA, McNair J, Andersen P, Suárez-Güemes F, Pollock J, Espitia C, Cataldi A. Detection of bovine tuberculosis in herds with different disease prevalence and influence of paratuberculosis infection on PPDB and ESAT6/CFP10 specificity. *Prev Vet Med.* 2010; 96:161–169.
- Andersen P, Andersen AB, Sorensen AL, Nagai S. Recall of longlived immunity to *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *J Immunol.* 1995; 154:3359-3372.
- Andersen P. TB vaccines: progress and problems. *Trends Immunol.* 2002; 22:160–168.
- Arlehamn CS, Sidney J, Henderson R, Greenbaum JA, James EA, Moutaftsi M, Coler R, McKinney DM, Park D, Taplitz R, Kwok WW, Grey H, Peters B, Sette A. Dissecting mechanisms of immunodominance to the common tuberculosis antigens ESAT-6, CFP10, Rv2031c (hspX), Rv2654c (TB7.7), and Rv1038c (EsxJ). *J Immunol.* 2012; 188(10): 5020-5031.
- Aucoin MG, McMurray-Beaulieu V, Poulin F, Boivin EB, Chen J, Ardelean FM, Cloutier M, Choi YJ, Miquez CB, Jolicoeur M. Identifying conditions for inducible protein production in *E. coli*: combining a fed-batch and multiple induction approach. *Microb Cell Fact.* 2006; 15:5-27.
- Barnes DS. Historical perspectives on the etiology of tuberculosis. *Microbes Infect.* 2000; 2: 431–440.
- Behr MA, Wilson MA, Gill WP, Salamon H, Schoolnik GK, Rane S, Small PM. Comparative genomics of BCG vaccine by whole-genome DNA microarray. *Science.* 1999; 284:1520–1523.
- Berthet FX, Rasmussen PB, Rosenkrands I, Andersen P, Gicquel B. A *Mycobacterium tuberculosis* operon encoding ESAT-6 and a novel low- molecular-mass culture filtrate protein (CFP-10). *Microbiol.* 1998; 144:3195-3203.

- Boddinghaus B, Rogall T, Flohr T, Blocker H, Bottger EC. Detection and identification of *Mycobacteria* by amplification of rRNA. J Clin Microbiol. 1990; 28:1751-1759.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem. 1976; 72: 248-254.
- Brock I, Munk ME, Kok-Jensen A, Andersen P. Performance of whole blood IFN-gamma test for tuberculosis diagnosis based on PPD or the specific antigens ESAT-6 and CFP-10. Int J Tuberc Lung D. 2001; 5(5):462-467.
- Brosch R, Gordon SV, Buchrieser C, Pym AS, Garnier T, Cole ST. Comparative genomics uncovers large tandem chromosomal duplications in *Mycobacterium bovis* BCG Pasteur. Yeast. 2000; 17: 111-123.
- Calmette A, Guérin C. Nouvelles recherches expérimentales sur la vaccination des bovidés contre la tuberculose. Ann Inst Pasteur. 1920; 34: 553-560.
- Caspeta L, Flores N, Pérez NO, Bolívar F, Ramírez OT. The effect of heating rate on *Escherichia coli* metabolism, physiological stress, transcriptional response, and production of temperature-induced recombinant protein: A scale-down study. Biotechnol Bioeng. 2009; 102(2): 468-482.
- Chen M, Gan H, Remold HG. A mechanism of virulence: *Mycobacterium tuberculosis* strain H37Rv, but not attenuated H37Ra, causes significant mitochondrial inner membrane disruption in macrophage leading to necrosis. J Immunol. 2006; 176:3707-3716.
- Corbett EL, Watt CJ, Walker N, Maher D, Williams BG, Raviglione MC, Dye C. The growing burden of tuberculosis: global trends and interactions with the HIV epidemic. Arch Intern Med. 2003; 163(9):1009-21.
- Cosivi O, Grange JM, Daborn CJ, Raviglione MC, Fujikura T, Cousins D, Robinson RA, Huchzermeyer HF, de Kantor I, Meslin FX. Zoonotic

