

**Universidad de Buenos Aires**  
**Facultad de Ciencias Exactas y Naturales**



**Identificación y Caracterización de Mce3R, un  
regulador negativo de la transcripción del operón  
*mce3* de *Mycobacterium tuberculosis***

Trabajo de tesis para optar al grado de Doctor de la Universidad de  
Buenos Aires en el área Ciencias Biológicas

**Lic. María de la Paz Santangelo**

**Director de tesis: Dra. Fabiana Bigi**

**2006**

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA  
CICVyA. INTA. Buenos Aires, Argentina

En primer lugar quiero agradecer a los Directores Osvaldo y Lela por brindarme la oportunidad de desarrollar este trabajo de Tesis en el Instituto de Biotecnología.

Son muchas las personas que de algún modo u otro hicieron posible este trabajo. Haciendo un poco de historia quiero comenzar agradeciendo a Marisa L. B. por permitirme llegar al IB allá por principios del 98, y junto con Alejandro E. brindarme la oportunidad de ingresar al grupo Girasol. Allí me recibieron Nilda, Vale, Marce, Nora, Cori y Viviana, quienes inmediatamente me hicieron sentir una girasola más. Compartimos muchas cosas, largas horas de flujo laminar, charlas de café con manzanita y gigantescos ensayos de transformación. Durante un año y medio fui una auténtica plantóloga y recuerdo muy lindos momentos. Gracias a quienes compartieron el laboratorio en ese tiempo: Tere y Andre D., casi girasolas, Seba por el soporte técnico, Mariana por tus comentarios acertados y Ana por escucharme, acompañarme y compartir los mediodías en el jardín. A los de enfrente: Luigi, el *hacker* de fierro, Caro, “la alma de la fiesta”, Dani T un personaje sin igual. Y a los que llegaron después, con quienes quizás no compartimos tanto pero de alguna manera también estuvieron ahí: Ariel y Flor, Paola, Paula, Vero Nishi y Ruth. A Vero Lía y Norma por los aportes bioinformáticos. A Ceci gracias por “saber por qué decís las cosas” y darme el empujón junto con Esteban hacia el medio del Instituto y llegar a Tuberculosis.

Gracias a Angel por abrirme las puertas del grupo y dejarme formar parte de *team* TBC. Quiero agradecer especialmente a Fabi. porque además de enseñarme “biología molecular” me enseñaste a darle a las cosas la importancia que merecen, a desestructurarme (un poco) y tomarme las cosas con otra filosofía (a veces). Gracias por marcarme el camino y al mismo tiempo darme la libertad de trabajar sola. Gracias por tener tiempo siempre para leer, discutir, hacer experimentos y escribir *papers*. A mis compañeritos del lab: Lauri un despiste caminando, gracias por tus valiosos aportes, Nacho y Marisa siempre en su mundo y Vero B por la gran disponibilidad y ayuda con los ratones. A Vale nuestra técnica de lujo: gracias por los medios de cultivo, las soluciones y los clonados. Gracias porque entre todos hacemos ese pequeño- gran *caos* que es TBC central. A los del “anexo”: Martincito siempre una palabra justa, Kari y Andre por estar y dar una mano (grande) con los ratones, Ali por traerme tantas veces con la camioneta, Virginia también en su mundo, Gaby y Fede por las RT. Y aunque no siempre compartamos tanto tenemos una gran cosa en común: un jefe, les parece poco?.

A los hermanos brucelosos: Mariela y Julia por hacer los días más divertidos, Silvio por escucharme siempre y compartir su conocimiento y experiencia, Haydée por los medios y soluciones y Eleo con quien compartimos mucho más que los viajes al INTA.

A los aftosos: Oski gracias por estar siempre dispuesto a ayudar, analizar resultados y aportar sabios comentarios a la discusión. Andre “una chica de fierro” gracias por facilitarme los trámites de la tesis, Paulita y Gaby C. por las idas al jardín y compartir lindos momentos con nuestros hijos, Guido y Ari tan opuestos. A los hemoparásitos: Marisa por el INCO compartido, Silvina, Paula, Rosalía y Romi, por los mates y la lucha becarial. A Dalia y a Bessie, por tantos viajes compartidos en el charter de Belgrano.

Gracias a Isa por la sonrisa de todos los días, y a Fabián, Majito y Vilma por preparar el material: sin ustedes esto no hubiera sido posible. A Jorge por las idas al centro y por cuidar los ratones con Silvio. A las secretarias Perla, Sandra y Cintia por simplificar los papeles de cada día.

A mamá y papá porque me dieron todo lo que soy. Gracias por cuidarme, malcriarme, respetarme y apoyarme a la hora de tomar mis decisiones. A Ato, Maia, Pali y las nenas por valorarme y festejar cada logro mío como si fuera el “nobel”. A Koka por ser un personaje sin igual. Y por último a Pablo mi amor, gracias por contenerme, cuidarme, quererme. Gracias por la paciencia, por acompañarme en las buenas y las no tan buenas. Gracias por la familia que formamos y por los proyectos que nos ilusionan y nos hacen seguir adelante. Gracias por Delfi esa bebida preciosa que es nuestra alegría y todo nuestro amor. A todos ustedes les dedico esta Tesis que tanto esfuerzo costó.

Paz, Agosto de 2006.

---

<b>Indice</b>	I
<b>Resumen</b>	VI
<b>Abstract</b>	VIII
<b>INTRODUCCIÓN</b>	1
1. Historia de la Tuberculosis	1
2. Patogenicidad de las Micobacterias	4
3. Mecanismos infección y de defensa del huésped	5
4. Virulencia	8
4.1 Modelos para estudiar virulencia en <i>M. tuberculosis</i>	8
4.2 Genética y virulencia de las Micobacterias	9
4.3 Identificación de factores de virulencia	11
4.3.1 Mutagénesis por transposición	11
4.3.2 TraSH: <i>Transposon site hybridization</i>	11
4.3.3 Mutagénesis por reemplazo alélico	13
4.3.4 STM <i>signature tag mutagenesis</i>	14
4.3.5 Complementación de cepas atenuadas	15
4.3.6 Genes reporteros	16
4.3.7 Bibliotecas sustractivas	16
4.3.8 Microarreglos	17
4.3.9 Proteómica	17
4.3.10 Secuenciación	18
5. El genoma de <i>M. tuberculosis</i>	18
5.1 Metabolismo general, regulación y resistencia a drogas	21
5.2 Familias multigénicas PE y PPE	22
6. Factores de virulencia	22
6.1 Proteínas secretadas o exportadas y componentes de pared	23
6.2 Captación de metales	24
6.3 Regulación a nivel de la transcripción	25
6.3.1 Factores sigma	26
6.3.2 Sistemas de dos componentes	26
6.3.3 Otros reguladores transcripcionales	28

---

7. Operones <i>mce</i>	28
7.1 Secuencia y organización de los operones <i>mce</i>	29
7.2 Rol en la virulencia de los operones <i>mce</i>	33
7.3 Expresión y Regulación de los operones <i>mce</i>	35
<b>OBJETIVOS</b>	37
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	38
1. Cepas Bacterianas y medios de cultivo	38
2. Preparación de células competentes y transformación	38
2.1. <i>E.coli</i>	38
2.1.1 Transformación	38
2.2. Micobacterias	39
2.2.1 Transformación	39
3. Metodologías de ADN recombinante	39
3.1 Minipreparaciones de ADN	39
3.2 Ligaciones	40
3.3 Digestión con enzimas de restricción	40
3.4 Electroforesis en geles de azarosa	40
4. PCR	41
5. Clonado y expresión de <i>Rv1963 (mce3R)</i> en micobacterias	43
6. Clonado y expresión de <i>Rv1963 (mce3R)</i> en <i>E. coli</i>	43
6.1 Purificación de la proteína recombinante	43
7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida	44
7.1. Tinción con Azul de <i>Coomasie</i>	44
7.2. Identificación de proteínas mediante Western-blot	44
7.2.1 Electrotransferencia	44
7.2.2 Detección inmunológica de las proteínas	45
8. Construcción de las fusiones a <i>lacZ</i>	45
8.1 Fusiones transcripcionales en el vector replicativo pJEM15	45
8.2 Mapeo del promotor	46
8.3 Construcción del vector integrativo pYUB178- <i>gal</i>	46
8.4 Fusiones en el vector pYUB178- <i>gal</i>	47

9. Mutagénesis dirigida por PCR	48
10. Condiciones de stress	49
11. Infección de macrófagos	50
12. Actividad de $\beta$ -galactosidasa <i>in vitro</i>	50
13. Extracción ADN de micobacterias	50
14. Extracción de ARN de micobacterias	51
15. Digestión con DeoxiribonucleasaI (DNasaI)	51
16. QRT-PCR	51
17. <i>Primer extensión</i>	53
18. <i>Gel shift</i>	53
19. <i>Footprinting</i>	54
20. Secuenciación	54
21. Obtención de una cepa mutante en el gen <i>Rv1963c</i> ( $\Delta mce3R$ )	55
22. Construcción de la cepa $\Delta mce3R$ complementante	56
23. <i>Southern blot</i>	57
23.1 Marcado de la sonda e Hibridación	57
24. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta mce3R$	58
24.1 Inoculación de ratones	58
24.2 Curvas <i>in vitro</i>	58
24.3 Infección de macrófagos	58
25. Análisis bioinformática	59
<b>RESULTADOS</b>	<b>60</b>
<b>Primera parte</b>	<b>60</b>
1. Caracterización de un posible gen regulador del operón <i>mce3</i>	60
1.1 Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de Mce3R	60
1.2 Caracterización de la función de <i>Rv1963c</i> en la transcripción del operón <i>mce3</i>	63
1.2.1 Estudios del rol de <i>Rv1963c</i> en la transcripción del operón <i>mce3</i> en <i>M. tuberculosis</i> H37Rv mediante el uso de un gen reportero en un vector replicativo	63
1.2.2 Estudio del rol de Mce3R en la transcripción del operón <i>mce3</i> evaluado en la cepa heteróloga <i>M. smegmatis</i>	64
1.2.3 Estudios de regulación en <i>M. smegmatis</i> utilizando un vector integrativo	66

---

2. Análisis de la región intergénica P3	67
2.1 Mapeo del promotor del operón <i>mce3</i>	67
2.1.1 Fusiones transcripcionales a $\beta$ - galactosidasa de diferentes deleciones de la región P3 en el vector replicativo pJEM15	67
2.1.2 Identificación del sitio de inicio de la transcripción.	69
2.1.3 Análisis <i>in silico</i> de la región promotora del operón <i>mce3</i>	70
2.2 Unión de Mce3R a la región promotora del operón <i>mce3</i> P3-200	72
2.2.1 Expresión y purificación de Mce3R en <i>E. coli</i>	72
2.2.2 Estudio de la interacción de Mce3R con la región P3-200 mediante geles de retardo	73
2.2.3 Identificación del motivo <i>tet</i> de <i>M. tuberculosis</i> en P3-200	74
2.2.4 Estudio de la interacción de Mce3R con la región P3-200 mediante ensayos de fusión a $\beta$ - galactosidasa	76
2.2.5 Mapeo del sitio de unión de Mce3R a la región por promotora mediante la técnica de <i>Footprinting</i> .	78
2.2.6 Evaluación de la interacción de Mce3R con la región identificada en los experimentos de <i>Footprinting</i>	80
2.3 Análisis de la región promotora de <i>mce3R</i>	81
2. 3.1 Análisis <i>in silico</i>	81
2.3.2 Estudio del rol de Mce3R en la regulación de su propia transcripción evaluado en la cepa heteróloga <i>M. smegmatis</i>	83
3. Expresión de los operones <i>mce</i> en <i>M. tuberculosis</i>	85
3.1 Análisis de la expresión del operón <i>mce3</i> en <i>M. tuberculosis</i>	85
3.1.1 Estudios de la actividad promotora de P3 por fusión a $\beta$ -galactosidasa	85
3.1.2 Estudios de la expresión del operón <i>mce3</i> por RT- PCR cuantitativa	86
3.1.3 Estudios de la expresión del operón <i>mce3</i> en condiciones de estrés	88
3.1.4 Estudio de la expresión del operón <i>mce3 ex vivo</i> en un modelo de infección de macrófagos murinos	90
3.2 Análisis de la expresión de los operones <i>mce</i> en <i>M. tuberculosis</i>	91
3.2.1 Estudios de regulación por fusión a $\beta$ - galactosidasa de los promotores P1, P2 y P4	91

4. Regulación de los operones <i>mce</i>	93
4.1 Evaluación del rol de Mce3R en la transcripción de los operones <i>mce1</i> , <i>mce2</i> y <i>mce4</i>	93
4.1.1 Estudios de regulación por fusión a $\beta$ - galactosidasa	93
4.1.2 Estudios de expresión de los operones <i>mce</i> por RT- PCR cuantitativa	95
4.1.3 Análisis de las regiones intergénicas de los operones <i>mce1</i> , 2 y 4	97
5. Identificación de otros posibles genes blanco regulados por Mce3R	98
5.1 Análisis <i>in silico</i> mediante el uso de los servidores Tuberculist y PredictRegulon	98
<b>Segunda parte</b>	<b>102</b>
6. Construcción de la cepa mutante $\Delta mce3R$	102
6.1 Obtención de una cepa mutante en el gen <i>mce3R</i> por reemplazo alélico	102
6.2 Confirmación del genotipo de la cepa $\Delta mce3R$	103
6.3 Obtención de la cepa $\Delta mce3R$ Complementante	106
6.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta mce3R$	106
6.4.1 Evaluación del crecimiento en cultivo <i>in vitro</i>	106
6.4.2 Evaluación del crecimiento durante la infección en un modelo animal de ratón	107
6.4.3 Evaluación del crecimiento <i>ex vivo</i> en un modelo de infección de la línea de macrófagos murinos J774	109
DISCUSIÓN	110
1. Mce3R pertenece a la familia de reguladores transcripcionales TetR	110
2. Mce3R regula la transcripción del operón <i>mce3</i>	113
3. Caracterización de la región 5' no codificante del operón <i>mce3</i> : mapeo del promotor e identificación del operador <i>tetO'</i>	116
4. Modelo propuesto de regulación del operón <i>mce3</i> por Mce3R	118
5. Expresión de los operones <i>mce</i> .	121
6. Regulación de los operones <i>mce</i>	123
7. Identificación del regulón de Mce3R	125
8. Obtención de un sistema inducible y su aplicación biotecnológica	127
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	131



La Tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más antiguas y a pesar de la existencia de una vacuna Bacille Calmette-Guérin (BCG) y de un tratamiento con antibióticos, un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la TB. Aproximadamente ocho millones de nuevos casos son diagnosticados anualmente y la tasa de mortalidad es de dos millones por año (World Health Organization, 2002).

A partir del análisis de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis*, se identificaron cuatro regiones genómicas homólogas denominadas operones *mce* (por *mammalian cell entry*) 1, 2, 3 y 4 (Cole *et al.*, 1998). Codifican para ocho proteínas secretadas o de membrana, similares en secuencia y organización y con una alta homología entre ellos. La proteína con características de invasina descrita por Riley y colaboradores es la denominada Mce1A (Arruda *et al.*, 1993). Hacia el extremo 5' de la unidad transcripcional, se encuentran los dos genes *yrbE* A y B que codifican para proteínas integrales de membrana. Los seis genes siguientes de cada operón (*mceA-F*), están relacionados y poseen motivos conservados y una organización común. Estos operones se encuentran ampliamente distribuidos en el género y su presencia fue demostrada en especies micobacterianas no tuberculosas MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis*), incluyendo *M. avium* y *M. smegmatis* (Haile *et al.* 2002). La presencia de los operones *mce* en *M. smegmatis* una cepa saprofítica, parecería indicar que la presencia o ausencia no se correlaciona con patogenicidad, pero una diferencia en los perfiles de expresión sí podría tener importancia en las micobacterias patógenas. Por otro lado, cuando se bloquea la expresión de algunos genes *mce* en *M. tuberculosis*, el bacilo pierde capacidad de multiplicar y persistir *in vivo* con una disminución en las UFC en bazo y pulmón de ratón (Gioffré *et al.*, 2005). Kumar y colaboradores (2003) demostraron que la expresión de los operones *mce* varía espacial y temporalmente. La presencia de genes reguladores en las cercanías de tres de los cuatro operones *Rv0165c* del operón *mce1*, *Rv0586* del operón *mce2* y *Rv1963c* del operón *mce3*, indicaría que existe un mecanismo que controla el nivel de expresión de los genes *mce* y que el mismo podría ser la clave que determina la asociación de los operones *mce* con la virulencia de las micobacterias patógenas. Adyacente a los genes *Rv1964- Rv1971*, que conforman el operón *mce3*, y en sentido contrario al de la transcripción se encuentra *Rv1963c* (Mce3R) que codifica para un putativo regulador transcripcional de la familia TetR. Ya que los reguladores transcripcionales suelen regular la expresión de genes cercanos, fue de interés en este trabajo estudiar el rol de dicho gen en la regulación de la

expresión del operón *mce3*. Los experimentos de geles de retardo realizados con diferentes sondas evidenciaron una unión específica de la proteína que codifica Rv1963c (Mce3R) al promotor del operón *mce3*, P3-200. Más consistentemente, los ensayos de regulación utilizando el gen *lacZ* como reportero en las cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis*, mostraron que la actividad promotora de P3 es mucho menor en presencia de la proteína Mce3R que en ausencia de la misma. Y por último, la eliminación de *mce3R* en *M. tuberculosis* ( $\Delta mce3R$ ), resultó en un incremento significativo en el nivel de mRNA del operón *mce3*. Por lo tanto es posible concluir que Mce3R regula negativamente la transcripción del operón *mce3* por unión a la región promotora. Dicha región fue definida dentro de las 206pb (P3-200) ubicadas río arriba del codón de iniciación del gen *Rv1964* mediante deleciones de la región intergénica y determinación de la actividad promotora por fusión a  $\beta$ -galactosidasa. En la misma región P3-200 se identificó mediante geles de retardo, *footprinting*, mutagénesis dirigida y el uso del gen reportero la región operadora *tetO'* a la que se une Mce3R y se definió el consenso *tet* al que se une en *M. tuberculosis*. A partir del mismo fue posible predecir otros genes putativos blancos de Mce3R y proponer una posible función para los genes *mce*.

El alto grado de conservación entre los genes *mce* plantea la posibilidad de que Mce3R actúe regulando la expresión de los operones *mce1*, 2 y 4. En este trabajo se determinó mediante la utilización de un reportero y QRT-PCR que Mce3R no regula los otros operones en las condiciones estudiadas. Por otro lado la mutante obtenida en el gen *mce3R* ( $\Delta mce3R$ ) abre el camino hacia la exploración de este sistema de regulación mediante el empleo de tecnologías de genómica funcional. Finalmente, se ha estudiado y caracterizado un sistema de expresión inducible que podrá ser usado como herramienta en el estudio de regulación y función de genes y la obtención de mutantes condicionales.

Palabras clave: *M. tuberculosis*, *mce*, *tetR*, regulación, virulencia

Tuberculosis (TB) is one of the most antiquated infectious diseases and despite the availability of effective short-course chemotherapy (DOTS) and the Bacille Calmette-Guérin (BCG) vaccine, one third of the world population is infected with *Mycobacterium tuberculosis* the etiological agent of TB. At the present time, the World Health Organization (WHO) estimates that eight million new cases of tuberculosis occur every year and the death rate due to this disease is about two million people every year (WHO, 2002).

From the complete genome sequence of *Mycobacterium tuberculosis* Cole *et al.* (1998) identified four genomic regions called *mce* (for *mammalian cell entry*) 1, 2, 3 y 4. They encode secreted or exported proteins. The ORFs within the region are organized as a putative operon, and they are similar in its sequence and organization. Mce1A is highly homologous to the invasins-like proteins described by Riley and colleagues (Arruda *et al.* 1993). The first two genes *yrbA* and *B* encoded for integral membrane proteins. The six *mceA-F* are highly related and have conserved motifs and a common organization. These operons are broadly distributed in the genera and their presence was demonstrated in MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis*), including *M. avium* and *M. smegmatis* (Haile *et al.* 2002). Even though the presence of *mce* operons in *Mycobacterium smegmatis*, which is a saprophytic species, suggests that the presence or absence of *mce* operons does not correlate with pathogenicity. It is possible that its expression profile plays a key role in the virulence of pathogenic mycobacteria. On the other hand, mutation in the *mce* genes affected the *in vivo* growth of *M. tuberculosis* as assessed by reduction of colony-forming units in the lungs and spleen of mice (Gioffré *et al.*, 2005).