- tuberculosis due to *Mycobacterium bovis* in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 1998; 4(1):59-70.
- Cosma CL, Sherman DR, and Ramakrishnan L. The secret lives of the pathogenic mycobacteria. *Annu Rev Microbiol.* 2003; 57:641–676.
- Demain AL, Vaishnav P. Production of recombinant proteins by microbes and higher organisms. *Biotechnol Adv.* 2009; 27(3):297-306.
- Dillon DC, Alderson MR, Day CH, Bement T, Campos-Neto A, Skeiky YA, Vedvick T, Badaro R, Reed SG, Houghton R. Molecular and immunological characterization of *Mycobacterium tuberculosis* CFP-10, an immunodiagnostic antigen missing in *Mycobacterium bovis* BCG. *J Clin Microbiol.* 2000; 38(9): 3285-3290.
- Dinnes J, Deeks J, Kunst H, Gibson A, Cummins E, Waugh N, Drobniewski F, Lalvani A. A systematic review of rapid diagnostic tests for the detection of tuberculosis infection. *Health Technol Assess.* 2007, 11(3): 1-196.
- Dodd IB, Perkins AJ, Tsemitsidis D, Egan JB. Octamerization of lambda CI repressor is needed for effective repression of P(RM) and efficient switching from lysogeny. *Genes Dev.* 2001; 15(22): 3013-3022.
- Dodd IB, Shearwin KE, Egan JB. Revisited gene regulation in bacteriophage lambda. *Curr Opin Genet Dev.* 2005; 15(2):145-152.
- Dong H, Nilsson L, Kurland CG. Gratuitous overexpression of genes in *Escherichia coli* leads to growth inhibition and ribosome destruction. *J Bacteriol.* 1995; 177(6):1497-504. Erratum in: *J Bacteriol* 1997; 179(6):2096.
- Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis.* 2006; 10:1192-1204.
- Fine PE. Variation in protection by BCG: implication of and for heterologous immunity. *Lancet.* 1995; 346:1339–1345. Erratum in: *Lancet.* 1996; 347:340.

- Flores-Villalva S, Suárez-Güemes F, Espitia C, Whelan AO, Vordermeier M, Gutiérrez-Pabello JA. Specificity of the tuberculin skin test is modified by use of a protein cocktail containing ESAT-6 and CFP-10 in cattle naturally infected with *Mycobacterium bovis*. Clin Vaccine Immunol. 2012; 19(5): 797-803.
- Ganguly N, Siddiqui I, Sharma P. Role of *M. tuberculosis* RD-1 region encoded secretory proteins in protective response and virulence. Tuberculosis. 2008; 88(6): 510-517.
- Gey Van Pittius NC, Gamielien J, Hide W, Brown GD, Siezen RJ, Beyers AD. The ESAT-6 gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* and other high G+C Gram-positive bacteria. Genome Biol. 2001; 2(10): RESEARCH0044.
- Gill RT, Valdes JJ, Bentley WE. A comparative study of global stress gene regulation in response to overexpression of recombinant proteins in *Escherichia coli*. Metab Eng. 2000; 2(3):178-189.
- Grigg ERN. The arcana of tuberculosis: with a brief epidemiologic history of the disease in the U.S.A. Part III. Am Rev Tuberc Pulm Dis. 1958; 78: 426-453.
- Grosset J. *Mycobacterium tuberculosis* in the extracellular compartment: an underestimated adversary. Antimicrob Agents Chemother. 2003; 47(3):833-836.
- Guinn KM, Hickey MJ, Mathur SK, Zakel KL, Grotzke JE, Lewinsohn DM, Smith S, Sherman DR. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6 / CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. Mol Microbiol. 2004; 51:359-370.
- Guo Y, Wallace SS, Bandaru V. A novel bicistronic vector for overexpressing *Mycobacterium tuberculosis* proteins in *Escherichia coli*. Protein Expr Purif. 2009; 65(2):230-237.
- Hannig G, Makrides SC. Strategies for optimizing heterologous protein expression in *Escherichia coli*. Trends in Biotechnol. 1998; 16:54-60.
- Hemmati M, Seghatoleslam A, Rasti M, Ebadat S, Mosavari N, Habibagahi M, M Taheri, AR Sardarian, Z Mostafavi-Pour.