It was demonstrated that there is a temporal and growth phase specific difference in expression of *mce* operons (Kumar *et al* 2003). The presence of regulatory genes in the vicinity of three of the four *mce* operons: *Rv0165c* upstream of *mce1*, *Rv0586* of *mce2* and *Rv1963c* of *mce3* suggests the presence of regulatory mechanisms that controls the level of expression of the *mce* genes and that this could be the key in the association of *mce* operons with virulence in pathogenic mycobacteria. The gene *Rv1963c* located upstream and divergently transcribed from the *Rv1964- Rv1971* genes which are part of *mce3* operon is predicted to encode a TetR family transcriptional regulator (TubercuList). Since prokaryotic regulators are frequently located adjacent to genes under their control, we hypothesized that this gene encoded a regulator of the *mce3* operon (designated *mce3R*). In order to investigate the role of Mce3R in the regulation

of the *mce3* operon, the Mce3R protein was examined for its ability to bind to the *mce3* promoter (P3-200) region by performing a gel-shift assay. Furthermore, using *lacZ* as a reporter we found that *b*-Galactosidase activity was much lower in *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 or *M. tuberculosis* in the presence of Mce3R (P3-*mce3*R) than in its absence (P3). Finally, disruption of *mce3R* ( $\Delta$ *mce3R*) resulted in upregulation of *mce3* genes in the *mce3R* mutant vs wild-type *M. tuberculosis* and H37Rv strain assessed by RT-qPCR. These data confirm that Mce3R negatively regulates *mce3* operon by binding to the P3-200 promoter region. In the same region, we identified the *tetO*' motif recognized by Mce3R performing different methodologies: gel shift, footprinting, directed mutagenesis and  $\beta$ -galactosidase assays. We also predicted with bioinformatics tools other targets of Mce3R and we suggested a putative function for the *mce* genes. The high conservation among *mce* genes prompted us to evaluate the role of Mce3R in the regulation of the four *mce* operons. Performing  $\beta$ -galactosidase assays and RT-qPCR we demonstrated that Mce3R do not regulate *mce1*, 2 and 4 operons. The generation of a mutant strain  $\Delta$ *mce3R* will be useful for future research evaluating this regulatory mechanism using functional genomic tools. We report the development of a mycobacterial gene regulation system that allows controlling gene expression that can be used to construct conditional knockouts and to analyze the function of essential mycobacterial genes.

Key words: *M. tuberculosis*, *mce*, *tetR*, regulation, virulence.

## 1. Historia de la Tuberculosis

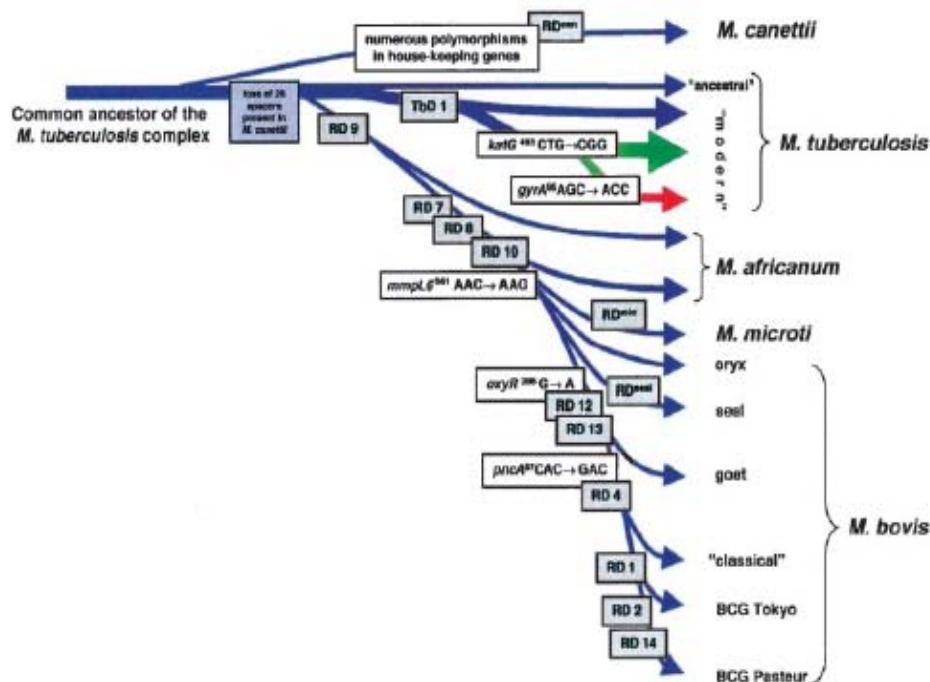
La Tuberculosis (TB) es una de las enfermedades infecciosas más antiguas y a pesar de la existencia de una vacuna y de un tratamiento con antibióticos, sigue provocando numerosas muertes en todo el mundo. En Europa la tuberculosis pulmonar fue la mayor causa de muerte entre los siglos XVIII y XIX. Durante la Revolución Industrial, su expansión se vio favorecida por las pobres condiciones sanitarias y habitacionales, la superpoblación y la malnutrición. A medida que la calidad de vida fue mejorando, la TB fue cediendo, pero en cambio su importancia fue aumentando en los países en desarrollo. Esto también se debió en parte al desplazamiento de las poblaciones y a la urbanización. En el siglo XX una mejora en los planes de salud pública, el uso de BCG como vacuna y el desarrollo de antibióticos, ayudaron a una disminución en la incidencia de TB. Más recientemente el VIH y el SIDA exacerbaron la situación, ya que el efecto sinérgico de ambas enfermedades aumentó significativamente la morbilidad y la mortalidad de la TB. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha estimado que un tercio de la población mundial está infectada con *Mycobacterium tuberculosis*, el agente etiológico de la TB, con aproximadamente ocho millones de nuevos casos diagnosticados por año (World Health Organization, 2002). En el mundo subdesarrollado cerca de dos millones de personas mueren por año. La pobreza, las malas condiciones de vida y la falta de atención médica adecuada contribuyen a esta situación.

En 1882 Robert Koch aisló *M. tuberculosis* por primera vez, y demostró que esta bacteria de crecimiento lento era el agente causal de la enfermedad en humanos (Koch, 1882). *M. tuberculosis* junto con otras bacterias altamente relacionadas forma el *M. tuberculosis complex*. Se caracterizan por tener una similitud en la secuencia nucleotídica de un 99,9%, pero difieren ampliamente en patogenicidad y preferencia de huésped. Unos son patógenos exclusivos de humanos: *M. tuberculosis*, *Mycobacterium africanum* (infecta humanos en África), *Mycobacterium leprae* (causa lepra en humanos) y *Mycobacterium canettii*. Otros de roedores: *Mycobacterium microti*. *Mycobacterium bovis*, infecta principalmente el ganado bovino, pero es capaz de infectar una gran variedad de mamíferos, incluyendo el hombre y *Mycobacterium avium* sp *paratuberculosis* causa paratuberculosis o la enfermedad de Johne's en rumiantes. BCG es una cepa atenuada, obtenida en el laboratorio por Calmette y Guérin a partir de una cepa virulenta de *M. bovis* (Calmette, 1929). A través de sucesivos pasajes *M. bovis*

fue perdiendo progresivamente su virulencia, y resultó ser inocua y protectora en niños. Desde 1921 es usada como vacuna viva contra la TB, y aunque es efectiva en las tuberculosis infantiles, lamentablemente no protege contra las formas pulmonares de la enfermedad en adultos. *M. microti*, naturalmente atenuada para el hombre, fue también usada satisfactoriamente para proteger contra TB. (Hart & Sutherland, 1977).

El origen de *M. tuberculosis* es muy antiguo. Se cree que las bacterias del género *Mycobacterium*, como otros actinomicetes, derivan de un ancestro común de vida libre que se encontraba en el suelo y en el agua. Posiblemente durante la especiación, los miembros del *complex* sufrieron un cuello de botella, ocurrido hace 15000- 20000 años atrás (Sreevatsan, *et al.* 1997). También se especulaba con que la TB en los humanos surgió como consecuencia de la domesticación del ganado bovino (Stead, *et al.* 1995), consecuentemente siendo *M. bovis* antecesor de *M. tuberculosis*. Ambas hipótesis fueron planteadas antes de la anotación del genoma de *M. tuberculosis*, y de que la genómica comparativa identificara regiones variables entre los miembros del *complex*. Brosch y colaboradores, analizando 20 regiones de diferencia (denominadas RD seguidas de un número) en más de 100 cepas, identificaron deleciones en el genoma de *M. bovis* con respecto a *M. tuberculosis* lo que indica que el genoma de este último es mayor (Brosch, *et al.* 2002). Encontraron evidencias de que la deleción de ciertas regiones genómicas variables no ocurrió de manera independiente en las diferentes cepas del *complex*, lo que les permitió plantear un nuevo escenario para la evolución de *M. tuberculosis complex* y el origen de la TB humana (**Figura 1**). Parecería que *M. bovis* (RD4, RD5, RD7, RD8, RD9, RD10, RD12, RD13) es el último representante de un linaje junto con *M. africanum* (RD9), *M. microti* (RD7, RD8, RD9, RD10) que divergió del progenitor de *M. tuberculosis* antes de que ocurriera una deleción específica de tuberculosis TbD1 (Brosch, *et al.* 1999; 2002). Este estudio permitió identificar cepas más antiguas en términos evolutivos como *M. canettii*, *M. tuberculosis* y *M. africanum*, y cepas de *M. tuberculosis* más modernas como las responsables de las últimas epidemias Beijing, Haarlem y Africa, y rechaza la hipótesis del origen de *M. tuberculosis* a partir de *M. bovis*. *M. canettii* y las cepas ancestrales de *M. tuberculosis* parecerían ser descendientes directos del bacilo patógeno del hombre existente antes de separarse el linaje *M. africanum* → *M. bovis* del linaje de *M. tuberculosis*.

Figura 1



Brosch *et al.* (2002). Esquema representando el camino evolutivo propuesto para el bacilo de la tuberculosis, ilustrando las sucesivas pérdidas de ADN (RD1- 14). Se basa en la presencia o ausencia de estas regiones conservadas y en el polimorfismo en la secuencia de cinco genes seleccionados (*katG*, *gyrA*, *oxyR*, *pncA*, *mmpL6*).

Otros estudios de genómica comparativa revelaron que las deleciones identificadas entre los miembros del *M. tuberculosis* complex caen en dos grandes grupos: antiguas y recientes. Las primeras ocurrieron en diferentes etapas durante la especiación y están ampliamente distribuidas, mientras que las recientes tienen una distribución más restringida (Cole, 2002). Un ejemplo de estas últimas es la llamada RvD2 en *M. tuberculosis* H37Rv, un locus de 7kb que contiene una secuencia de inserción IS6110 aún presente en la cepa relacionada avirulenta H37Ra (Brosch *et al.* 1999). RvD2 también presenta variabilidad entre distintos aislamientos de H37Rv, lo que indica que podría tratarse de un punto caliente de traslocación de IS6110. Otro ejemplo es la región de diferencia RD2 que contiene el antígeno MPB64, ausente en algunas cepas de *M. bovis* BCG. Las regiones RD7, RD8, RD9 y RD10, ausentes en *M. microti* y en *M. bovis* BCG, pero aún presentes en *M. tuberculosis*, pertenecen al grupo de las antiguas y parecerían haber ocurrido anteriormente en términos evolutivos.

## 2. Patogenicidad de las Micobacterias

Muchas especies de micobacterias son bacterias ambientales de vida libre, y raramente o nunca causan enfermedad. Algunas otras como *M. avium*, pueden causar enfermedad cuando infectan individuos inmuno - comprometidos. Sólo un pequeño número de especies de crecimiento lento son patógenos obligados. Los más importantes son los miembros del *M. tuberculosis complex*, los más dañinos dentro de la familia *Mycobacteriaceae*. Todas ellas son especies estrechamente relacionadas, y han evolucionado hacia diferente especificidad de huésped. La pérdida sucesiva de ADN podría haber contribuido a la expansión clonal y al establecimiento de nuevas interacciones exitosas patógeno- hospedador. Esta variación sugiere una diferencia en los factores de virulencia de los distintos miembros del *complex* y junto a la existencia de distintos receptores por parte del hospedador, hacen a una variación en la susceptibilidad.

No todos los individuos infectados desarrollan la enfermedad. Muchos de ellos no presentan síntomas y tienen un riesgo entre un 5 y 10 % de desarrollar una TB activa a lo largo de sus vidas, generalmente por inmunosupresión causada por estrés, quimioterapia, otras enfermedades o edad avanzada. En humanos adultos, en ausencia de tratamiento, la enfermedad es crónica con intervalos de enfermedad, mejoría y recaída. Esto demuestra que en la mayoría de los casos son capaces de controlar la infección. El tratamiento con antibióticos es efectivo, pero es de larga duración ingiriendo numerosas drogas, lo que muchas veces lleva al abandono del mismo, favoreciendo la aparición de cepas multiresistentes (MDR) a las drogas utilizadas comúnmente, principalmente isoniazida y rifampicina. Esto complica el control y aumenta considerablemente su costo, haciendo necesario el diseño de nuevos agentes anti micobacterianos que sean efectivos contra estas cepas. Individuos clínicamente curados pueden desarrollar la enfermedad muchos años después por la reactivación de bacilos en dormición. Esto indica que *M. tuberculosis* posee mecanismos que le permiten sobrevivir en el huésped durante años sin inducir ningún síntoma de enfermedad.

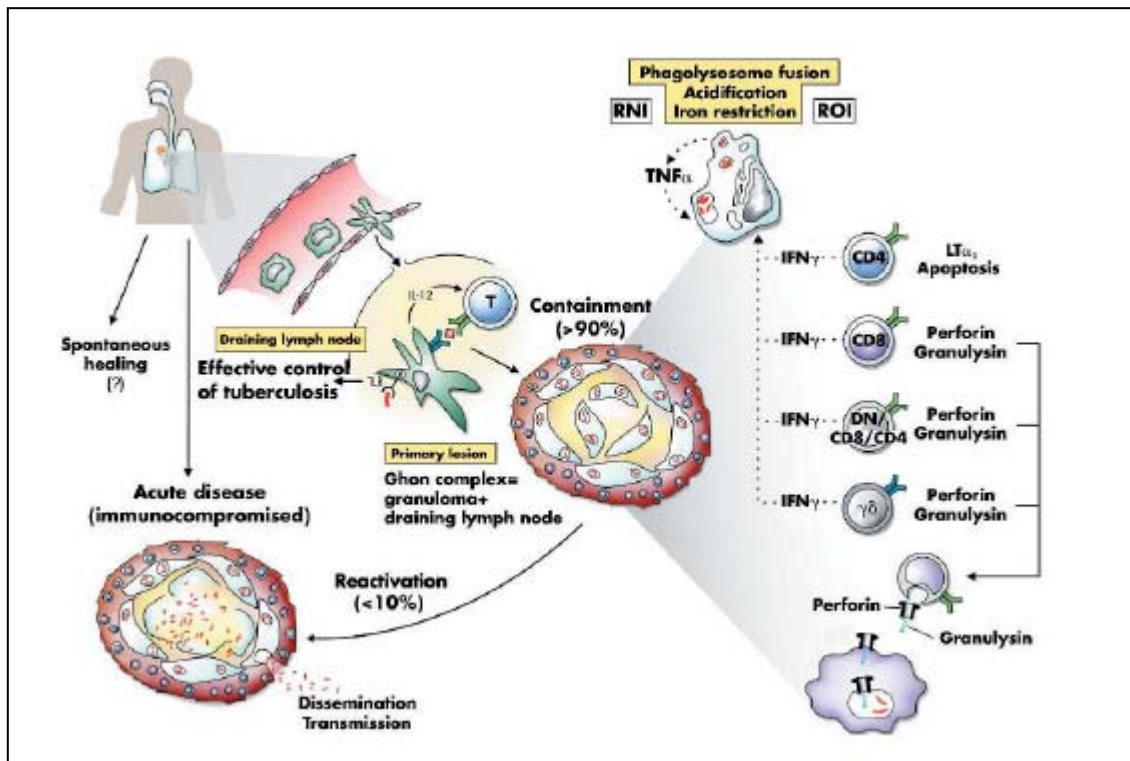
Para aquellos individuos infectados con VIH y *M. tuberculosis*, la probabilidad de desarrollar enfermedad es mayor (alrededor de un 10% por año). El efecto sinérgico de las dos enfermedades tiene una alta implicancia socioeconómica, y la combinación del virus del SIDA con cepas MDR de tuberculosis resulta fatal.



### 3. Mecanismos infección y de defensa del huésped

*M. tuberculosis* es transmitido por la inhalación de pequeñas gotas que contienen bacilos (**Figura 2**) los que penetran los alvéolos del tracto respiratorio y son fagocitados por las células dendríticas y los macrófagos allí presentes que los contienen en fagosomas. Los macrófagos alveolares poseen receptores que pueden ser utilizados, junto con opsoninas para la entrada del bacilo. Si los macrófagos están activados, el fagosoma se une al lisosoma, y las bacterias son destruidas. Las células dendríticas migran hacia los nódulos linfáticos y activan células T que reconocen el foco de infección en el pulmón. Si los macrófagos no están activados el bacilo sobrevive, se multiplica dentro del fagosoma, este no se acidifica y altera de alguna manera los compartimentos intracelulares, por lo que impide la fusión con lisosomas o la correcta maduración del fagolisosoma. El fagolisosoma es un ambiente hostil donde muchos patógenos son destruidos por enzimas lisosomales activas a pH ácido, radicales del oxígeno y metabolitos del nitrógeno.

Figura 2

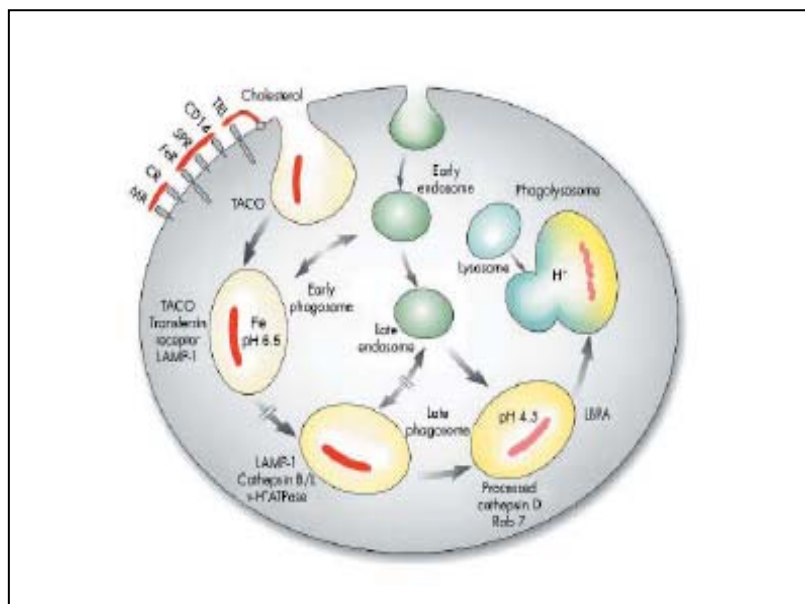


Kaufmann, (2004). Gráfico representando la infección, el curso de la enfermedad y los mecanismos de defensa del huésped. IFN: interferón, IL: interleukina, LT: linfoxina, RN/ OI: reactivos del nitrógeno e intermediarios del oxígeno, TNF: factor de necrosis tumoral, TLR: receptores tipo "toll".