- Expression and purification of recombinant *Mycobacterium tuberculosis* (TB) antigens, ESAT-6, CFP-10 and ESAT-6/CFP-10 and their diagnosis potential for detection of TB patients. Iran Red Crescent Med J. 2011; 13(8):556-563.
- Hoffman F, Rinas U. Stress induced by recombinant protein production in *Escherichia coli*. Adv Biochem Eng/Biotechnol. 2004; 89:73-92.
- Hope J, Villareal-Ramos B. Bovine TB and the development of new vaccines. Comp Immun Microbiol Infect Dis. 2008; 31:77-100.
- Houben EN, Nguyen L, Pieters J. Interaction of pathogenic mycobacteria with the host immune system. Curr Opin Microbiol. 2006; 9(1):76-85.
- Huebner RE, Schein MF, Bass JB Jr. The tuberculin skin test. Clin Infect Dis. 1993; 17:968-975.
- Iseman MD. Evolution of drug-resistant tuberculosis: a tale of two species. Proc Natl Acad Sci USA. 1994; 91(7):2428-2429.
- Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. Appl Microbiol Biotechnol. 2005; 67(3): 289-298.
- Johnson AD, Meyer BJ, Ptashne M. Interactions between DNA-bound repressors govern regulation by the lambda phage repressor. Proc Natl Acad Sci USA. 1979; 76:5061-5065.
- Kaku T, Kawamura I, Uchiyama R, Kurenuma T, Mitsuyama M. RD1 region in mycobacterial genome is involved in the induction of necrosis in infected RAW264 cells via mitochondrial membrane damage and ATP depletion. FEMS Microbiol Lett. 2007; 274:189-195.
- Kamath AB, Woodworth J, Xiong X, Taylor C, Weng Y, Behar SM. Cytolytic CD8+ T cells recognizing CFP10 are recruited to the lung after *Mycobacterium tuberculosis* infection. J Exp Med. 2004, 200(11): 1479-1489.

- Kane JF. Effects of rare codon clusters on high-level expression of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Curr Opin Biotechnol*. 1995; 6: 494–500.
- Kulshrestha A, Gupta A, Verma N, Sharma SK, Tyagi AK, Chaudhary VK. Expression and purification of recombinant antigens of *Mycobacterium tuberculosis* for application in serodiagnosis. *Protein Expr Purif*. 2005; 44(1):75-85.
- Kurland C, Gallant J. Errors of heterologous protein expression. *Curr Opin Biotechnol*. 1996; 7:489–493.
- Lieb M. Studies of heat-inducible lambda bacteriophage, I. Order of genetics sites and properties of mutant prophages. *J Mol Biol*. 1996; 16:149-163.
- Lipsitch M, Sousa AO. Historical intensity of natural selection for resistance to tuberculosis. *Genetics*. 2002; 161(4):1599-1607.
- MacIntyre CR. New developments in BCG vaccine: implications for tuberculosis control. *Epidemiol Infect*. 2007; 135:177-180.
- Madurawe RD, Chase TE, Tsao EI, Bentley WE. A recombinant lipoprotein antigen against Lyme disease expressed in *E. coli*: Fermentor operating strategies for improved yield. *Biotechnol Progress*. 2000; 16: 571–576.
- Mahairas G, Sabo PJ, Hickey MJ, Singh DC, Stover CK. Molecular analysis of genetic differences between *Mycobacterium bovis* BCG and virulent *M. bovis*. *J Bacteriol*. 1996; 178:1274-1282.
- Makrides SC. Strategies for achieving high-level expression of genes in *Escherichia coli*. *Microbiol Rev*. 1996; 60:512–538.
- Marei A, Ghaemmaghami A, Renshaw P, Wiselka M, Barer M, Carr M, Ziegler-Heitbrock L. Superior T cell activation by ESAT-6 as compared with the ESAT-6–CFP-10 complex. *Int Immunol*. 2005; 17(11):1439-1446.
- Meyer BJ, Maurer R, Ptashne M. Gene regulation at the right operator (OR) of bacteriophage lambda. II. OR1, OR2, and OR3: their roles

- in mediating the effects of repressor and cro. *J Mol Biol.* 1980; 139(2):163-194.
- Michel AL, Müller B, Van Helden PD. *Mycobacterium bovis* at the animal-human interface: A problem, or not?. *Vet Microbiol.* 2010; 140:371-381.
- Mostowy S, Cleto C, Sherman DR, Behr MA. The *Mycobacterium tuberculosis* complex transcriptome of attenuation. *Tuberculosis.* 2004; 84: 197–204.
- Nonaka G, Blankschien M, Herman C, Gross CA, Rhodius VA. Regulon and promoter analysis of the *E. coli* heat-shock factor,  $\sigma_{32}$ , reveals a multifaceted cellular response to heat stress. *Genes Dev.* 2006; 20(13):1776-1789.
- Palomares LA, Estrada-Mondaca S, Ramirez OT. Production of recombinant proteins: challenges and solutions. *Methods Mol Biol.* 2004; 267:15–52.
- Parthasarathy S, Veerasami M, Appana G, Chandran D, Das D, Srinivasan VA. Use of ESAT-6-CFP-10 fusion protein in the bovine interferon-gamma ELISPOT assay for diagnosis of *Mycobacterium bovis* infection in cattle. *J Microbiol Methods.* 2012; 90(3):298-304.
- Paterson, AB. The production of bovine tuberculoprotein. *J Comp Pathol Ther.* 1948; 58: 302–313.
- Perkins MD. New diagnostic tools for tuberculosis. *Int J Tuberc Lung Dis.* 2000; 4: S182–S188.
- Portillo-Gómez L, Sosa-Iglesias EG. Molecular identification of *Mycobacterium bovis* and the importance of zoonotic tuberculosis in Mexican patients, *Int J Tuberc Lung Dis*, 2011, 15(10):1409-1414.
- Pottumarthy S, Wells VC, Morris AJ. A comparison of seven tests for serological diagnosis of tuberculosis. *J Clin Microbiol.* 2000; 38:2227–31.

- Ptashne M, Jeffrey A, Johnson AD, Maurer R, Meyer BJ, Pabo CO, Roberts TM, Sauer RT. How the lambda repressor and cro work. *Cell*. 1980; 19(1):1-11.
- Remaut E, Stranssens P, Fiers W. Plasmid vectors for high-efficiency expression controlled by the pL promoter of coliphage lambda. *Gene*. 1981; 15:81-93.
- Renshaw PS, Panagiotidou P, Whelan A, Gordon SV, Hewinson RG, Williamson RA, Carr MD. Conclusive evidence that the major T-cell antigens of the *Mycobacterium tuberculosis* complex ESAT-6 and CFP-10 form a tight, 1:1 complex and characterization of the structural properties of ESAT-6, CFP-10 and the ESAT-6.CFP-10 complex: implications for pathogenesis and virulence. *J Biol Chem*. 2002; 277: 21598–21603.
- Renshaw PS, Lightbody KL, Veverka V, Muskett FW, Kelly G, Frenkiel TA, Gordon SV, Hewinson RG, Burke B, Norman J, Williamson RA, Carr MD. Structure and function of the complex formed by the tuberculosis virulence factors CFP-10 and ESAT-6. *EMBO J*. 2005; 24(14): 2491-2498.
- Rudolph B, Gebendorfer KM, Buchner J, Winter J. Evolution of *Escherichia coli* for growth at high temperatures. *J Biol Chem*. 2010; 285(25): 19029-19034.
- Ryan KJ, Ray CG. Sherris Medical Microbiology. 4th ed. McGraw Hill; 2004. Chapter 27.
- Schmidt FR. Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2004; 65:363-372.
- Schoner BE, Belagaje RM, Schoner RG. Enhanced translational efficiency with two-cistron expression system. *Methods Enzymol*. 1990; 185:94–103.
- Sezonov G, Joseleau-Petit D, D'Ari R. *Escherichia coli* physiology in Luria-Bertani broth. *J Bacteriol*. 2007; 189(23): 8746-8749.
- Shearwin KE, Brumby AM, Egan JB. The Tum protein of coliphage 186 is an antirepressor. *J Biol Chem*. 1998; 273(10):5708-5715.



- Shi Q, Ling MM, Yang T. Protein production for biotechnology. eLS. 2001. DOI: 10.1038/npg.els.0000983
- Smith I. *Mycobacterium tuberculosis* pathogenesis and molecular determinants of virulence. Clin Microbiol Rev. 2003; 16(3):463-496.
- Smith NH, Hewinson RG, Kremer K, Brosch R, Gordon SV. Myths and misconceptions: the origin and evolution of *Mycobacterium tuberculosis*. Nat Rev Microbiol. 2009. 7(7): 537-544.
- Sorensen AL, Nagai S, Houen G, Andersen P, Andersen AB. Purification and characterization of a low-molecular-mass T-cell antigen secreted by *Mycobacterium tuberculosis*. Infect Immun. 1995; 63:1710-1717.
- Sorensen MA, Kurland CG, Pedersen S. Codon usage determines translation rate in *Escherichia coli*. J Mol Biol. 1989; 207: 365–377.
- Sreevatsan S, Pan X, Stockbauer KE, Connell ND, Kreiswirth BN, Whittam TS. Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. Proc Natl Acad Sci USA. 1997; 94:9869–9874
- Stead WW, Eisenach KD, Cave MD, Beggs ML, Templeton GL, Thoen CO. When did *Mycobacterium tuberculosis* infection first occur in the New World? An important question with public health implications. Am J Respir Crit Care Med. 1995; 151:1267–1268.
- Stead WW. Genetics and resistance to tuberculosis. Could resistance be enhanced by genetic engineering? Ann Intern Med. 1992; 116:937-941.
- Stead WW. The origin and erratic global spread of tuberculosis. How the past explains the present and is the key to the future. Clin Chest Med. 1997; 18:65–77.
- Swartz JR. *Escherichia coli* recombinant DNA technology. *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology. 2nd ed. Washington DC: American Society of Microbiology Press; 1996. Pp: 1693–1711.