Interrumpiendo la maduración del fagosoma mediante la neutralización del pH en un estadio de fagosoma temprano, *M. tuberculosis* puede sobrevivir y multiplicarse (Figura 3). Debido a la carga bacteriana el macrófago se lisa liberando las micobacterias al tejido circundante, donde son fagocitadas por otros macrófagos tisulares. Si estos macrófagos estaban activados las bacterias mueren o de lo contrario continúan multiplicándose e infectando nuevos macrófagos. En determinado momento de este ciclo, los humanos inmunocompetentes, generan una respuesta inmune efectiva en un 90- 95 % de los casos (Danenberg *et. al.* 1994; Kaufmann 2004). Como el control de la infección no es completo y los patógenos no son erradicados, el riesgo de una reactivación de la enfermedad permanece, incluso hasta luego de décadas de ocurrida la infección. Si el balance entre la respuesta inmune del huésped y las bacterias persistentes se inclina hacia el patógeno, entonces se desencadena una TB activa.

Al principio la respuesta inflamatoria no es específica (respuesta inmune innata), destruye tanto los macrófagos infectados como las células de tejido circundante. La lisis de dichos macrófagos resulta en una presentación antigénica al sistema inmune, generando una respuesta específica tanto humoral como celular. La respuesta de anticuerpos no es protectora, mientras que la respuesta celular de tipo Th1 con la liberación de  $\text{IFN}\gamma$  e  $\text{IL12}$ , juega un rol preponderante (Andersen 1997). Las células T-CD4 tienen un papel principal en el reconocimiento de los antígenos presentados por el Complejo Mayor de Histocompatibilidad clase II (MHC II). La producción de  $\text{IFN}\gamma$  durante la respuesta Th1 y de  $\text{TNF}\alpha$ , lleva a la activación de macrófagos. Los linfocitos T-CD8 también participan en la inmunidad protectora reconociendo al MHC I, y junto con las células T no convencionales  $\gamma\delta$  y CD1, que estarían involucradas mediante el reconocimiento de componentes de la pared micobacteriana, secretan perforina y granulinsina, que directamente mata las micobacterias dentro del macrófago (Kaufmann, 2002, 2004).

**Figura 3**



Kaufmann, (2004). Representación esquemática de los procesos intracelulares que tienen lugar luego de la fagocitosis de *M. tuberculosis* por el macrófago. MR: receptor de manosa, LAMP-1: proteína de membrana asociada al lisosoma, LBPA: ácido lisobifosfatídico, SPR: proteína receptora surfactante, TACO: proteína que contiene triptofano y aspartato, TLR: receptores tipo "tol".

Los macrófagos liberan moléculas quimiotractivas que atraen neutrófilos, linfocitos y monocitos. Esto resulta en la formación del granuloma. En los individuos incapaces de controlar la infección, la enfermedad progresa. Los macrófagos alveolares no son capaces de detener la replicación de *M. tuberculosis* y son matados por el bacilo. Esto lleva a la formación de una región caseosa dentro del granuloma. Posteriormente los bacilos pueden ser diseminados a través de la sangre hacia otras partes del cuerpo y continuar el ciclo en otros tejidos. La diseminación a otros órganos además de pulmón, es más frecuente en las TB pediátricas (Collins & Gicquel, 2000).

Los factores de *M. tuberculosis* responsables de la unión a opsoninas y receptores del macrófago, los responsables de bloquear la fusión fagosoma- lisosoma o los que inhiben la presentación de antígenos por el macrófago aún no se conocen. Durante la infección el bacilo debe ser capaz de sobrevivir a variaciones ambientales como cambios de temperatura, bajas concentraciones de oxígeno, diferente disponibilidad de nutrientes y condiciones hostiles dentro del macrófago, debido a la presencia de hidrolasas, intermediarios del oxígeno y condiciones anaeróbicas.

#### **4. Virulencia**

##### **4.1 Modelos para estudiar la virulencia de *M. tuberculosis***

La virulencia de *M. tuberculosis* es estudiada tanto en cultivos celulares como en modelos animales. Los cultivos celulares son más fáciles para trabajar y dan resultados más rápido, pero están limitados a los primeros estadios de la infección. Por lo que los modelos animales resultan mejor para estudiar todos los estadios. Entre los más usados están el ratón, el cobayo y el conejo. Cada uno tiene sus ventajas y desventajas.

El ratón es el más utilizado ya que se conoce su genética, hay reactivos disponibles para medir citoquinas y el costo de mantenimiento es bajo. Además existen cepas endocriadas con distinta susceptibilidad a la infección por *M. tuberculosis*, o con distintas mutaciones en genes involucrados en la respuesta inmune. El progreso de la enfermedad en ratón depende también de la vía de inoculación, y al no ser tan sensibles a la infección se vuelven crónicos. El cobayo es mucho más sensible, y la enfermedad se desarrolla de manera similar al humano. Lo mismo ocurre con el conejo, pero la desventaja de ambos es el alto costo de su mantenimiento.

En los modelos *ex vivo*, se usan cultivos primarios o líneas celulares inmortalizadas. Los macrófagos primarios se obtienen de médula ósea de ratón, de alvéolos pulmonares por lavados bronquiales o de exudados de las cavidades peritoneales. Pueden activarse con IFN $\gamma$  para la producción de óxido nítrico ON necesario para matar a los bacilos intracelulares. Son más representativos de lo que ocurre *in vivo* pero más difíciles de generar y más variables, por lo que las líneas celulares murinas son muy utilizadas como las J774 o las MH-S. También se utilizan macrófagos humanos derivados de monocitos de sangre periférica (MDM) que son más fáciles de obtener que los alveolares, o líneas inmortalizadas como la TH-1.

Sin embargo hay cierta resistencia en el uso de células para el estudio de la virulencia ya que hay cepas mutantes que no son atenuadas en cultivo *ex vivo* y si lo son en ratón (Smith, 2003).

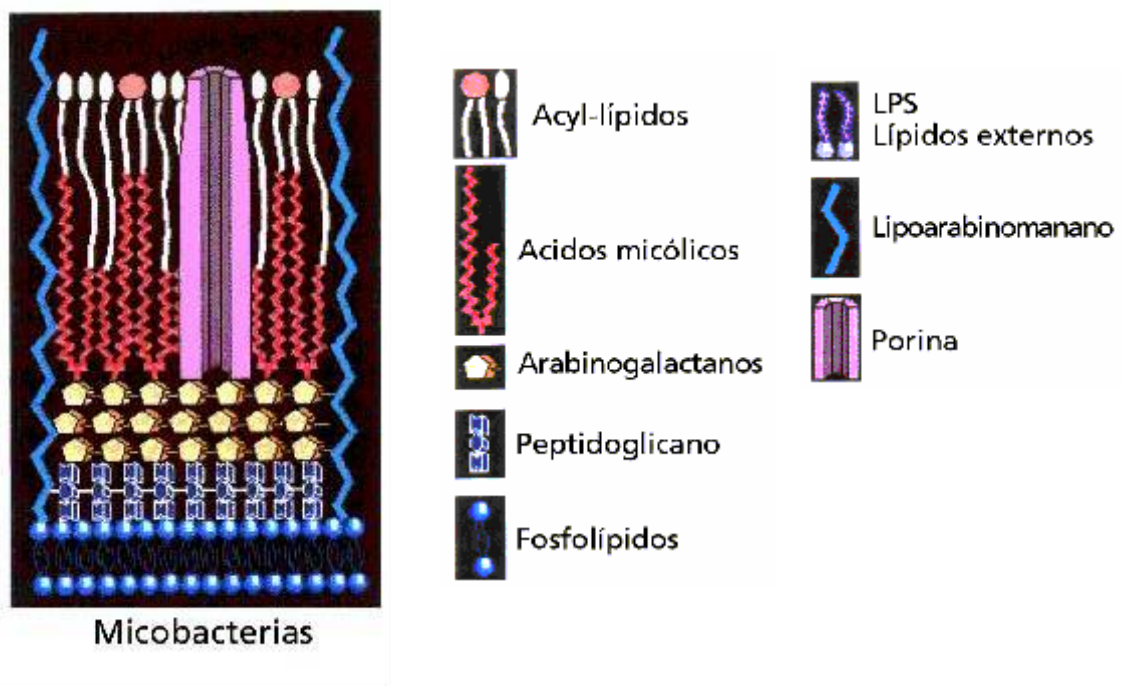
#### **4.2 Genética y virulencia de las Micobacterias**

A pesar del desarrollo de *tests* de diagnóstico, vacunas y antibióticos efectivos, las enfermedades causadas por micobacterias especialmente por *M. tuberculosis*, siguen siendo causa de sufrimiento y muerte en muchas partes del mundo. La TB es una enfermedad antigua, pero los mecanismos de patogénesis de los organismos que la provocan son pobremente conocidos. ¿Por qué causan enfermedad? ¿Por qué sobreviven en el huésped, generalmente durante años, antes del desarrollo de la enfermedad? ¿Cómo evaden los sistemas de defensa del huésped? Los determinantes o factores de virulencia de estos organismos son los responsables de su éxito como patógenos. En consecuencia, la identificación de los genes o factores del bacilo implicados en la virulencia y patogénesis se ha vuelto un tema prioritario en la investigación de la tuberculosis. Una vez identificados, podrán ser blancos de nuevas drogas o de mutaciones para el desarrollo de vacunas.

No hay una definición clara de factor de virulencia. Podría decirse de cualquier factor que tenga un rol importante en el proceso de infección. Y los genes de virulencia son los que codifican para dichos factores. Otros procesos como la síntesis de aminoácidos, son consideradas funciones “*housekeeping*”, aunque son generalmente esenciales para causar enfermedad y posiblemente su inactivación genere una cepa atenuada. Hasta hace poco sólo se especulaba sobre dichos factores, ya que la falta de técnicas de genética molecular para micobacterias dificultaba mucho su estudio. El tiempo

extremadamente largo de duplicación (20 horas), la ausencia de un fenotipo claro de asociación con virulencia, la dificultad de manipularlos genéticamente principalmente debido a la baja frecuencia de recombinación homóloga, baja eficiencia de transformación por plásmidos o ADN foráneo e inestabilidad cuando es introducido, son algunos de los factores que contribuyeron a un retraso en el entendimiento de los mecanismos de virulencia en estos microorganismos. Otra característica particular del bacilo, es su compleja pared celular compuesta principalmente por tres estructuras: la membrana citoplasmática, la pared celular que contiene peptidoglicano covalentemente unido a arabinogalactano (un polisacárido altamente ramificado), el que a su vez se une a ácidos micólicos, y una capa lipídica externa compuesta por numerosos lípidos complejos que forman una pseudo bicapa con los ácidos micólicos (Brennan & Nikaido, 1995). Si bien es considerada una bacteria Gram +, la compleja estructura de su pared posee características tanto de bacterias Gram + como Gram – y algunas otras que son propias y únicas de las micobacterias. Las vías metabólicas involucradas en la biosíntesis de los complejos compuestos de la pared podrían contribuir a la virulencia.

**Figura 4**



Esquema de representación de la pared micobacteriana. En las referencias se indica la composición de los distintos ácidos grasos. Se observan los ácidos micólicos, arabinogalactanos y lipoarabinomano propios de las Micobacterias

### 4.3 Identificación de factores de virulencia

En los últimos años, se han desarrollado técnicas que abrieron el campo de investigación en las micobacterias patógenas. Varios métodos de genética molecular han sido empleados para la identificación de factores de virulencia. Entre los clásicos podemos mencionar mutagénesis insercional, complementación de cepas atenuadas con genes de virulencia y análisis de genotecas diferenciales. O nuevos métodos más poderosos como *signature- tagged mutagenesis* (STM), *recombinase- based in vivo expresión technology* (RIVET), *transposon site hybridization* (TraSH), la secuenciación de los genomas y DNA *microarrays*.

La mutagénesis insercional abarca dos estrategias: mutagénesis global en la que un elemento móvil se inserta al azar en el genoma o sitio específica, en donde un único gen se interrumpe por reemplazo alélico.

#### 4.3.1 Mutagénesis por transposición

Entre las estrategias globales, la mutagénesis por transposición ha sido usada frecuentemente para la identificación de factores de virulencia (Pelacic *et al.* 1997; Rubin *et al.* 1999; Mc Adam *et al.* 2002). Los transposones micobacterianos más usados son: IS1096, IS6120, IS6100 y sus derivados. Mc. Adam y colaboradores, generaron una genoteca de mutantes de *M. tuberculosis* H37Rv por transposición de más de 10000 mutantes, con sólo 1300 sitios únicos de inserción y la interrupción de 351 genes (Mc. Adam *et al.* 2002). Debido a la baja frecuencia de recombinación, la baja eficiencia de transformación y a que la inserción de los transposones puede no ser completamente al azar, el número de mutantes independientes que se obtienen por experimento es muy bajo.

#### 4.3.2 TraSH: *Transposon site hybridization*

Esta metodología fue diseñada para analizar grandes *pooles* de mutantes por transposición (Sasseti *et al.* 2001). Permite una rápida caracterización funcional y la identificación del conjunto completo de genes requeridos en diferentes condiciones de crecimiento. Combina la mutagénesis insercional de alta densidad con la técnica de microarreglos. Los autores obtuvieron genotecas de mutantes mediante el uso de un

transposón “*mariner*” transducido por un bacteriofago que es capaz de introducirse en el genoma al azar, ya que sólo requiere la presencia del dinucleótido TA (Rubin *et al.* 1999; Sassetti *et al.* 2001, 2003). Con el objetivo de identificar genes esenciales para el crecimiento *in vitro* utilizaron TraSH. Mediante esta técnica identificaron genes involucrados en vías metabólicas y biosintéticas como síntesis de aminoácidos, ácidos nucleicos y cofactores. También genes que juegan un rol central en procesos celulares como replicación, transcripción, síntesis de proteínas y división celular. Muchos de los genes identificados no poseen aún una función definida, y algunos carecen de ortólogos en otras especies bacterianas (Sassetti *et al.* 2003). En otro trabajo Sassetti y colaboradores utilizaron la misma estrategia para identificar genes requeridos para sobrevivir durante la infección en un modelo de ratón. Obtuvieron 194 mutantes atenuadas, lo que representa un 5% del genoma. Genes involucrados en el metabolismo de lípidos, en el transporte o metabolismo de iones inorgánicos y carbohidratos están mayormente representados. Algunas de las funciones de los genes esenciales para el crecimiento *in vivo* no pudieron ser identificadas, lo que refleja la existencia de mecanismos de virulencia que son exclusivos de las micobacterias. Muchos de ellos pertenecen a familias de genes que surgieron por duplicación y luego adquirieron una función específica. Una de ellas es la familia *mce*, sobre la que hablaremos detalladamente más adelante, que ha sufrido cuatro duplicaciones de *mce1* a *mce4*. Los autores encontraron que dos de ellos son requeridos para el crecimiento *in vivo* y poseen una cinética diferente. La mutante en el operón *mce1* produce una disminución en el crecimiento entre las semanas 1 y 2 luego de la infección, recuperándose posteriormente. La mutante en el operón *mce4* muestra un lento y progresivo defecto en el crecimiento, detectado entre las semanas 2 y 4 post infección (Sassetti *et al.* 2003). Estos resultados sugieren que estos operones similares en secuencia y organización se especializaron para realizar distintas funciones y son requeridos a distintos tiempos durante la infección.

Otra familia identificada en este trabajo es la de *esat-6*. Dicho gen se encuentra localizado en el locus denominado RD1 el cual está ausente en la cepa atenuada BCG. RD1 consiste en 9 genes y casi todos ellos son requeridos durante la infección. La organización de los genes en una aparente unidad transcripcional y la similitud de los fenotipos de las mutantes en los distintos componentes del operón, sugiere que estarían llevando a cabo una función común, por ejemplo una misma ruta bioquímica o formando parte de una misma estructura. De hecho al menos dos de ellos están



involucrados en el transporte de ESAT-6 (Pym *et al.* 2003, Guinn *et al.* 2004). El genoma de *M. tuberculosis* contiene cinco copias imperfectas de la familia de *esat-6*, siendo otro ejemplo de genes que se especializaron en su función bajo diferentes condiciones. Esta especialización es crítica para la supervivencia de la bacteria en el entorno continuamente cambiante del huésped. Por último, la otra familia de genes específica de las micobacterias, codifica para un grupo de 167 proteínas con secuencias repetitivas llamadas PE y PPE. Según los autores, la mutación de sólo tres de ellas confiere un fenotipo atenuado durante el crecimiento *in vivo* (Sasseti *et al.* 2003).

### 4.3.3 Mutagénesis por reemplazo alélico

Hasta hace poco tiempo no era posible generar mutantes directas por recombinación homóloga en las micobacterias de crecimiento lento y por lo tanto, no se podían satisfacer los postulados moleculares de Koch, ya que requieren de la demostración de que la expresión de un determinado gen es necesaria para que un organismo sea completamente virulento. Para ello, la estrategia que generalmente se emplea es la de construir una cepa isogénica del organismo que difiere sólo en la expresión del gen candidato, interrumpido por reemplazo alélico. Idealmente la inactivación de un único gen lo vuelve avirulento (en un modelo animal adecuado), y la complementación con una copia del gen salvaje restaura la virulencia. La mutagénesis insercional es generalmente realizada por reemplazo alélico, mediante recombinación homóloga entre el alelo funcional salvaje y una copia inactivada por la inserción de un *cassette* de resistencia a antibióticos. Sin embargo en las micobacterias de crecimiento lento la inactivación por intercambio alélico es un procedimiento difícil de lograr, ya que a la baja eficiencia de transformación se suma una alta frecuencia de recombinación ilegítima. Inicialmente la disrupción de genes fue lograda utilizando grandes fragmentos lineales de ADN de hasta 40kb (Balasubramanian *et al.* 1996) o más pequeños de 4kb (Reyrat *et al.* 1995). Posteriormente Pelicic y colaboradores desarrollaron un sistema de doble selección que combina un vector replicativo, que se pierde eficientemente a 39° C por su origen de replicación termosensible, y el gen de contraselección *sacB* (Pelicic, *et al.* 1996, 1997). La expresión del gen *sacB* de *Bacillus subtilis* que codifica para la enzima levansucrasa, es letal para micobacterias en presencia de 10% o 2% sacarosa dependiendo de la cepa (Pelicic, *et al.*, 1996). En consecuencia el reemplazo de genes en *M. tuberculosis* ha sido logrado en muchos casos (Reyrat, *et al.*, 1996; Azad, *et al.*,

1997; Bange, *et al.*, 1996; Jackson, *et al.*, 1999). Los sistemas para la obtención de cepas mutantes por reemplazo alélico han sido optimizados. Parish & Stoker (2000) desarrollaron una nueva estrategia de dos pasos. Para este sistema se requiere un único clon que haya sufrido un simple evento de recombinación homóloga luego de la transformación. La inclusión de múltiples marcadores facilita la selección del segundo evento de recombinación homóloga. Emplea un plásmido suicida para el ingreso del alelo recombinante a la célula. El mismo lleva el gen *sacB* y el marcador *lacZ* que es útil para distinguir los clones simple recombinantes de las mutantes espontáneas resistentes al antibiótico de selección.

El desarrollo de micobacteriofagos que repliquen bajo determinadas condiciones, provee otra herramienta genética para generar mutantes por intercambio alélico. Los sistemas de *delivery* de micobacteriofagos están constituidos por un vector termosensible que replica como plásmido en *Escherichia coli* y como fagémido en las micobacterias. Estos sistemas no dependen de una buena eficiencia de transformación, y cada una de las células en un cultivo es potencialmente capaz de ser infectada, por lo que lo hace un sistema de mutagénesis extremadamente poderoso. Además la recombinación ocurre en un solo paso, disminuyendo el tiempo necesario para la obtención de mutantes, que puede llevar dos años. Con la inclusión de un gen de resistencia a antibióticos con sitios *res* flanqueándolos y la recombinasa de *E. coli* que recombina ADN entre los sitios *res*, se pueden obtener mutantes no marcadas en presencia de la recombinasa (Bardarov, *et al.* 2002).

#### **4.3.4 STM *signature tag mutagenesis***

Esta técnica combina la producción de bibliotecas de mutantes por transposición con la identificación directa de organismos que han perdido en cierta medida su virulencia, mediante una selección en un modelo animal adecuado. Originalmente la técnica fue descrita para *Salmonella typhimurium* (Hensel *et al.* 1995) y posteriormente ha sido adaptada para ser usada en *M. tuberculosis* (Camacho *et al.* 1999). En su trabajo identificaron 16 mutantes atenuadas en ratones BABL/c inoculados por vía intravenosa. Algunas presentaron mutaciones en genes involucrados en el metabolismo de lípidos, otros en transporte o regulación y algunos de función desconocida.

#### 4.3.5 Complementación de cepas atenuadas

Otro de los pasos importantes para demostrar la implicancia de un determinado gen en virulencia, es comprobar la ganancia de virulencia de una cepa avirulenta por la incorporación de dicho gen (Pascopella *et al.* 1994). *M. tuberculosis* H37Rv (virulenta) y H37Ra (avirulenta) derivan de un mismo aislamiento clínico del año 1934 pero difieren en su capacidad de producir enfermedad en ratón. Construyeron una biblioteca genómica de H37Rv en el vector integrativo pYUB178 que se usó para transformar H37Ra. Identificaron una región de 25kb que confería a H37Ra la capacidad de crecer *in vivo*. Empleando una estrategia similar Arruda y colaboradores (1993) identificaron una región de *M. tuberculosis* H37Rv que le confería la capacidad de invadir células no fagocíticas a cepas no patogénicas de *E. coli*.

En todos los casos en los que se obtiene una mutante por la inactivación de un gen, hace falta construir la correspondiente cepa complementante. Preferentemente incluyendo una copia del gen salvaje en un plásmido integrativo bajo la regulación de su propio promotor. Esta debería revertir el fenotipo mutante al de la parental. De esta manera se puede estar seguro de que el fenotipo obtenido luego de la inactivación de un gen, es específico de la mutación. Muchos genes forman operones y puede observarse un efecto polar en los genes río abajo. En ese caso se debería interrumpir el gen con un *cassette* de resistencia a antibióticos que no posea un terminador transcripcional, o realizar la complementación con todo el operón, no pudiendo atribuir el fenotipo atenuado a un único gen sino quizás a una función común.

La inactivación de genes ha sido la herramienta más poderosa para la identificación de genes involucrados en determinados procesos o en virulencia. Pero muchas veces no es posible lograrla por tratarse de genes esenciales, o simplemente se requiere el gen intacto para estudiar su función. Para ello hay otras técnicas que se basan principalmente en el estudio de la expresión génica en diferentes condiciones de cultivo mediante el uso de genes reporteros o de un fenotipo fácilmente identificable, o la cuantificación de los niveles de ARN o de proteínas.

#### 4.3.6 Genes reporteros

Las metodologías que utilizan genes reporteros consisten en vectores que contienen el gen que codifica para una proteína cuya actividad es fácil de medir y no contiene el promotor. Permiten el clonado de una secuencia específica o de fragmentos al azar generando una genoteca. Los genes reporteros más utilizados son: *lacZ* ( $\beta$ -galactosidasa), *xylE* (catecol-2,3-dioxigenasa), *phoA* (fosfatasa alcalina), *lux* (luciferasa), *gfp* (proteína verde fluorescente [GFP]), y *cat* (cloramfenicol acetiltransferasa). La actividad enzimática puede medirse luego de someterlo a distintas condiciones de estrés (Yuan *et al.* 1996), o por ejemplo de infectar macrófagos (Dellagostin *et al.* 1995) pudiéndose identificar de ese modo los compuestos o señales que regulan la actividad de las secuencias promotoras.

#### 4.3.7 Bibliotecas sustractivas

Otra manera de identificar factores de virulencia es analizar la expresión génica en diferentes condiciones mediante la técnica de hibridación sustractiva de bibliotecas de ADN copia. Permite identificar genes expresados diferencialmente ya sea comparando una cepa virulenta *vs* una cepa avirulenta cercana (H37Rv *vs* H37Ra, Kinger & Tyagi 1993), o la misma cepa crecida bajo diferentes condiciones (cultivo líquido *vs* infección de macrófagos, Plum & Clark-Curtiss, 1994). Posteriormente, Graham & Clark-Curtiss (1999) desarrollaron la técnica de SCOTS (*selective capture of transcribed sequences*), que permite analizar la expresión de genes luego de infectar una línea celular de macrófagos, mejorando la hibridación sustractiva. Luego del análisis por SCOTS, los autores identificaron genes involucrados en la síntesis de poliquétidos, la isocitrato liasa, genes de la familia PPE, tres de los cuatro operones *mce* y genes de los sistemas de dos componentes. (Graham, *et al.* 1999).

### 4.3.8 Microarreglos

Sin duda la técnica más efectiva para estudiar los perfiles de expresión génica, es la técnica de Microarreglos. Consiste en una grilla de ADN unido a una matriz, que puede ser hibridado con una mezcla de ADNc marcado con fluorescencia. Permite comparar de manera global y semicuantitativa la expresión génica de un organismo bajo diferentes condiciones de cultivo, en distintas fases del crecimiento, en presencia o ausencia de una droga o de una condición de estrés, o una cepa mutante en un factor de transcripción vs la cepa salvaje. (Talaat, *et al.* 2000; Fisher *et al.* 2002; Manganelli, *et al.* 2001). La mayor ventaja es el gran número de genes analizados a la vez, y el uso de fluorescencia que amplifica la señal.

### 4.3.9 Proteómica

El análisis de los perfiles de expresión a nivel proteico bajo diferentes condiciones de cultivo, también es utilizado para la identificación de genes expresados diferencialmente. La proteómica combina los geles de dos dimensiones 2D con la espectrometría de masa y también fue utilizada en la genómica comparativa funcional. (Mollenkopf, *et al.* 1999, Jungblut, *et al.* 1999). Resulta una técnica complementaria de los microarreglos de ADN, ya que muchas veces los niveles de proteínas se ven afectados por modificaciones post transcripcionales. Además muchas proteínas forman multímeros a través de interacciones proteína – proteína o sufren modificaciones post traduccionales como, fosforilaciones (Hoch, *et al.* 1995), unión de un ligando específico o de un metal divalente (Schmitt, *et al.* 1995).

Los resultados obtenidos a partir de estos estudios de expresión deben ser considerados preliminares, y deben ser validados por otras técnicas como RT- PCR, *northern blot* o *primer extension*.

#### 4.3.10 Secuenciación

Probablemente uno de los avances más revolucionarios fue la disponibilidad de las secuencias de genomas completos de bacterias, virus y parásitos y las de sus huéspedes, que permitió la identificación de factores de virulencia mediante el alineamiento de genomas de organismos patógenos vs no patógenos relacionados. Las secuencias diferenciales encontradas corresponden a determinantes de virulencia, como genes específicos del patógeno que fueron adquiridos por transferencia horizontal como las islas de patogenicidad, bacteriófagos y plásmidos, o bien la ausencia de un gen supresor en el organismo patógeno, o diferencias alélicas entre genes presentes en ambas cepas. Pero los genomas no necesariamente revelan todos sus secretos. Muchas veces no basta con un minucioso análisis bioinformático, sino que hace falta complementar con estrategias experimentales como las mencionadas anteriormente.

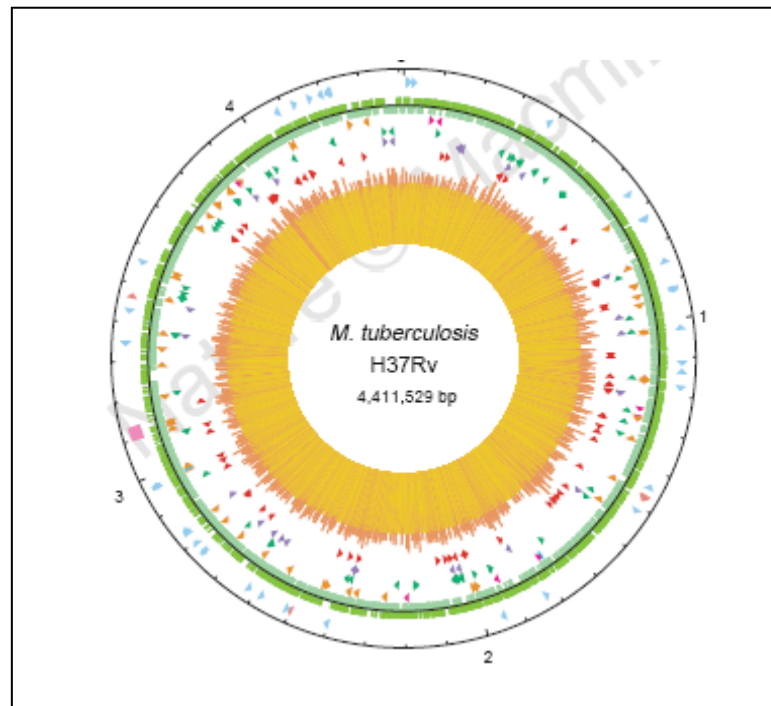
### 5. El genoma de *M. tuberculosis*

En 1998 fue publicada la secuencia completa del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (Cole *et al.* 1998) (**Figura 5**). Las 4.4 MB que completan el genoma son ricas en G+C (65,6%). El mismo es relativamente constante a lo largo del genoma, probablemente indicando la ausencia de la transferencia horizontal. Algunas regiones que muestran un contenido de G+C un poco mayor que el promedio, corresponden a la familia de genes llamada PGRSs (*polymorphic G+C- rich sequences*). El genoma también es rico en secuencias de inserción (IS6110, IS1081) y otros 32 elementos diferentes. Se encuentran múltiples copias de IS6110 a lo largo del genoma y el número variable entre las distintas cepas es utilizado como marcador genético en la epidemiología de la tuberculosis (Poulet, S. & Cole, S. T., 1995). La presencia de IS relacionadas en distintas especies o géneros indicaría que dichos organismos ocuparon un mismo nicho, y que intercambiaron ADN. Esto es importante principalmente en las especies patógenas, ya que los elementos IS permitirían la transferencia de genes de virulencia o de resistencia a drogas. La mayoría de las IS se insertaron en regiones intergénicas o no codificantes y generalmente cerca de genes de tRNA. Muchos forman *clusters*, sugiriendo la existencia de puntos calientes de inserción que previenen la inactivación de genes. Un estudio de la diversidad genómica de profagos y secuencias de inserción demostró que muchos de ellos son estables, indicando que la transferencia horizontal de

material genético en el ancestro de *M. tuberculosis* de vida libre, ocurrió antes de que el bacilo adopte su nicho intracelular especializado (Gordon et al. 1999). La presencia de deleciones e inserciones parecería ser la mayor fuente de variabilidad, ya que se han detectado algunos SNPs (*single nucleotide polymorphisms*) pero en muy baja frecuencia y la mayoría de ellos parecerían ser mutaciones silenciosas.

Más del 90% de la potencial capacidad codificante es utilizada, conteniendo un total de 4000 genes. La anotación del genoma llevó a la agrupación de los genes en 11 categorías funcionales (**Tabla I**). Al 52% de ellos se les puede atribuir una función precisa y al 48% restante una función probable por similitud con otros genes en las bases de datos o función desconocida. Estos últimos podrían corresponder a funciones específicas de las micobacterias. El 51% del genoma surgió por duplicación génica y el nivel de conservación de secuencia es alto, lo que indica que habría una alta redundancia o una producción diferencial de los polipéptidos correspondientes (Cole *et al.* 1998, Cole 2002). La poca divergencia luego de la duplicación génica es consistente con la hipótesis de que *M. tuberculosis* es relativamente joven en términos evolutivos (Sreevatsan. *et al.* 1997).

Figura 5



Cole *et al.* (1998). Mapa circular del cromosoma de *M. tuberculosis* H37Rv. El círculo externo representa el tamaño en Mb, siendo el 0 el origen de replicación. El anillo más externo representa los genes conservados de ARN (tARN y otros), y la región DR en rosa. El segundo anillo muestra la región codificante en verde. El tercer anillo muestra ADN repetitivo (secuencias de inserción y profagos). Los anillos siguientes muestran las familias PPE en verde, PE en violeta y PGRS en rojo. El histograma central representa el contenido de G+C en amarillo (<65%) y en rojo (>65%).

Tabla I

TABLE 1. General classification of *M. tuberculosis* genes

Function	No. of genes	% of total	% of Total coding capacity
Lipid metabolism	225	5.7	9.3
Information pathways	207	5.2	6.1
Cell wall and cell processes	517	13.0	15.5
Stable RNAs	50	1.3	0.2
IS elements and bacteriophages	137	3.4	2.5
PE and PPE proteins	167	4.2	7.1
Intermediary metabolism and respiration	877	22.0	24.6
Regulatory proteins	188	4.7	4.0
Virulence, detoxification and adaptation	91	2.3	2.4
Conserved hypothetical function	911	22.9	18.4
Proteins of unknown function	607	15.3	9.9

Smith, (2003). Clasificación general de los genes en 11 categorías funcionales.



## 5.1 Metabolismo general, regulación y resistencia a drogas

*M. tuberculosis* tiene el potencial de sintetizar todos los aminoácidos esenciales, vitaminas y cofactores. Es capaz de metabolizar hidratos de carbono, alcoholes y ácidos carboxílicos. Gran parte de la capacidad codificante, alrededor de 250 genes, es destinada a la producción de enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos lo que representa un 6% del genoma. Además de la síntesis, la degradación de los lípidos del huésped es crucial durante la vida intracelular, ya sea como precursores de otros procesos metabólicos o como precursores de componentes de la pared celular. Pocos organismos poseen tal diversidad de lípidos como *M. tuberculosis* que van desde ácidos grasos simples como palmitato o isoprenoides a moléculas complejas de cadena larga como ácidos micólicos o fenolftiocerol que se esterifican con los ácidos micocerósicos para dar el PDIM (ftiocerol dimicocerosato), un ácido graso complejo exclusivo de micobacterias. Posee cadenas de transporte de electrones para el crecimiento en condiciones aeróbicas y anaeróbicas, es decir que el bacilo tiene la habilidad de adaptar su metabolismo al ambiente aeróbico del pulmón, como al microaeróbico o anaeróbico del granuloma. Dada la complejidad del ambiente al cual debe enfrentarse *M. tuberculosis*, y como era de esperar, posee un amplio repertorio de reguladores. Trece factores sigma regulan la expresión génica a nivel del inicio de la transcripción, más de cien putativas proteínas reguladoras y once sistemas de dos componentes. Una familia de serina- tronina proteínas kinasas (STPKs) también cumplirían la función de sistemas de transducción de señales, ya que poseen dos dominios: un dominio amino-terminal con función de quinasa conectado a un dominio carboxi-terminal a través de una región transmembrana que respondería al estímulo específico. Las STPKs podrían gobernar procesos importantes como dormancia o división celular.

*M. tuberculosis* es resistente natural a algunos antibióticos, lo que dificulta el tratamiento. Esto se debe en parte a la complejidad de la pared que por ser altamente hidrofóbica actúa como una barrera impermeable. Algunos determinantes de resistencia hidrolizan o modifican drogas como las  $\beta$ - lactamasas y aminoglicósidos acetil transferasas mientras que otros son bombas de eflujo de drogas como los transportadores ABC. El conocimiento de estos mecanismos de resistencia, ayudará a un mejor uso de las drogas existentes y facilitará el desarrollo de nuevas terapias.

## 5.2 Familias multigénicas PE y PPE

Alrededor del 10% de la capacidad codificante del genoma está formada por dos familias no relacionadas de proteínas ricas en glicina: PE y PPE. Poseen numerosas copias de las secuencias repetitivas PGRS (*polymorphic G + C-rich sequences*) y MPTRS (por *major polymorphic tandem repeats*). El nombre de PE y PEE deriva de los motivos de Prolina- Glutamato y Prolina- Prolina- Glutamato en el extremo N terminal conservado en ambas familias y una porción C terminal que varía en secuencia y tamaño. Ya que la variación está dada por secuencias repetitivas, podría derivar de recombinación intra o intergénica o más probablemente de un deslizamiento de la cadena durante la replicación. No se conoce su localización subcelular ni su función, aunque se les podría atribuir una importancia inmunológica. Por un lado podrían ser la principal fuente de variación antigénica y por el otro, proteínas ricas en glicina podrían interferir con la respuesta inmune inhibiendo el procesamiento de antígenos (Cole *et al.* 1998, 2002)

## 6. Factores de virulencia

El estudio del genoma no resuelve todas las cuestiones acerca de la función de las proteínas y rutas metabólicas. El primer paso para la identificación de las proteínas micobacterianas fue hecho, pero la identificación y caracterización de proteínas involucradas en los mecanismos de supervivencia y virulencia de las micobacterias están en un comienzo.

Es muy poco lo que se sabe sobre la virulencia de *M. tuberculosis*. Hasta antes de completarse la secuencia del genoma, sólo se habían descrito unos pocos factores de virulencia (Collins, 1996): Catalasa- peroxidasa, que protege contra especies reactivas de oxígeno, producidos en el fagocito (Marcinkeviciene *et al.* 1995)); *mce* (por *mammalian cell entry*), una proteína con características de invasina descrita por (Arruda *et al.*, 1993) y el factor sigma *sigA*, cuya mutación causa atenuación (Gomez *et al.* 1998). La anotación del genoma de *M. tuberculosis* y el desarrollo de técnicas como las descritas previamente, contribuyeron a la identificación de numerosos factores de virulencia.

## 6.1 Proteínas secretadas o exportadas y componentes de pared

Numerosos factores de virulencia son proteínas exportadas (es decir proteínas trasladadas a través de la membrana citoplasmática o asociadas a la pared como proteínas integrales de membrana o lipoproteínas) o secretadas (proteínas solubles liberadas al medio de cultivo) (Wiker *et al.* 1999; Braunstein and Belisle 2000) y son generalmente reconocidas por sueros de pacientes TB. La correcta localización de dichos factores a través de los sistemas de secreción de proteínas es crucial para la bacteria pero es poco lo que se conoce en micobacterias.

HspX o Acr, también conocida como proteína  $\alpha$ - cristalina, es un antígeno de 16kDa de la familia de pequeñas proteínas de choque térmico. Se encuentra sólo en las especies de crecimiento lento del *complex*, y homólogos en otras bacterias están involucrados en esporulación o se inducen en respuesta a estreses agudos. En *M.tuberculosis* se expresa en fase estacionaria y en condiciones de anoxia, por lo que tendría un rol en la viabilidad a largo plazo durante latencia e infecciones asintomáticas. También se expresa durante la infección de macrófagos *in vitro*, y la interrupción del gen lleva a una fuerte disminución del crecimiento en macrófagos y células THP-1, sugiriendo la importancia de Acr durante la replicación de *M. tuberculosis* en los primeros estadios de la infección (Yuan *et al.* 1996, 1998).

Esat6/ CFP10 son pequeñas proteínas secretadas inmunodominantes que están contenidas en la región de diferencia RD1, y se cree son las principales responsables de la atenuación de BCG (Lewis *et al.* 2003, Pym *et al.* 2002). Ambas son secretadas por un aparato de secreción novedoso codificado en un *cluster* de genes en la misma región RD1 (Guinn *et al.* 2004).

La proteína P36, también llamada Erp (*exported repeated protein*), es una proteína secretada y, bajo determinadas condiciones, asociada a membrana. Posee regiones repetidas en *tandem* del tipo PGLTS (Prolina- Glicina- Leucina- Treonina- Serina) (Bigi, *et al.* 1995). La disrupción del gen resulta en la disminución de la virulencia en ratones (Berthet *et al.* 1998, Bigi, *et al.* 2005).

P27 es una lipoproteína de membrana, presente en las especies del *complex*, y forma un operón con P55 que es homóloga a proteínas de membrana relacionadas a resistencia a antibióticos. La interrupción del operón lleva a una fuerte atenuación de *M. tuberculosis* en ratones BALB/c (Bigi *et al.* 2004). En otro trabajo se vio que la administración de P27 como vacuna a ADN o como proteína recombinante tenía un efecto anti protectorio,

por lo que podría tener un rol en la modulación de la respuesta inmune innata del huésped, haciéndolo más susceptible a la infección por micobacterias. (Hovav *et al.* 2003).