- Terpe K. Overview of bacterial expression systems for heterologous protein production: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2006; 72: 211-222.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1979; 76(9):4350-4354.
- Tripathi NK, Babu JP, Shrivastva A, Parida M, Jana AM, Rao PVL. Production and characterization of recombinant dengue virus type 4 envelope domain III protein. *J Biotechnol*. 2008; 134: 278–286.
- Trudeau EL. Environment in its relation to the progress of bacterial invasion in tuberculosis. *Am J Sci*. 1887; 94:118–123.
- Trunz BB, Fine P, Dye C. Effect of BCG vaccination on childhood tuberculous meningitis and miliary tuberculosis worldwide: a meta-analysis and assessment of cost-effectiveness. *Lancet*. 2006; 367(9517):1173-1180.
- Valdez-Cruz NA, Caspeta L, Pérez NO, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Production of recombinant proteins in *E. coli* by the heat inducible expression system based on the phage lambda pL and/or pR promoters. *Microb Cell Fact*. 2010; 9:18. DOI:10.1186/1475-2859-9-18.
- Valdez-Cruz NA, Ramírez OT, Trujillo-Roldán MA. Molecular responses of *Escherichia coli* caused by heat stress and recombinant protein production during temperature induction. *Bioeng Bugs*. 2011; 2(2): 105-110.
- Van der Wel N, Hava D, Houben D, Fluitsma D, van Zon M, Pierson J, Brenner M, Peters PJ. *M. tuberculosis* and *M. leprae* translocate from the phagolysosome to the cytosol in myeloid cells. *Cell*. 2007; 129:1287-1298.
- Van Epps HL. René Dubos: unearthing antibiotics. *J Exp Med*. 2006; 203(2): 259.

- Van Pinxteren LAH, Ravn P, Agger EM, Pollock J, Andersen P. Diagnosis of tuberculosis based on the two specific antigens ESAT-6 and CFP10. Clin Diagn Lab Immunol. 2000; 7(2): 155-160.
- Villaverde A, Benito A, Viaplana E, Cubarsi R. Fine regulation of cl857-controlled gene expression in continuous culture of recombinant *Escherichia coli* by temperature. Appl Environ Microbiol. 1993; 59(10): 3485-3487.
- Weldingh K, Andersen P. Immunological evaluation of novel *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate proteins. FEMS Immunol Med Microbiol 1999; 23: 159-164.
- Weldingh K, Rosenkrands I, Jacobsen S, Rasmussen PB, Elhay MJ, Andersen P. Two-dimensional electrophoresis for analysis of *Mycobacterium tuberculosis* culture filtrate and purification and characterization of six novel proteins. Infect Immun 1998; 66: 3492-3500.
- World Health Organization. Tuberculosis country profiles. January 2013.
- World Health Organization. Tuberculosis. Fact sheet No. 104. October 2012.
- Zahn K. Overexpression of an mRNA dependent on rare codons inhibits protein synthesis and cell growth. J Bacteriol. 1996; 178: 2926-2933.
- Zhang H, Peng P, Miao S, Zhao Y, Mao F, Wang L, Bai Y, Xu Z, Wei S, Shi C. Recombinant *Mycobacterium smegmatis* expressing an ESAT6-CFP10 fusion protein induces anti-mycobacterial immune responses and protects against *Mycobacterium tuberculosis* challenge in mice. Scand J Immunol. 2010; 72(4): 349-357.

## 12. Bibliografía Digital:

Gene Infinity LLC.

[http://www.geneinfinity.org/sp/sp\\_codonusage.html#cuecoli](http://www.geneinfinity.org/sp/sp_codonusage.html#cuecoli).

Consultado: 12/08/2013

Protein, NCBI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/ACH42113.1>.

Consultado: 13/08/2013.