El Antígeno 85 consiste en una familia de proteínas secretadas y exportadas de unión a fibronectina compuesta por los genes *fbpA*, *fbpB* y *fbpC* denominados Ag85A, B y C (Abou-Zeid *et al.* 1988). Poseen una función de micolil transferasa por lo que podrían jugar un rol en la biosíntesis de la pared (Belisle *et al.* 1997). La mutación en el gen *fbpA* resultó en una cepa atenuada en un modelo de infección de macrófagos (Armitige *et al.* 2000).

La pared celular también es importante en la virulencia, pero su biosíntesis es tan compleja que es difícil descifrar los genes críticos involucrados en dichas vías. Algunos de ellos fueron identificados por STM (Camacho, *et al.* 1999), como Fad26 y Fad 28, involucradas en el metabolismo de ácidos grasos, y Mmp17 afectada en el transporte del PDIM. La síntesis de los ácidos micocerósicos que se esterifican con ftiocerol para dar el PDIM, es llevada a cabo por una enzima poliquetido sintetasa (*pks*) denominada Mas. En el genoma de *M. tuberculosis* hay numerosas *pks*, varias de ellas similares a *mas*. Russeau *et al.* (2003), caracterizaron dos de ellas mediante la obtención de mutantes:  $\Delta pks7$  deficiente en DIM, resultó atenuada en macrófagos y en ratón,  $\Delta pks5$  no mostró diferencias en la composición de la pared con respecto a la salvaje, no resultó atenuada en macrófagos pero si en ratón, sugiriendo un rol durante la infección.

El LAM (lipoarabinomanano) es un componente mayoritario de la pared (Hunter *et al.* 1986), y es un importante inmunomodulador. El agregado de LAM a macrófagos de ratón, previene la producción de  $\gamma$ IFN. (Chan *et al.* 1991). Otras enzimas involucradas en el metabolismo de lípidos y ácidos grasos, también tienen importancia en la virulencia, como la isocitrato liasa Icl, la lipasa/ esterasa LipF, numerosos genes *fad* y la Fosfolipasa C (Smith *et al.* 2003).

## 6.2 Captación de metales

El  $Mg^{2+}$  y el  $Fe^{2+}$  son metales esenciales para *M. tuberculosis*, por lo tanto un defecto en la captación de alguno de ellos resulta en una alteración de la virulencia. Para ello poseen sideróforos, que son pequeñas moléculas secretadas, con una alta afinidad por el hierro. Una mutante de *M. tuberculosis* que carece de un tipo de sideróforos (micobactinas), es incapaz de crecer en un medio limitado en hierro y atenuada para el

crecimiento en macrófagos (De Voss *et al.* 2000). IdeR, es una proteína de unión al ADN que requiere Fe<sup>2+</sup>, y es el regulador micobacteriano más importante involucrado en la captación el almacenamiento de Fe<sup>2+</sup>. Es un gen esencial por lo que sólo pudo ser mutado en presencia de una segunda mutación supresora (Rodríguez, *et al.* 2002). En altas condiciones de hierro, reprime la expresión del operón *mbt*, responsable de la síntesis de micobactina y carbomicobactina en *M. tuberculosis* (Gold *et al.* 2001).

### 6.3 Regulación a nivel de la transcripción

Las bacterias tienen la habilidad de cambiar radicalmente su estilo de vida, de acuerdo a los cambios en el ambiente. Los principales estreses a los que debe enfrentarse *M. tuberculosis* durante la infección podrían sintetizarse como sigue: en un primer momento debe exponerse a los intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno, producidos por los macrófagos activados; luego, al bajo pH del fagosoma; en tercer lugar debe soportar el daño de la pared, rica en ácidos grasos, producido por detergentes surfactantes alveolares, que poseen una actividad antibacteriana. A esto se le suma la actividad de ácidos grasos y péptidos tóxicos como granulicina producida por las células NK y los macrófagos en apoptosis. Dentro del fagosoma, pero principalmente en el granuloma, debe sufrir condiciones de hipoxia condición que sería la responsable de inducir persistencia (latencia o dormancia), un fenómeno aún no comprendido totalmente crucial en la patogénesis de *M. tuberculosis*. Algunas evidencias (Park, *et al.* 2003, Zahrt *et al.* 2001) involucran al regulador transcripcional DosR y al efector de respuesta MprA en este proceso. Durante la vida intracelular también debe enfrentar la privación de alimento y elementos esenciales como Fe<sup>2+</sup> y Mg<sup>2+</sup> y durante la transmisión debe soportar adversidades como luz UV o bajas temperaturas (Manganelli *et al.* 2004).

### 6.3.1 Factores sigma

Para adaptarse a estos cambios las bacterias modifican la composición de las holoenzimas de la ARN polimerasa, utilizando distintos factores sigma con afinidad a distintos promotores, lo que resulta en la expresión de un determinado subset de genes involucrados en una función celular. Los factores sigma pueden agruparse en dos grupos de acuerdo a su origen filogenético:  $\sigma_{54}$  y  $\sigma_{70}$ . A su vez, la familia de factores  $\sigma_{70}$  puede subdividirse en tres grupos:

- i) Primarios o esenciales, que en *M. tuberculosis* esta representado por *sigA*, responsable de la transcripción de la mayoría de los genes esenciales (Gomez *et al.* 1998)
- ii) Primarios no esenciales en las condiciones fisiológicas estándar, involucrados en procesos como fase estacionaria o biosíntesis de antibióticos. En *M. tuberculosis* esta representado por *sigB*.
- iii) Alternativos, es el grupo más heterogéneo y en *M. tuberculosis* esta representado por *sigF*, involucrado en la respuesta a estrés, y los ECF (de función extracelular) representados por los 10 factores  $\sigma$  restantes afectados a la respuesta a diversas señales ambientales, adaptación a estrés y expresión de factores virulencia (Manganelli *et al.* 2001).

### 6.3.2 Sistemas de dos componentes

Otra manera de responder a los cambios ambientales es mediante los sistemas de dos componentes. Una proteína sensora, que es una quinasa, responde a las señales ambientales mediante la fosforilación y consecuente activación de la proteína efectora de respuesta que es un regulador transcripcional. Además de un control directo, puede ocurrir un efecto en cascada cuando otro regulador transcripcional es regulado, aumentando el número de genes afectados en respuesta a la señal original. El genoma de *M. tuberculosis* codifica para 11 sistemas de dos componentes completos y 8 homólogos a sensores y reguladores no relacionados.

El primero en ser descrito es el *mtrA- mtrB*, que en *M. bovis* BCG se induce durante la infección de macrófagos mientras que en *M. tuberculosis* H37Rv la expresión es constitutiva (Zahrt & Deretic, 2000). El sistema *devR- devS* fue identificado mediante

hibridización sustractiva entre las cepas de *M. tuberculosis* virulenta H37Rv y la no virulenta H37Ra, por lo que podría estar asociado a virulencia (Dasgupta, *et al.* 2000). Parish y colaboradores estudiaron el rol de los sistemas de dos componentes en *M. tuberculosis* mediante la obtención de mutantes en seis de ellos y la caracterización fenotípica en modelos de infección de ratones y macrófagos. Uno de ellos resultó esencial, *mtrA/ mtrB*, por lo que no pudieron obtener la mutante (como ya había sido descrito por Zahrt *et al.* 2000). Otros cuatro resultaron en cepas hipervirulentas en un modelo de infección de ratones SCID [*devRS* (*Rv3132c/Rv3133c*), *kdpDE* (*Rv1027c/Rv1028c*), *trcXY* (*Rv3764c/Rv3765c*), y *trcRS* (*Rv1032c/Rv1033c*)] mientras que el último [*narLS* (*Rv0844c/Rv0845*)] no mostró diferencias con respecto a la cepa parental. La más hipervirulenta, la mutante  $\Delta devR$ , también lo fue en ratones inmunocompetentes DBA y en macrófagos activados. Estos resultados sugieren un rol importante de los sistemas de dos componentes en la virulencia y los autores proponen que estarían involucrados en limitar el crecimiento de *M. tuberculosis* durante los estadios tempranos de la infección (Parish *et al.* 2003). Para la mayoría de ellos no se conocen las señales a las que responden, ni los genes regulados por ellos. En otro trabajo los mismos autores identificaron el grupo de genes regulados por *senX3-regX3* mediante la obtención de una mutante y la comparación de la expresión génica con respecto a la *salvaje* usando la técnica de *microarrays*. Aunque no fue posible determinar cuáles de los genes son regulados directamente por RegX3 o indirectamente vía otro regulador transcripcional, muchos de ellos están involucrados en la biosíntesis de macromoléculas, como ADN y ARN, componentes de la pared, proteínas secretadas o miembros de la familia PE/ PPE (Parish *et al.* 2003).

El sistema *phoP- phoQ* controla la transcripción de genes involucrados en virulencia en diversos patógenos intracelulares como *Salmonella* sp, *Shigella* sp y *Yersinia* sp (Lejona *et al.* 2003; Zhou *et al.* 2005). En *M. tuberculosis* una mutante en el gen *phoP* tiene una habilidad reducida de replicar en macrófagos, y resulta atenuada en un modelo de ratón (Perez, *et al.* 2001) por lo que podría jugar un rol en la virulencia.

### 6.3.3 Otros reguladores transcripcionales

Además de factores sigma y los sistemas de dos componentes, otros reguladores como represores o activadores modulan la actividad de la ARN polimerasa. (ARNP). Los represores actúan uniéndose a secuencias consenso que usualmente se superponen con el promotor o con el sitio de inicio de la transcripción llamadas operadores, bloqueando así el inicio de la transcripción. Los activadores reconocen una secuencia en el ADN e interaccionan con el factor  $\sigma$  facilitando la interacción del la ARNP con el promotor. La organización de genes en operones y a su vez estos en regulones (genes que responden a una misma proteína reguladora) es una manera efectiva para las bacterias patógenas de expresar un set de genes en respuesta a un estímulo. Dicho estímulo suele ser un ligando que se une al regulador induciendo el cambio de la forma activa a la inactiva o viceversa. La función de un regulador transcripcional puede estudiarse mediante la obtención de una cepa mutante en el gen regulador. La identificación de los genes que regula, la descripción de un posible consenso al que se une y las condiciones bajo las cuales un regulador se vuelve activo, son algunos de los aspectos utilizados para comprender la función de estos factores, muchas veces involucrados en virulencia. Es poco lo que se sabe sobre regulación génica en *M. tuberculosis*. Se identificaron más de 140 reguladores transcripcionales a partir de la secuencia del genoma. Gran parte de los represores pertenecen a las familias TetR y ArsR y entre los activadores están representadas las familias AraC, LysR, LuxR y GntR.

### 7. Operones *mce*

Si bien los macrófagos alveolares son las células blanco durante la infección *in vivo*, *M. tuberculosis* puede invadir células HeLa no fagocíticas *in vitro* (Arruda, *et al.* 1993; Shepard, 1957). Es decir, que posee factores que por sí mismos le confieren la capacidad de entrar en células de mamíferos. La patogenicidad de *M. tuberculosis* se correlaciona con la habilidad de dicho organismo de multiplicarse dentro de células HeLa (Shepard, 1957). Por lo tanto es interesante la búsqueda de los factores que promueven la entrada del bacilo, posiblemente gatillando señales celulares similares a las que desencadenan las bacterias enteropatógenas en su interacción con las células no fagocíticas de mamíferos. Una vez identificados, se podría analizar su efecto en macrófagos, el blanco natural de *M. tuberculosis*. Riley y colaboradores (Arruda *et al.*,



1993), identificaron una región que confería a la cepa de *E. coli* XL1- Blue no patogénica, la capacidad de asociarse, invadir y proliferar dentro de células HeLa. Dicha región también aumentaba la fagocitosis de bacterias por parte del macrófago y la supervivencia dentro del mismo. La ORF contenida en la región, presenta homología con una proteína asociada a la entrada a células de mamíferos de *Listeria monocytogenes*, y proteínas tipo invasina de *Shigella* y *Yersinia pseudotuberculosis* y posteriormente fue denominada Mce1A (Cole *et al.* 1998).

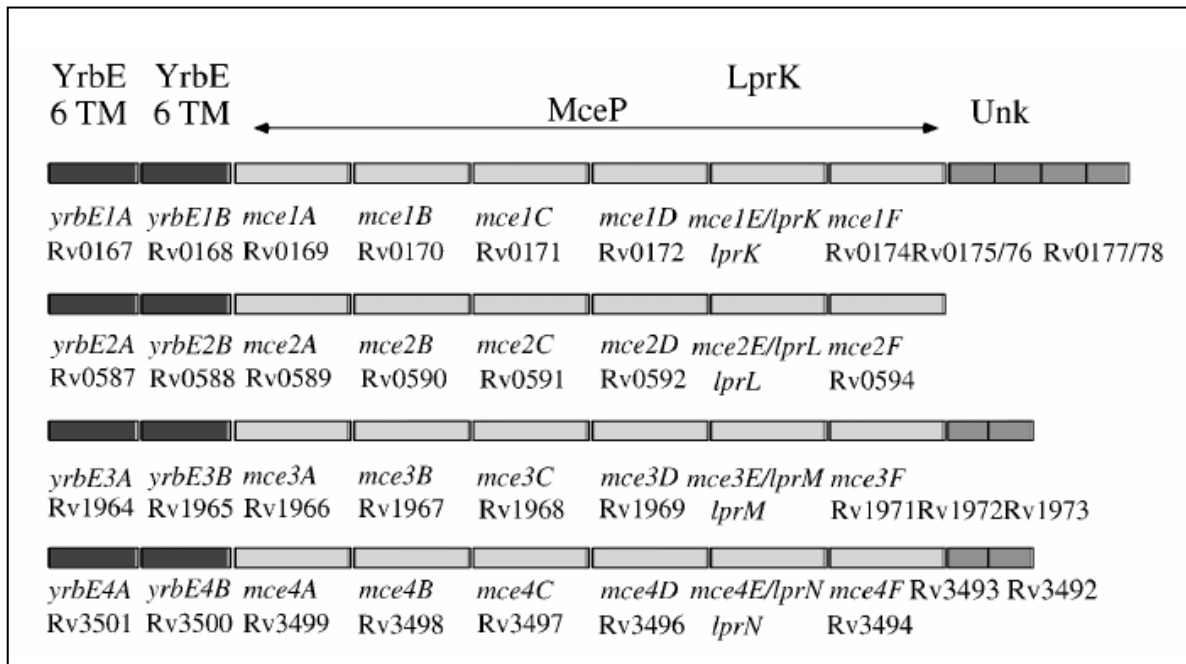
### 7.1 Secuencia y organización de los operones *mce*

Los autores de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.*, 1998) identificaron cuatro regiones genómicas homólogas denominadas operones *mce* (por *mammalian cell entry*) 1, 2, 3 y 4. La presencia multicopia de los operones *mce* podría servir para proteger de mutaciones a genes esenciales de virulencia. Las ocho ORFs de los operones *mce* codifican principalmente para proteínas secretadas o de membrana, son similares en secuencia y organización y presentan una alta homología entre ellos (**Tabla II y III**), especialmente *mce1* y *mce2*. Podrían estar relacionados con mecanismos de interacción parásito-hospedador, con la virulencia del bacilo y quizás con funciones de transporte. Una de ellas es la proteína con características de invasina descrita por Riley y colaboradores (Mce1A) (Arruda *et al.*, 1993). Hacia el extremo 5' de la unidad transcripcional se encuentran los dos genes *yrbE A* y *B* con homología a hipotéticas proteínas conservadas encontradas en *E. coli*, *H. influenzae* y *P. purpurea*. Parecen haber surgido por duplicación en *tandem*, y serían proteínas integrales de membrana con seis dominios  $\alpha$  hélice transmembrana. Los seis genes siguientes de cada operón (*mceA-F*), están relacionados y poseen motivos conservados y una organización común. Uno de ellos tiene homología a una lipoproteína (*lpr*) y los cinco restantes poseen una región altamente hidrofóbica en el extremo N- terminal, por lo que serían de membrana (**Figura 6**). El dominio COOH terminal estaría expuesto hacia la cara externa de la membrana citoplasmática y posee numerosas copias de un motivo anfifílico que adoptaría una estructura  $\alpha$ -hélice. Es posible que las proteínas Mce se asocien a través de dichas hélices, con su porción hidrofóbica interaccionando con los ácidos micólicos de la envoltura celular y la cara interna cargada formando un canal (Tekaiia *et al.* 1999). Este sistema podría tener función de transporte y se encuentra presente en múltiples copias en las micobacterias incluyendo las cepas saprofiticas.

Mediante un análisis filogenético de las proteínas Mce se vio que los operones 1 y 2 están altamente relacionados y que en todos los casos cada miembro del operón se agrupa con sus contrapartes en los demás operones, lo que sugiere una especificidad de función y que los cuatro operones tendrían un origen común (Tekaiia *et al.* 1999). Kumar y colaboradores compararon las secuencias de los operones *mce* de diferentes especies micobacterianas con respecto a *M. tuberculosis* H37Rv. En casi todos los genes observaron una similitud en la secuencia aminoacídica superior al 70%, mientras que a nivel de nucleótidos la similitud fue muy variable y muy baja en algunos casos. Esto puede deberse a una diferencia en la utilización de los codones entre las distintas especies. El análisis de las secuencias proteicas y la búsqueda de dominios conservados en bases de datos arrojaron la presencia de dominios de tolerancia a tolueno Ttg2B y Ttg2C en los ocho genes de los cuatro operones *mce*. Las proteínas que poseen estos dominios se predice que formarían parte de los transportadores ABC involucrados en resistencia a solventes orgánicos. También se identificaron dominios *mce* en los genes *mceA*- *F*. Al analizar la presencia de estos dominios en diferentes especies los autores observaron la presencia de deleciones en algunos los dominios *mce* de las proteínas de *Mycobacterium smegmatis*, lo que podría contribuir a la menor virulencia de estas especies. Haciendo un análisis funcional y estructural de los genes *mce*, se reportó la presencia del operón *mce1* en *M. leprae* (Wiker *et al.* 1999). Haile y colaboradores, revelaron la presencia de los operones en *M. avium* y *M. smegmatis*. La presencia de los operones *mce* en *M. smegmatis* una cepa saprofítica, parecería indicar que la presencia o ausencia no se correlaciona con patogenicidad (Haile *et al.*, 2002), pero una diferencia en los perfiles de expresión sí podría tener importancia en las micobacterias patógenas. También sugiere que la habilidad de entrar en células de mamíferos fue adquirida por las micobacterias mucho antes de convertirse en un patógeno, y que esta no sería la única función de los operones *mce*. Por lo tanto se podría especular con que la primera función de los operones *mce* habría sido la de transporte, adquiriendo luego la función de invadir células del huésped a medida que las micobacterias se volvieron patógenos exitosos (Kumar *et al.* 2005).

Previamente, nuestro grupo demostró que el operón *mce3* está ausente en *M. bovis*, *M. microti*, y algunas cepas de *M. africanum* (Zumárraga, *et al.*, 1999), por lo que podría jugar un rol en el rango de huésped.

Figura 6



Tekaia *et al.* (1999). Organización de los operones *mce*. Los dos primeros genes, *yrbE*, codifican para posibles proteínas integrales de membrana con seis dominios  $\alpha$  hélice transmembrana (6TM) y los seis restantes los *mceA-F* que poseen secuencias señales para posibles proteínas secretadas o exportadas. Los genes denominados *lpr* son posibles precursores de lipoproteínas.

**Tabla 1I**

Operon	Indice de similitud (%)
MBmce1 vs.MTmce1	99.6 ^100
MBmce2 vs.MTmce2	98.6 ^100
MBmce4 vs.MTmce4	100
MAmce1 vs.MTmce1	69.1 ^80.5
MAmce2 vs.MTmce2	76.4 ^82.4
MAmce3 vs.MTmce3	56.2 ^66.2
MAmce4 vs.MTmce4	80.5 ^85.5
MSmce1 vs.MTmce1	58.9 ^67.6
MSmce2a vs.MTmce2a	62.8
MSmce3 vs.MTmce3	58.5 ^67.7
MSmce4 vs.MTmce4	65.4 ^68.5

Haile *et.al.* 2002. Alineamiento de las secuencias proteicas deducidas de *M.bovis* (MBmce), *M.avium* (MAmce) y *M.smegmatis* (MSmce) con sus homólogos en *M.tuberculosis* ,MTmce 1 ^4 Los números representan el índice máximo y mínimo de similitud en % usando los métodos de Lipman y Pearson (Lipman *et al.* 1985).

**Tabla III**

MTmce1a	MTmce2a	MTmce3a	MTmce4a	MBmce1a	MBmce2a	MBmce4a
MTmce1a	100					
MTmce2a	65.7	100				
MTmce3a	32.3	32.5	100			
MTmce4a	26.8	29.0	32.1	100		
MBmce1a	99.3	62.7	31.8	27.2	100	
MBmce2a	66.7	95.9	34.0	30.0	63.6	100
MBmce4a	26.8	29.0	32.1	99.9	27.2	30.0
100						

Haile *et.al.* 2002. Comparación de las proteínas Mce1a- 4ª de *M. tuberculosis* MTmce1 ^4 y *M. Bovis* MBmce 1 ^4 Los números representan el porcentaje de identidad entre proteínas, mediante alineamientos múltiples en Clustal.

## 7.2 Rol en la virulencia de los operones *mce*

Numerosas evidencias involucran a los operones *mce* como importantes determinantes de virulencia. Una cepa de *M. bovis* BCG mutante para el gen *mce1A* posee una capacidad reducida de invadir las células epiteliales no fagocíticas HeLa (Flesselles *et al.*, 1999). Chitale y colaboradores reportaron la capacidad de la proteína rMce1A (la tercera ORF del operón *mce1*) de facilitar la entrada de microesferas de látex a células no fagocíticas desencadenando una estructura tipo pedestal, y en algunos casos invaginación y estrechamiento de la membrana lo que indica rearrreglos del citoesqueleto. El dominio activo de la proteína se encuentra en el extremo amino y coincide con la región más hidrofóbica de la proteína. La proteína rMce2A, que es la que posee mayor identidad con Mce1A (67%), no fue capaz de promover la entrada de microesferas en células HeLa. La entrada a células de mamíferos mediada por rMce1A de partículas sintéticas inertes, parecería estar mediada por receptor. Sin embargo este mecanismo, no parece ser el único explotado por *M. tuberculosis* para invadir, ya que el anticuerpo anti Mce1A no impide la asociación de dicho organismo a células HeLa, mientras que sí bloquea la entrada de las partículas de látex (Chitale *et al.*, 2001).

Para evaluar la importancia de las proteínas Mce en el crecimiento de *M. tuberculosis*, nuestro grupo ha obtenido tres cepas mutantes en los genes *yrbE1B* (la segunda ORF del operón *mce1*), *mce2A* (la tercera ORF del operón *mce2*) y *mce3A* (la tercera ORF del operón *mce3*). Ensayos de virulencia en ratones BALB/c inoculados por la vía intratraqueal demostraron un aumento en la sobrevivencia de los ratones infectados con las cepas  $\Delta mce$  con respecto a la salvaje. Esto se vio acompañado por una baja formación de colonias en pulmón y una disminución en el tamaño y la formación de granulomas (Gioffré *et al.* 2005). Por otro lado, para evaluar la incidencia de la vía de inoculación, se infectaron ratones por la vía intraperitoneal. No se observaron diferencias significativas en las unidades formadoras de colonias (UFC) en bazo inoculados con las cepas mutantes con respecto a la salvaje. En pulmón en cambio, se observó un aumento de las UFC de la cepa mutante  $\Delta mce1$  a los 45 días post infección. Estos datos coinciden con lo reportado por Riley y colaboradores, quienes observaron que una cepa mutante en el operón *mce1* resultó ser hipervirulenta en ratones inoculados por vía intravenosa, e incapaz de formar un granuloma bien organizado. Además, la cepa mutante  $\Delta mce1$  no fue capaz de inducir una respuesta pro inflamatoria en macrófagos,

lo que sugiere que *mce1* podría estar involucrado en despertar una respuesta inmune de tipo Th1. Estas observaciones sugieren que un cierto nivel de respuesta pro inflamatoria es necesario para que *M. tuberculosis* establezca una infección estable no proliferativa y permanezca latente sin provocar una enfermedad activa. El alto número de bacterias en pulmón sería el responsable de la muerte de los ratones infectados con la cepa mutante mucho antes que los infectados con la salvaje. No se sabe cual o cuáles de los productos de *mce1* serían los responsables de la hipervirulencia o del patrón de citoquinas expresado por los macrófagos infectados, pero los autores postulan que la interrupción de proteínas de membrana (como MceA- F), podrían alterar la estructura de los componentes no proteicos de la pared, que a su vez tendrían efectos inmunomoduladores, o bien las proteínas Mce podrían formar una estructura en la pared por medio de la cual se exporte al medio extracelular algún producto responsable de inducir respuesta pro inflamatoria (Shimono *et al.* 2003). En otro trabajo Sasseti *et al.* 2003, obtuvieron una mutante en el operón *mce1* que resultó atenuada en un modelo de coinfección en ratón. Estas diferencias en el comportamiento de ambas mutantes podría deberse a que en un modelo de coinfección, en presencia de una respuesta inmune efectiva montada contra *M. tuberculosis* desencadenada por una cepa salvaje para el locus *mce1*, la mutante en dicho locus resulta atenuada, evidenciando el requerimiento de los genes *mce1* para el crecimiento de la bacteria *in vivo*.

El uso de cepas atenuadas de *M. tuberculosis* como vacunas vivas, tendría como ventaja con respecto a BCG, que producen mayor cantidad de antígenos protectivos, induciendo una respuesta inmune más fuerte y a más largo plazo por lo que los niveles de protección serían mayores. Recientemente en una colaboración con el grupo de Hernandez Pando de México, las cepas mutantes en los operones *mce2* y 3 fueron evaluadas para su uso como vacunas. En una primera etapa se comparó la virulencia de ambas mutantes con BCG, que es la cepa usada actualmente como vacuna. Luego de vacunar ratones por la vía subcutánea, se evaluaron UFC en distintos órganos y a distintos tiempos. Tanto en ratones BALB/c como en ratones inmunodeficientes Nude, la carga bacteriana fue significativamente menor en las cepas mutantes con respecto a BCG. En cuanto a la capacidad de inducir respuesta celular, las mutantes fueron más eficientes que BCG en estimular la producción de  $\gamma$ IFN en células de bazo y de nódulos linfáticos. Para evaluar la capacidad protectora, ratones vacunados con ambas cepas mutantes y BCG, fueron desafiados por vía intratraqueal con la cepa hipervirulenta Beijing. El porcentaje de sobrevivencia fue del 30%, 72% y 63%, para los ratones

vacunados con BCG,  $\Delta mce2$  y  $\Delta mce3$  respectivamente. Además los animales vacunados con las dos cepas mutantes mostraron una menor área del pulmón afectada por neumonía y grandes granulomas, lo que en este modelo de ratón correlaciona con protección (Aguilar, *et al.* 2006).

### 7.3 Expresión y Regulación de los operones *mce*

Con el objetivo de evaluar el perfil de expresión de los operones *mce*, Kumar y colaboradores estudiaron la expresión de los mismos en cultivo *in vitro* e *in vivo* de *M. tuberculosis* mediante RT-PCR. En fase exponencial de cultivo *in vitro* sólo detectaron expresión de *mce1*, disminuyendo los niveles hacia fase estacionaria, donde observaron altos niveles de expresión de *mce4*. En ningún caso reportaron la expresión de los operones *mce2* y 3 durante el crecimiento *in vitro*. En el modelo animal, *mce4* se expresó en bazo de cobayos, mientras que en pulmón de conejo observaron bajos niveles de expresión de los operones *mce1*, 3 y 4. La expresión diferencial de los operones *mce* y la presencia multicopia podría estar relacionada con la especificidad de tejido durante la infección y la fase de crecimiento. Los perfiles de expresión sugieren una correlación entre la fase estacionaria de cultivo *in vitro* y la infección *in vivo* (Kumar *et al.*, 2003). Posteriormente, los autores evaluaron la expresión de los operones *mce* en otras especies de micobacterias y observaron que en *M. smegmatis*, depende de las condiciones de aireación, nutrientes y fase de crecimiento. En condiciones de abundancia de nutrientes, se expresaría un menor número de operones *mce*, mientras que en condiciones limitadas el bacilo expresaría los cuatro operones. En *M. bovis*, que carece del operón *mce3*, se expresa sólo el operón *mce2*. La aparente redundancia de los operones *mce* en micobacterias habría evolucionado para sobrellevar las condiciones variables de crecimiento (Kumar *et al.* 2005).

Arriba de los operones *mce1*, *mce2* y *mce3*, se encuentran tres genes que codifican para proteínas con probable homología a reguladores transcripcionales. Rv0165c (*mce1R*), y Rv0586 (*mce2R*) pertenecen a la familia de reguladores GntR, mientras que Rv1963c (*mce3R*), pertenece a la familia TetR. Casali y colaboradores, obtuvieron una mutante en el gen *mce1R* para evaluar el rol de Mce1R en la regulación del operón *mce1*. No observaron diferencias en la expresión del operón *in vitro* en la mutante con respecto a la salvaje, sin embargo en un modelo de infección de macrófagos, la

expresión del operón *mce1* esta reprimida en la cepa salvaje mientras que en la mutante no (Casali *et al.* 2006).

Nuestro grupo también caracterizó el regulador Mce2R, involucrado en la represión de la transcripción del operón *mce2* pero hasta el momento no se pudo determinar bajo qué condiciones se libera su expresión (manuscrito en preparación).

Por todo lo expuesto se desprende que existe una asociación de los genes *mce* con el crecimiento *in vivo* de *M. tuberculosis*, aunque aún no queda claro el rol que cumplen durante la infección. Por otro lado el hecho de ser exclusivos del género *Mycobacterium* y estar ampliamente distribuidos dentro del mismo incluyendo las especies no patógenas, ha generado un interés creciente en el estudio de los operones *mce*.

Por lo tanto nos planteamos como hipótesis de este trabajo que, dada la similitud del gen *Rv1963c* con reguladores transcripcionales y debido a su proximidad con el operón *mce3*, dicho gen regula la expresión del operón *mce3*.



## OBJETIVOS

**En base a los antecedentes mencionados el objetivo general de este trabajo es estudiar los mecanismos que regulan la expresión del operón *mce3* de *Mycobacterium tuberculosis* con el fin de aportar elementos que permitan dilucidar la función de los genes *mce*.**

### **Objetivos particulares:**

Caracterizar la función de *Rv1963c* (Mce3R) y determinar su rol en la expresión de los operones *mce*.

Obtener una cepa mutante en el gen *mce3R* ( $\Delta$  *mce3R*) para ser utilizada como herramienta en el estudio de la expresión de los operones *mce*.

Evaluar fenotípicamente la cepa mutante  $\Delta$  *mce3R*.

Caracterizar el promotor del operón *mce3* e identificar el sitio de unión del regulador Mce3R en dicha región.

Identificar las señales extracelulares que regulan la expresión del operón *mce3*.

Identificar otros posibles blancos de Mce3R mediante estrategias bioinformáticas.

## 1. Cepas Bacterianas y medios de cultivo

Las cepas de *Escherichia coli* DH5 $\alpha$  (Gibco) y BL21 ( $\lambda$ DE3) (Invitrogen) fueron crecidas en medio líquido Luria- Bertani (LB) en agitación o LB agar (5g/l tristoná, 5g/l extracto de levadura, 10g/l NaCl, DIFCO) a 37°C. Las cepas micobacterianas *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 o *M. tuberculosis* H37Rv fueron crecidas en medio Middlebrook 7H9, 0,05% Tween 80 (Sigma) o 7H11, suplementados con Glicerol 0,5% (Invitrogen) y OADC 10% (ácido oleico, albúmina, dextrosa, catalasa), (Becton Dickinson and Co). En los casos requeridos, los antibióticos se suministraron en las siguientes concentraciones:

**Tabla IV**

Antibiótico	Marca	Concentración <i>E.coli</i>	Concentración Micobacterias
Kanamicina	Sigma	50 $\mu$ g/ml	20 $\mu$ g/ml
Ampicilina	USB	100 $\mu$ g/ml	-
Hygromicina	Sigma	250 $\mu$ g/ml	50 $\mu$ g/ml

## 2. Preparación de células competentes y transformación

**2.1. *E.coli*:** se prepararon competentes químicas mediante incubación con CaCl<sub>2</sub> y congeladas a -70° hasta su uso (Sambrook *et al.* 1989).

**2.1.1 Transformación.** La transformación se realizó incubando en hielo 50  $\mu$ l de células competentes, con 50ng de plásmido o de ligación durante 30 minutos. Luego se incubó a 42° C durante 2 minutos e inmediatamente se resuspendieron las células en 200 $\mu$ l de medio LB durante 20 minutos a 37° C en agitación, para permitir la expresión de la resistencia al antibiótico. Finalmente se plaqueó en medio LB agar con el antibiótico correspondiente, durante toda la noche a 37° C.

**2.2. Micobacterias:** se prepararon células electrocompetentes según Parish & Stoker (1998). 50ml de cultivo en fase exponencial se resuspendieron en Glicerol 10% (H<sub>2</sub>O calidad HPLC Sigma). Luego de tres lavados a 4° C, se resuspendieron en glicerol 10% concentrándolas 100 veces.

**2.2.1 Transformación.** 200µl de células competentes se incubaron con 1µg de plásmido en hielo durante 5 minutos. Se electroporaron en un equipo BioRad a 200Omhs (*M.smegmatis*) o 1000 Omhs (*M.tuberculosis*) de resistencia, 2,5 voltios, y 25 microfaradios. Inmediatamente se resuspendieron en 1ml de medio 7H9 suplementado con OADC durante 3hs (*M.smegmatis*) o durante toda la noche (*M.tuberculosis*), a 37° C. Luego se plaquearon en 7H11-glicerol OADC, en presencia del antibiótico correspondiente.

**3. Metodologías de ADN recombinante.** La construcción y análisis de los plásmidos recombinantes se realizó por las técnicas clásicas de biología molecular (Ausubel *et al.* 1996; Sambrook *et al.* 1989).

**3.1 Minipreparaciones de ADN.** Los plásmidos fueron aislados utilizando el *kit* de Wizard para minipreps de Promega según las especificaciones del fabricante o el método de lisis alcalina. Se partió de 1,5ml de cultivo de bacterias crecido en LB con antibiótico durante toda la noche a 37° C, se centrifugaron a 12000 rpm en una microcentrífuga de mesa y se resuspendieron en 200µl de Solución I (Tris-HCl 25mM pH8, EDTA 10mM, glucosa 50mM). Luego se agregaron 200µl de Solución II (NaOH 0.2N, SDS 1%) se mezcló suavemente por inversión y se incubó 5 min. a temperatura ambiente. Finalmente se agregaron 400µl de Solución III (acetato de potasio 3M) y se mezcló por inversión. Se centrifugó a 12000 rpm durante 10 minutos. Se tomó el sobrenadante y se traspasó a un tubo eppendorf limpio donde se precipitó el ADN plasmídico por el agregado de 0,6 volúmenes de isopropanol y centrifugación a 12000 rpm durante 20 minutos. Se lavó el precipitado con etanol 70%, se secó bajo vacío y se resuspendió en 50µl de H<sub>2</sub>O conteniendo ARNasa (100 ug/ml). Para verificar la presencia, integridad y orientación de los diferentes insertos en cada estrategia de clonado, se digirieron de 2 a 6 µl de esta solución con las enzimas de restricción apropiadas.

**3.2 Ligaciones:** 50ng de vector digerido por las enzimas de restricción adecuadas y fosfataseado (30 minutos a 37° C, en presencia de 1Ude Fosfatasa alcalina (Promega) e inactivada durante 10 minutos a 70° C) se pusieron a ligar con el inserto en una relación 1:1 según:  $\text{ng inserto} = \text{ng vector} \times \frac{\text{tamaño inserto (kb)}}{\text{tamaño del vector (Kb)}}$ , en presencia de 1U Ligasa (Promega), 1µl buffer Ligasa 10X (500mM Tris ClH pH 7.5, 100mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM DTT, 10mM ATP, 25 µg/ml BSA) y H<sub>2</sub>O csp 10µl a 16° C durante toda la noche.

**3.3 Digestión con enzimas de restricción:** 5µl de plásmido se incubaron con 1µl de la enzima de restricción adecuada, en presencia de 2µl del buffer correspondiente 10X y H<sub>2</sub>O csp 20µl a 37°C durante 1 hora y media. Las reacciones se corrieron en geles de agarosa 0,8% en buffer TAE 1X (Tris-acetato 10mM, EDTA 1mM), en presencia de un marcador de peso molecular 1kb Promega y se visualizaron las bandas teñidas con bromuro de etidio a una concentración de 0,5µg/ml. En los casos en que los fragmentos debieran ser clonados en otro vector, se cortó la banda de agarosa y se purificó utilizando el kit de Purificación de geles de agarosa de Quiagen, según las especificaciones del fabricante.

**3.4 Electroforesis en geles de agarosa.** Se utilizaron distintas concentraciones de geles (0,8- 2%) según el tamaño de las bandas a analizar. La agarosa fue disuelta en buffer TAE (Tris- acetato 10mM, EDTA 1mM pH8) a la que se le adicionó bromuro de etidio (0,5 µg/ml). Las muestras de ADN se sembraron en *buffer* de siembra (glicerol 25%, azul de bromofenol 0,5%) y corrieron en buffer TAE a 5-10 V/cm. Las bandas se visualizaron con luz UV y se fotografiaron usando un analizador de imágenes *Fotodyne* y el programa *Collage* para Machitoch.

**4. PCR:** las amplificaciones se realizaron utilizando *Taq* Polimerasa (Promega) o Accu-Prime (Invitrogen) en presencia del *buffer* correspondiente en condiciones estándar, en un volumen final de 50µl. Los dNTPs se utilizaron a una concentración final de 0,2 mM cada uno, y los cebadores 20pmol cada uno. Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla V** y fueron diseñados a partir de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* disponible en <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> utilizando el programa OligoTech (Oligo Therapeutics Inc.). El protocolo de amplificación fue: 3 minutos de desnaturalización a 94° C, seguidos de 30 ciclos de 1 minuto 94° C, 1 minuto a la temperatura de *annealing* de los oligonucleótidos dependiendo del par utilizado, y una elongación a 72° C de 1minuto / Kb a amplificar, seguidos de 10 minutos a 72° C de elongación final. 2ng de ADN genómico de *M. tuberculosis* o de un BAC conteniendo el operón *mce3* gentilmente cedido por el Dr. S. T. Cole (Instituto Pasteur, Francia) fueron utilizados como templado. Los fragmentos de PCR fueron purificados utilizando un kit de purificación de bandas de agarosa, y clonados en los vectores pGEMT *easy* (Promega) o TOPO -PCR2.1 (Invitrogen) según las indicaciones del comerciante. La selección de los clones se realizó en presencia de 40µl 2% Xgal (5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-*D*-galactósido) y 40µl de IPTG 100mM (Isopropil-1-tio-β-*D*-galactósido).

Tabla V (Primers PCR)

Oligonucleótido	Secuencia	Sitio de restricción	Temp de annealing °C	Tamaño amplificado pb
P3up	ggatccCGGCTCGAACCCCCTTCTTGCGCAC	<i>Bam</i> HI	66	880
P3rev	ggatccGGCGCGGCGCACCAGCTGGATTCGA	<i>Bam</i> HI		
<i>mce</i> 3R-P3up	ggatccGGACACCTCATTACACCGATAATG	<i>Bam</i> HI	58	2165
P3rev	ggatccGGCGCGGCGCACCAGCTGGATTCGA	<i>Bam</i> HI		
P3-100up	ggatccCGTACGCTACCAATGTCACC	<i>Bam</i> HI	64	100
P3revK	ggtaccGGCGCGGCGCACCAGCTGGATTCGA	<i>Kpn</i> I		
P3-200up	ggatccTACTAGCAAGATACATCATAG	<i>Bam</i> HI	56	206
P3revK	ggtaccGGCGCGGCGCACCAGCTGGATTCGA	<i>Kpn</i> I		
upRegclo	ggatccATGGCATCCGTCGCCAACCCG	<i>Bam</i> HI	61	1318
lowRegclo	gaattcCTATGCGCGCAAGAGGTTACCT	<i>Eco</i> RI		
low861	GGATTCGATGCTGGGCCGTT	-	56	-
Tetdir	CTATTTACCGATCAGTTGTCCAAGCAAT	-	57	28
Tetanti	ATTGCTTGGACAACCTGATCGGTAAATAG	-		28
MutTetdir	CTATTTACCGGCTCTATGTCCAAGCAAT	-	58	28
MutTetanti	ATTGCTTGGACATAGAGCCGTTAAATAG	-		28
upP3int	aagcttTTGCGCACCGGAATCACAAATC	<i>Hind</i> III	67-55	880
P3revint	aagcttACCATGGCGCGGCGCACCAGCTGGAT	<i>Hind</i> III		
upP3 <i>mce</i> 3Rint	tcatgaGGACACCTCATTACACCGATAAT	<i>Bsp</i> H1	67-58	2165
P3 <i>mce</i> 3Rrevint	tcatgaACCATGGCGCGGCGCACCAGCTGGAT	<i>Bsp</i> H1		
200intup	ggatccTACTAGCAAGATACATCATAG	<i>Bam</i> H1	67-57	207
200intlow	aagcttaccatGGCGCGGCGCACCAGCTGGAT	<i>Hind</i> III		
P1int up	gaattcCGTTTGCCCGCTATTGACGA	<i>Eco</i> RI	68-54	204
P1intlow	aagcttACCATCCGCGGCTCCCTCAAGCCGC	<i>Hind</i> III		
P2intup	AagcttTGTTCTAACGATCTTCCGAATC	<i>Hind</i> III	59-51	139
P2intlow	AagcttACCATTGCGCCAGTGTGAATGAAG	<i>Hind</i> III		
P4intup	GaattcGTGACCCGTGGATATAGGCG	<i>Eco</i> RI	63-56	230
P4intlow	AagcttACCATACTGGGGTCCCCCGTCTA	<i>Hind</i> III		

**5. Clonado y expresión de Rv1963 (*mce3R*) en micobacterias:** el gen *mce3R* se subclonó a partir del plásmido pP3-*mce3R* utilizando los sitios de restricción *Bam*HI/*Eco*RI, en un vector replicativo en presencia de su propio promotor para la expresión en *trans* de la proteína reguladora. Se utilizó el vector pNVB que lleva el gen de resistencia a higromicina. Las cepas de *M. smegmatis* que llevaban los distintos promotores en el vector integrativo pYUB178-*gal* fueron preparadas para ser transformadas con el vector pNVB- *Mce3R* y se utilizaron para los estudios de regulación para evaluar el rol de *Mce3R* en la expresión de los otros promotores.

**6. Clonado y expresión de Rv1963 (*mce3R*) en *E. coli*:** el gen *mce3R* se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos upRegclo- LowRegclo (**Tabla V**). El amplicón fue clonado en pGEM-T (Promega) y luego liberado con las enzimas de restricción *Bam*HI/*Eco*R1 para ser clonado en pRSET-A, un vector de expresión que permite la fusión traduccional a un hexapéptido de histidinas. Con el plásmido resultante se transformó *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3). La expresión de la proteína recombinante (*Mce3R*) se indujo por el agregado de IPTG 0,1mM a un cultivo de 500ml de LB Ampicilina creciendo a 28° C hasta una OD<sub>600 nm</sub> de 0,48.

**6.1 Purificación de la proteína recombinante.** La proteína recombinante fue purificada en condiciones nativas mediante cromatografía de afinidad. El *pellet* bacteriano se resuspendió en 10ml de *buffer* de extracción (TrisClH 100mM pH 7,5, NaCl 1M, Glicerol 20%, NP40 1%, PMSF 0,5mM, Imidazol 10mM). Las células se lisaron utilizando el disruptor de bolillas, Fast Prep (FP120 Qbiogene) y la matriz de vidrio de 150- 212 micrones de diámetro (Sigma) durante 40s a 5,5m/s de velocidad, se mantuvieron en hielo y centrifugaron 3 minutos a 13000 rpm para obtener proteínas solubles. Luego se incubó con la resina de níquel Ni- NTA (níquel- nitrilotriacetic acid, Qiagen) durante 1hora y media a 4° C con agitación suave. Se centrifugó y descartó el percolado, se lavó la resina con *buffer* de lavado (TrisClH pH 100mM 7,5, NaCl 300mM, Glicerol 20%, NP40 1%, Imidazol 5mM) y se armó la columna para la elución de la proteína recombinante con 250mM, 500mM y 1M de Imidazol en *buffer* TrisClH 50mM pH 7,5, NaCl 500mM, Glicerol 20%, NP40 1%. La presencia de la proteína se evaluó en geles de poliacrilamida teñidos con *Coomasie* y se confirmó la identidad de la misma por *western blot* utilizando un anticuerpo monoclonal Anti Histidina (Amersham Biosciences). La concentración de proteínas se estimó utilizando el *kit* de cuantificación

de proteínas de Pierce (Micro BCA *protein assay*) según las especificaciones del fabricante.

**7. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida.** Se utilizaron geles desnaturalizantes de poliacrilamida de concentraciones 10%, 12% y 15%, dependiendo del tamaño de la proteína de interés a ser visualizada. El grado de entrecruzamiento acrilamida:bisacrilamida utilizado fue 30:0,8. En general se utilizaron minigeles (6 x 9 cm, Miniprotean III, Biorad), los que se corrieron a una corriente constante de 100V en *buffer* Laemmli (Tris-HCl 25mM pH 8,8, glicina 250mM, SDS 0,1%).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se desmontaron los geles y las proteínas se tiñeron con el colorante azul de *Coomasie* o se electrotransfirieron a membranas de nitrocelulosa para experimentos de *Western-blot*.

**7.1. Tinción con Azul de Coomasie.** Se incubaron los geles en una solución de azul de *Coomasie* 0,05% (*Coomasie Brilliant Blue* R250 0,05%, metanol 50%, ácido acético 10%) por 1 a 2h con agitación suave. Se retiró la solución de tinción y se decoloró el exceso de colorante mediante incubación con solución de lavado (metanol 50%, ácido acético 10%) que se reemplazó periódicamente.

**7.2. Identificación de proteínas mediante *Western-blot*.**

**7.2.1 Electrotransferencia.** Luego de efectuada la electroforesis, los geles de poliacrilamida se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa (Amersham Biosciences) en *buffer* Laemmli suplementado con metanol 20%, aplicando una corriente constante de 200mA a 4°C por 1,5h. Para evaluar la efectividad de la transferencia las membranas se tiñieron con Rojo *Ponceau* 0,1% (Sigma) en ácido acético glacial 5%. Los extractos proteicos se obtuvieron resuspendiendo el *pellet* bacteriano en PBS 1X (NaCl 137 mM, KCl 2,7 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,5 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8 mM) en *buffer* de muestra (β- mercaptoetanol 2%, Tris ClH 100mM pH 6,8, Glicerol 20%, SDS 4%, azul de bromofenol 0,2%) hirviendo durante 5 minutos.



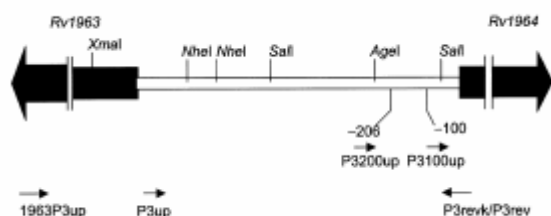
**7.2.2 Detección inmunológica de las proteínas.** Luego de la transferencia las membranas se incubaron toda la noche a 4°C en la solución de bloqueo TBS-leche 5% (Tris-HCl 50mM pH 7,4, NaCl 150mM, leche descremada 5%). Luego se incubaron con la dilución 1:3000 del anticuerpo monoclonal anti Histidina Amersham Biosciences, en *buffer* de dilución TBS-leche 3% (TBS, leche descremada 3%). Tras 1,5h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se recuperó la dilución del anticuerpo y se lavaron las membranas tres veces con TBS por 10 minutos cada vez. Se incubaron entonces con una dilución del segundo anticuerpo en TBS- leche (cabra anti-ratón conjugado con la enzima fosfatasa alcalina SIGMA). Tras 1,5h de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, se descartó la dilución del segundo anticuerpo y se lavó tres veces con TBS por 10 minutos cada vez. Se realizó un último lavado de 10 minutos con el *buffer* BREFA (Tris-HCl 100mM pH 9,5, NaCl 100mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM) y se agregaron 10 ml de solución de revelado (10ml de buffer BREFA, 66µl de Nitro blue tetrazolium (NBT) 50mg/ml en dimetilformamida 70%, Promega) y 33 µl de bromo-cloro-indoil-fosfato (BCIP) 50mg/ml en dimetilformamida 100%, Promega). Se incubó con agitación suave por 3 a 15 minutos con luz tenue hasta visualizar las bandas de interés. La reacción de revelado se detuvo por lavados con agua y las membranas se secaron al aire y se resguardaron de la luz.

## 8. Construcción de las fusiones a *lacZ*

**8.1 Fusiones transcripcionales en el vector replicativo pJEM15:** la región intergénica *Rv1963c- Rv1964* (P3) conteniendo o no el gen *mce3R* se amplificó por PCR utilizando los pares de oligonucleótidos *mce3R*-P3up/ P3rev y P3up/ P3rev (**Tabla V**), ambos amplicones se clonaron en PCRII- TOPO y luego subclonaron en pJEM15, vector replicativo para el estudio de promotores en fusión a *lacZ* (Timm, *et al.*1994). Las secuencias que abarcan las 100 y 200 pares de bases (pb) río arriba del codón de iniciación del gen *Rv1964* se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos P3-100up/ P3revK y P3-200up/ P3revK respectivamente (**Tabla V**) y también se subclonaron en pJEM15 (**Figura 7**). Los plásmidos resultantes pP3-*mce3R*, pP3, pP3-100 y pP3-200 fueron utilizados para evaluar la actividad de β- galactosidasa en *M. smegmatis*.

**8.2 Mapeo del promotor.** Se realizaron diferentes deleciones en la región intergénica de las construcciones pP3 y pP3- *mce3R* intermediarias en pPCRII- TOPO mediante digestión con enzimas de restricción y posterior religado (**Figura 7**). Las construcciones fueron digeridas con las enzimas *Nhe1* y *Sal1* y subclonadas en pJEM15 para obtener los plásmidos pP3 $\Delta$ *Nhe*, pP3-*mce3R* $\Delta$ *Nhe*, pP3 $\Delta$ *Sal* y pP3-*mce3R* $\Delta$ *Sal* respectivamente. Al digerir pP3-*mce3R* con *Xma1*/ *Age1* se obtuvo la deleción pP3 $\Delta$ *Xma/Age*. Todas las construcciones se electroporaron en *M. smegmatis* para evaluar la actividad de  $\beta$ -galactosidasa.

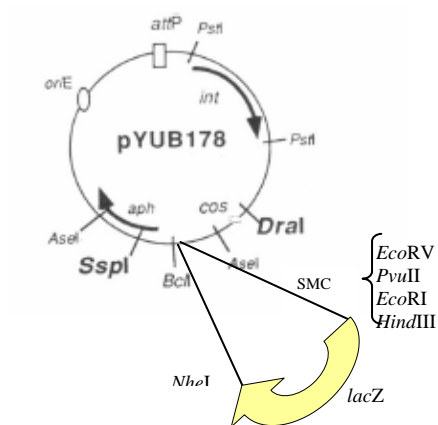
**Figura 7**



Representación esquemática de la región comprendida entre Rv1963c- Rv1964. Las flechas representan los genes Rv1963 (*mce3R*) y Rv1964 y el sentido de transcripción. Entre ellos la región intergénica (P3) señalando las enzimas de restricción utilizadas para obtener las deleciones. Las flechas pequeñas representan los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR

**8.3 Construcción del vector integrativo pYUB178- *gal*:** el gen de  $\beta$ - galactosidasa sin el codón de iniciación ATG del vector pMC1871 (Pharmacia) se escindió con la enzima *BamH1* y clonó en el mismo sitio del vector pBluescript II (Stratagene). Luego se digirió por los sitios *HindIII*/ *XbaI* presentes en el SMC para ser clonado en el vector integrativo pYUB178 (Pascopella *et al.* 1994) digerido por las enzimas *HindIII*/ *NheI* esta última compatible con *XbaI*. El vector pYUB178 posee el gen *int* y un sitio de integración *attP* proveniente del Micobacteriofago L5 que se integra eficientemente en el genoma de *M. tuberculosis* y *M. smegmatis* en el sitio *attB* mediante recombinación sitio específica (Lee *et al.* 1991) (**Figura 8**). El vector obtenido se denominó pYUB178-*gal*.

Figura 8

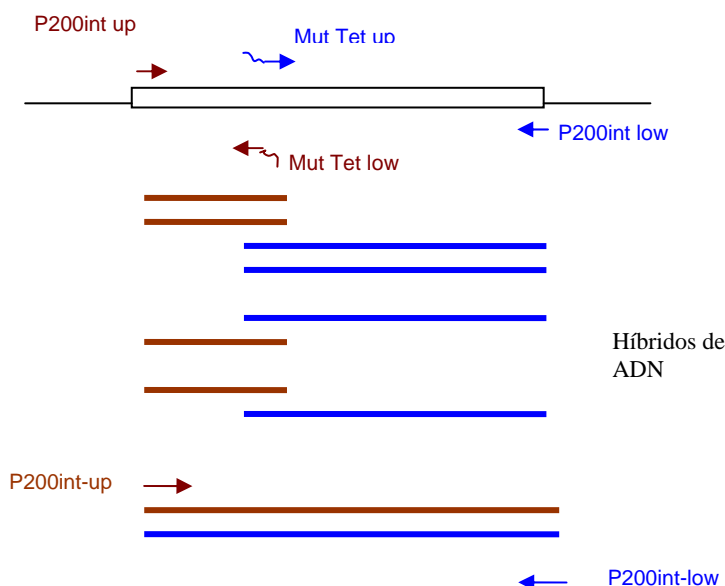


Mapa de restricción del vector integrativo pYUB178- *gal*. Se indican el origen de replicación en *E. coli* (*oriE*), el sitio de integración *attP*, el gen *int*, el sitio múltiple de clonado SMC, el gen *lacZ* y el gen de resistencia al antibiótico kanamicina *aph*

**8.4 Fusiones en el vector pYUB178- *gal*.** La región intergénica conteniendo o no el gen *mce3R* (P3- *mce3R* y P3) y la región 200 y 200Mut, se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos que llevan la denominación “int” detallados en la **Tabla V**. Las regiones intergénicas correspondientes a los operones *mce1*, 2 y 4 se amplificaron por PCR utilizando los oligonucleótidos P1intup/P1intlow, P2intup/P2intlow y P4intup/P4intlow enumerados en la **Tabla V**. El programa utilizado fue un programa *touch down*, disminuyendo 1° C por ciclo en la temperatura de *annealing* de los oligos. El rango de temperaturas utilizado para cada par de oligonucleótidos y las enzimas de restricción utilizadas se muestran en la Tabla II. Los amplicones se clonaron en el vector integrativo pYUB178- *gal* y se obtuvieron los plásmidos: pP3*mce3R*int, pP3int, p200int, p200mutint, pP1int, pP2int y pP4int.

**9. Mutagénesis dirigida por PCR.** Para realizar la mutagénesis de las bases más conservadas en el sitio de unión de Mce3R a la región promotora p200 se utilizó la siguiente estrategia. En una primera etapa se realizaron las amplificaciones utilizando los pares de oligonucleótidos 200intup/ MutTetlow y MutTetup/ p200intlow separadamente, uno salvaje y otro conteniendo la mutación deseada (**Tabla V**) y la enzima DNA polimerasa para templados ricos en GC *AccuPrime* (Invitrogen) en presencia del *buffer* A (TrisHCl 300mM pH 9.2, MgSO<sub>4</sub> 10 mM, NaCl 150mM, dGTP 1mM, dATP 1mM, dTTP 1mM, dCTP 1mM, proteínas termoestables *AccuPrime*<sup>TM</sup> y *enhancers*). Se utilizó un programa *touch down*, disminuyendo la temperatura de *annealing* 1° C por ciclo durante 17 ciclos (68 a 51) y 30 ciclos a 51° C, usando como templado el plásmido pGEMT conteniendo la región intergénica P3int. Ambas bandas se purificaron a partir de geles de agarosa utilizando el *kit* de Qiagen, se mezclaron, se desnaturizó por calor y se dejó renaturalizar lentamente para la obtención de moléculas híbridas de ADN. Luego se realizó una segunda PCR sin el agregado de oligonucleótidos durante los 10 primeros ciclos para permitir la polimerización de los fragmentos por la Taq para obtener ADN doble cadena, y luego agregando los oligos que amplifican la región p200 completa p200intup/ p200intlow (**Tabla V, Figura 9**). Paralelamente se utilizaron los mismos oligonucleótidos en una reacción de PCR para obtener la región p200 salvaje, utilizando la región intergénica P3int como templado. Los productos se purificaron y clonaron en el vector pPCRII-TOPO para ser secuenciados y luego se subclonaron en el sitio *HindIII* del vector integrativo pYUB178-*gal*. Con las construcciones obtenidas se transformó por electroporación *M. smegmatis* y se determinó la actividad de β- galactosidasa a lo largo del tiempo de cultivo.

Figura 9



**Representación esquemática de la estrategia de mutagénesis por PCR utilizada para la obtención de la región p200 mutada en el posible consenso *tet*.**

**10. Condiciones de estrés.** La cepa de *M. tuberculosis*  $\Delta mce3R$  fue transformada con los plásmidos pYUB178- *gal* P3 y pYUB178- *gal* P3*mce3R*. Se midió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de los cultivos *in vitro* a distintos tiempos de cultivo y en distintas condiciones de estrés, para lo cual un cultivo líquido de ambas cepas en fase exponencial, se diluyó hasta una OD a 600nm de 0,01 y creció hasta una OD de 0,2. 5 ml de cada cultivo se alicuotaron para ser sometidos a las siguientes condiciones de estrés: baja temperatura (4° C), etanol 5%, NaCl 0,5M, SDS 0,05%, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 100mM, 50ng/ml Tetraciclina, baja tensión de oxígeno (estufa de CO<sub>2</sub> 5%) y Metilviológeno 0,25mg/ml (Sigma) un agente que genera iones superóxido y produce daño en el ADN. Para las condiciones de bajo pH (Acido acético pH3) y medio condicionado (sobrenadante de un cultivo en fase estacionaria tardía filtrado) los cultivos fueron centrifugados y las bacterias resuspendidas en 5 ml del medio correspondiente. A las 2 y 48 horas se midió actividad de  $\beta$ - galactosidasa y se comparó con respecto al control sin estrés.

**11. Infección de macrófagos.** La línea de Macrófagos murinos J774,  $5 \times 10^5$  en cajas de cultivo T25 en medio RPMI con 10% SFB, gentilmente preparadas por el laboratorio de Cultivos de Tejidos del CNIA, INTA Castelar, dirigido por el Dr. Osvaldo Zabal, fueron infectadas con las cepas H37Rv PJ15, H37Rv P3, H37Rv P3-*mce3R* a una MOI 10:1 ( $5 \times 10^6$  micobacterias en 5ml de medio RPMI con 2% SFB durante 4 hs. Luego se lavó 5 veces con PBS estéril y se cosechó a distintos tiempos con 1ml de tritón X100 1% para lisar los macrófagos (T0: 4 horas post infección (pi), T1: 24 horas pi, T2: 72 horas pi; T3: 144 horas pi). De cada punto se plaquearon diluciones seriadas para hacer recuento de UFC y se centrifugaron las micobacterias y guardo el *pellet* a  $-20^\circ \text{C}$  hasta la medición de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa según se describe a continuación.

**12. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa *in vitro*:** 1 ml de cultivo de las cepas de *M. tuberculosis* o *M. smegmatis* recombinantes se resuspendieron en 1 ml de *buffer Z* (0.1M fosfato de sodio pH 7.0, 10mM KCl, 1mM MgSO<sub>4</sub> y 50mM  $\beta$ -mercaptoetanol). Las células se lisaron utilizando el disruptor de bolillas *Fast Prep* (FP120 Qbiogene) y la matriz de vidrio de 150- 212 micrones de diámetro (Sigma) y luego centrifugaron a 13000rpm para obtener un extracto celular soluble. Se agregaron 200ul de ONPG (O-nitrofenil  $\beta$ - D galactopiranosido) 4mg/ml en fosfato de sodio 0.1M pH 7.0. Se midió la absorbancia a 420nm. La actividad específica de  $\beta$ - galactosidasa se calculó según:  $\text{Abs}_{420\text{nm}} \times 1000 / \text{tiempo de reacción en min} \times \text{Abs}_{550\text{nm}}$ . (Miller *et al.* 1972).

**13. Extracción ADN de micobacterias:** el protocolo que se utilizó fue el descrito por van Sooligen *et al* (1991): 1,5 ml de cultivo se resuspendió en 400  $\mu\text{l}$  de buffer TE 1X y se inactivó (*M.tuberculosis* H37Rv) durante 20 minutos a  $80^\circ \text{C}$ . Se incubó con 50  $\mu\text{l}$  de Lisozima 10mg/ml durante toda la noche a  $37^\circ \text{C}$ . Luego se agregaron 10  $\mu\text{l}$  de Proteinasa K (10mg/ml) y 100 $\mu\text{l}$  de SDS 10%, se agitó en vortex y se incubó durante 10 minutos a  $65^\circ \text{C}$ . Se agregaron 100  $\mu\text{l}$  de NaCl 5M y 100  $\mu\text{l}$  de CTAB, se agitó en vortex hasta que el líquido se pusiera blanco y se incubó nuevamente a  $65^\circ \text{C}$  durante 10 minutos. Luego se agregaron 750  $\mu\text{l}$  de cloroformo: isoamílico (24:1), se agitó bien y centrifugó durante 5 minutos 12000 rpm. Se recolectó la fase acuosa en un eppendorf limpio y se precipitó el ADN con 0,6 volúmenes de isopropanol a  $-20^\circ \text{C}$  durante 1 hora. Luego se centrifugó a 12000 rpm durante 15 minutos, se lavó el *pellet* con etanol 70% frío, se dejó secar al aire y se resuspendió en 20 $\mu\text{l}$  de buffer TE 0,1X.

**14. Extracción de ARN de micobacterias:** 20 ml de cultivo en fase exponencial se resuspendieron en 2 ml de TriZol (**Tri Reagent Invitrogen/Sigma**). Las bacterias se lisaron utilizando el disruptor de bolillas *Fast prep* (FP120) y la matriz de vidrio de 150- 212 micrones de diámetro (Sigma) durante 40 s a 6m/s. Luego de incubar 5 minutos a temperatura ambiente se agregaron 200µl de cloroformo (Sigma), se agitó vigorosamente y se incubó durante otros 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó durante 5 minutos a 4° C a 12000 rpm, se recuperó la fase acuosa en un tubo limpio y se extrajo nuevamente con 100µl de cloroformo. El ARN se precipitó agregando 600µl de isopropanol (Merk), y 60 µl de acetato de sodio 3mM pH 7, durante toda la noche a -80° C. Se centrifugó 15 minutos a 12000 rpm en frío, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en 20 µl H<sub>2</sub>O DEPC. La integridad del ARN se evaluó en geles de agarosa 1%, teñidos con bromuro de etidio. La concentración se midió utilizando un espectrofotómetro *Gene Quant pro* (Amersham Biosciences).

**15. Digestión con DeoxiribonucleasaI (DNasaI):** 1µg de ARN, se incubó con 1µl de DNasa I (Invitrogen) en *buffer* (TrisClH 20mM, pH 8.4, MgCl<sub>2</sub> 2mM, KCl 50mM), en un volumen final de 10µl H<sub>2</sub>O DEPC, durante 15 minutos a temperatura ambiente en presencia de un inhibidor de RNasas (Invitrogen). La reacción se detuvo agregando 1µl de EDTA (25mM) y calentando a 65° C durante 10 minutos.

**16. QRT-PCR:** La primera cadena de ADNc se sintetizó a partir de 1µg de ARN total, utilizando 200 unidades de la enzima Superscript III (Invitrogen), en presencia de *first strand buffer* (TrisClH 50mM pH 8,3, KCl 75mM, MgCl<sub>2</sub> 3mM), 150ng/µl de hexanucleótidos al azar (Invitrogen), dNTPs 10mM y DTT 0,1 M. Paralelamente se llevó a cabo la misma reacción sin la enzima RT, para evaluar la presencia de ADN contaminante. Las reacciones de RT- PCR cuantitativa, se realizaron a partir de una alícuota de 1µl por reacción del ADNc tal cual y de diluciones, y el *kit 2X quantitec SYBR Green PCR master mix* que contiene HotStarTaq DNA Polimerasa, QuantiTect SYBR Green PCR Buffer (KCl y (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), SYBR Green I, y colorante pasivo de referencia ROX (Qiagen) en presencia de concentraciones adecuadas de oligonucleótidos (Tabla II) y se llevaron a cabo en un sistema de detección de secuencia *Applied Biosystems 7000 DNA* (Perkin-Elmer Corp., Foster City, Calif.). El programa de ciclado consistió en 1 ciclo de 2 minutos a 50°, 1 ciclo de 10 minutos a 95°, 40 ciclos de 15 segundos a 95° y 1 minuto de

*annealing* y elongación a 60°, utilizando el protocolo de disociación. Los datos se analizaron según el método cuantificación relativa descrito por Pfaffl (2001), utilizando como calibrador el gen *housekeeping sigA*:

$R (fold) = (E_{target})^{\Delta CP_{target} (control-muestra)} / (E_{referencia})^{\Delta CP_{referencia} (control-muestra)}$ . En donde  $E = 10^{(-1/pendiente)}$ ,  $CP = Ct$ ,  $target = mce3$ ,  $referencia = sigA$ ,  $control = cepa wild type H37Rv$ ,  $muestra = cepa \Delta Mce3R$ .

Los oligonucleótidos utilizados se detallan en la **Tabla VI**

**Tabla VI (Primers RT-PCR)**

Oligonucleótido	Secuencia	Tamaño amplificado (pb)	Concentración utilizada
<i>mce3up</i>	GACACCTTCACCGCATACT		800mM
<i>mce3low</i>	GGTGGTCTTGTTGACCGAGT	234	
<i>sigA1</i>	GGCCAGCCGCGCACCTTGAC		100mM
<i>sigA2</i>	GTCCAGGTAGTCGCGCAGGACC	134	
<i>mce1up</i>	GGCAAGGGTAAGCAAATCAA		600mM
<i>mce1low</i>	GGTCAACCTGTCTGGTGAAC	189	
<i>qmce2Aup</i>	GAAGACCGAGCTGACTATGG		400mM
<i>qmce2Alow</i>	ATGTAGCGAGGATTCACGTC	168	
<i>qmce4Aup</i>	GGTAGGCAAGGTCACGGATA		500mM
<i>qmce4Alow</i>	AATGAATTCCACCGATTTGG	151	



**17. Primer extension.** 20pmol de oligo low861 (**Tabla V**) se incubaron a 37° C durante 10- 15 minutos con 10pmol de  $\gamma$ ATP (3,000 Ci/ mmol) en presencia de 2 $\mu$ l de T4PNK (T4 polinucleótido kinasa), 2 $\mu$ l de *buffer* 10X (Tris ClH 700mM pH 7,6, MgCl<sub>2</sub> 100mM, DTT 50mM) y H<sub>2</sub>O csp 20 $\mu$ l. Luego de la marcación, se inactivó la quinasa a 90° C durante 2 minutos. 2-5  $\mu$ g de ARN se incubaron con 2pmol de oligonucleótido marcado, dNTPs 10mM y H<sub>2</sub>O csp 13 $\mu$ l, se calentó a 65° C durante 5 minutos y se incubó en hielo por 1 minuto. Luego se agregaron 4 $\mu$ l de *first strand buffer* 5X (Tris ClH 250mM pH 8,3, KCl 375mM, MgCl<sub>2</sub> 15mM), DTT 0,1 M, 1 $\mu$ l inhibidor de RNAasas (RNasaOUT, Invitrogen) y 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa Superscript III (RT Superscript III Invitrogen). La reacción se incubó a 50° C durante 1 hora y se inactivó a 70° C por 15 minutos. Luego se agregó a cada tubo 105 $\mu$ l de *buffer* TEN100 (*buffer* TE pH 7,5, NaCl 100mM, RNasa 20 $\mu$ g/ml, ADN de esperma de salmón 100 $\mu$ g/ml). Se incubó a 37° C durante 15 minutos. Se agregaron 15 $\mu$ l de acetato de sodio 3M, 150 $\mu$ l fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1) y se centrifugó durante 10 minutos a temperatura ambiente. Se recuperó la fase acuosa y se precipitó el ADN con 300 $\mu$ l de etanol absoluto incubando a -20° C durante 1 hora. Se centrifugó 15 minutos y se lavó con etanol 70%. Luego de secar al aire se resuspendió en *buffer* de siembra (NaOH 10mM, formamida 95%, Azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%). Las muestras se sembraron en un gel de secuencia junto con las secuencias realizadas a partir del oligonucleótido low861 marcado.

**18. Gel shift.** Las sondas P3-100 y P3-200 se obtuvieron por PCR utilizando los oligonucleótidos P3-100up y P3-200up, marcados en el extremo 5' con  $\gamma$ ATP como se describió previamente, y el primer P3rev. Los nucleótidos y los oligonucleótidos no incorporados fueron eliminados de la mezcla de PCR con el kit de purificación de fragmentos de PCR MiniElute (Qiagen). Las sondas TetO<sub>1</sub>' , MutTet y TetO<sub>2</sub>' se obtuvieron mediante hibridación de los oligonucleótidos TetO<sub>1</sub>'dir/ TetO<sub>1</sub>'anti, MutTetdir/ MutTetanti y TetO<sub>2</sub>'dir/ TetO<sub>2</sub>'anti respectivamente (**Tabla V**) y posterior marcado en el extremo 5' con  $\gamma$ ATP y T4PNK. 10 ng de sonda doble cadena marcada fue utilizada en cada reacción de interacción, y se incubó con 0-12  $\mu$ g de proteína purificada en presencia de *buffer* de interacción (Glicerol 4%, MgCl<sub>2</sub> 1mM, EDTA 0,5mM, DTT 0,5mM, NaCl 50mM, TrisClH 10mM, polydI- dC 100ng/ml) a temperatura ambiente durante 30 minutos. Las muestras se sembraron en un gel de

poliacrilamida 4% (1X TBE: Tris- base 0,05M, ácido bórico 0,05M, EDTA- Na<sub>2</sub>. 2H<sub>2</sub>O 1mM), bisacrilamida 0,1% y Glicerol 2,5%) y se corrieron en *buffer* TBE 0,5X a 100V por 3 horas. Los geles se expusieron en películas radiográficas X- Omat (Kodak) en oscuridad a -70°C.

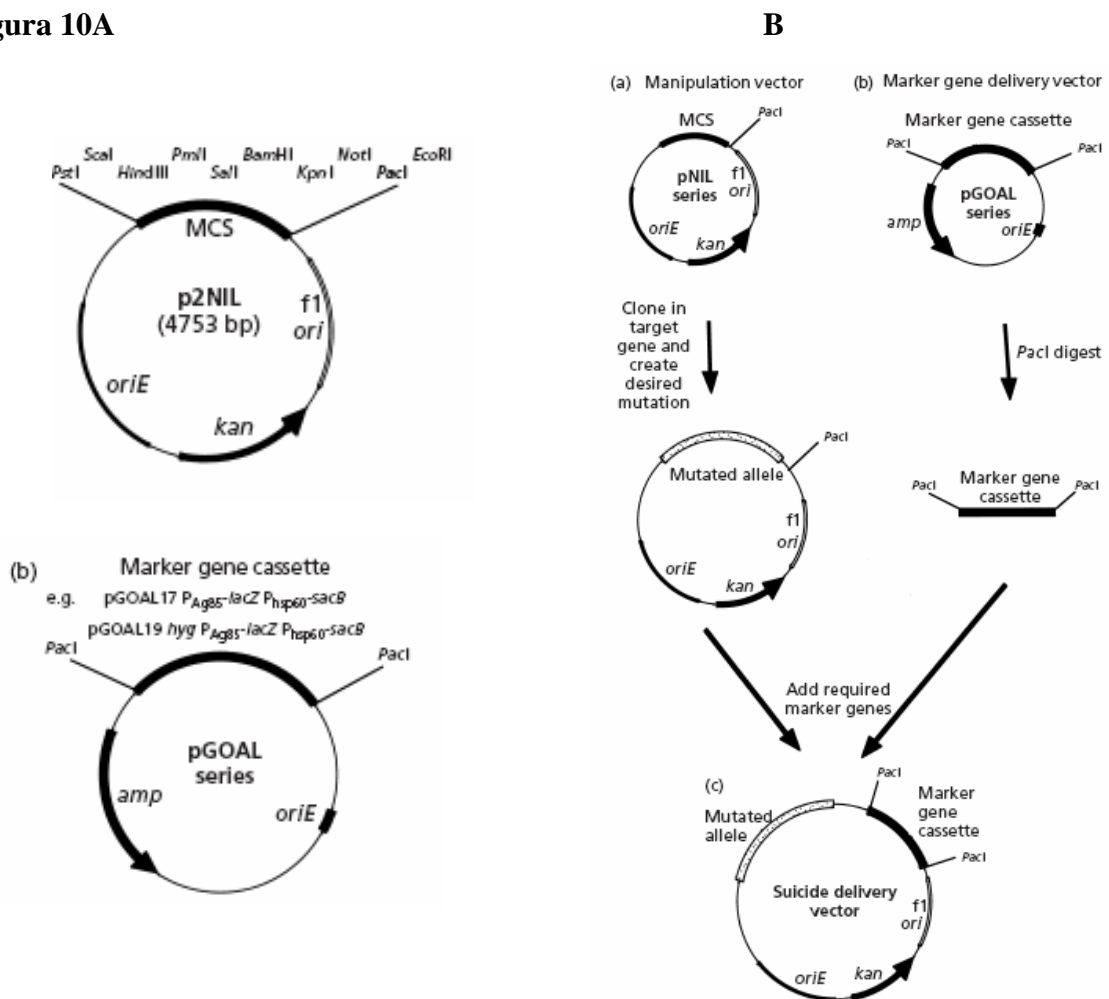
**19. Footprinting.** Las reacciones de interacción se realizaron como se describió para el *gel shift* utilizando 0 u 8 µg de proteína y la sonda p200 en un volumen final de 100µl. Las reacciones se incubaron con 0,15U (1X) o 0,3U (2X) de DNasa- RNasa free (Invitrogen) a temperatura ambiente durante 1, 3 o 10 minutos en presencia de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> (CaCl<sub>2</sub> 5mM, MgCl<sub>2</sub> 10mM). Se detuvo la reacción agregando 90µl de solución *stop* (NaCl 200mM, EDTA 30mM, SDS 1%). Se realizó una extracción con fenol: cloroformo: isoamílico (25: 24:1) y se precipitó con etanol absoluto. Se resuspendió en el *buffer* de siembra y se sembraron en un gel de poliacrilamida 6% desnaturante junto con las reacciones de secuencia realizadas a partir del oligonucleótido P3-200up marcado.

**20. Secuenciación.** Se utilizó el método de los terminadores de cadena (Sanger, 1977), empleando el *kit* de secuenciación *fmol Sequencing kit* de Promega. Cada reacción se realizó a partir de 100 ng de ADN plasmídico de calidad apta para secuenciación y 10 pmol de oligonucleótido iniciador marcado en el extremo 5', siguiendo las recomendaciones de los fabricantes. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador siguiendo el programa: 95°C 30 segundos, temperatura de *annealing* del oligonucleótido 30 segundos, 70°C de extensión 1 minuto, por 30 ciclos. Luego se agregó *buffer* de siembra (NaOH 10mM, formamida 95%, Azul de bromofenol 0,05%, xilencianol 0,05%) y se resolvieron en geles de poliacrilamida 6% desnaturantes (acrilamida 6%, bisacrilamida 0,3%, urea 42%, TBE 0,5%, persulfato de amonio 0,05% y TEMED 0,005%) de 40 X 35 cm usando un gradiente de *buffer* TBE 0,5-1 x (Tris-Borato 90 mM, EDTA 1mM). La electroforesis se realizó a una potencia constante de 50 W, y los geles se fijaron en una solución de metanol 5%, ácido acético 5% y secaron bajo vacío a 80°C. Se obtuvieron las autorradiografías exponiendo los geles a películas autorradiográficas X-O-Mat (Kodak) por 24-48 hs a -80° C.

**21. Obtención de una cepa mutante en el gen *Rv1963c* ( $\Delta mce3R$ ).** El gen *mce3R* más la región flanqueante se amplificó por PCR utilizando los oligonucleótidos upMutReg TCTAGAGAGCGGGAGGTGACCAAGGC y lowMutReg TCTAGAGAAGAAGGCCGACGCGAAGC y un programa de amplificación con una temperatura de *annealing* de 58°C y 5 minutos de extensión. El fragmento de 4kb se clonó en pGEM-T (Promega) y se confirmó su presencia por restricción con diferentes enzimas. El *cassette* de resistencia a higromicina (1,5kb) se liberó del plásmido pUC-Higro con la enzima *HindIII* y se clonó en el mismo sitio presente en *mce3R*. La banda de 5,5kb se liberó cortando con la enzima *NotI* presente en el *polilinker* de pGEM-T, y se subclonó en el vector p2Nil desarrollado por Parish & Stoker (2000) para la obtención de mutantes en *M. tuberculosis* por reemplazo alélico (**Figura 10**). Por último se liberó el *cassette* conteniendo los genes de selección *lacZ* y *sacB* del vector pGOAL17 cortando con la enzima *PacI*, y se clonó en el mismo sitio también presente en el sitio múltiple de clonado (SMC) de p2Nil. El plásmido resultante se denominó p2Nil-  $\Delta mce3R$ . El mismo se pretrató con UV, y utilizó para electroporar *M. tuberculosis* H37Rv. Se seleccionaron las transformantes simples recombinantes (*HygR*, *KmR*) y de color azul en presencia de X-gal (5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactósido) 50 $\mu$ g/ml en DMF (Dimetil formamida). Una colonia simple recombinante se cultivó en medio líquido y se plaqueó en medio con 2% sacarosa e Higromicina para seleccionar colonias resistentes a sacarosa. Aproximadamente 50 colonias *sacR* se repicaron en réplica en placas con Kanamicina o Higromicina y se seleccionaron los clones *HygR/ KmS*. Ocho clones fueron evaluados por *Southern blot* para confirmar la presencia del reemplazo alélico.

**22. Construcción de la cepa  $\Delta mce3R$  complementante.** Paralelamente se obtuvo una cepa complementante que lleva una copia salvaje del gen *mce3R*:  $\Delta mce3R$  complementante. Para ello la región P3-*mce3R* clonada en PCR 2.1 TOPO se subclonó digiriendo por la enzima *Bam*H1 en el vector replicativo pSUM41 (Aínsa *et al.* 1996) cortado por la misma enzima. La construcción resultante se electroporó en la cepa de *M. tuberculosis*  $\Delta mce3R$  competente y las transformantes se seleccionaron en medio conteniendo Kanamicina. La presencia del plásmido se confirmó mediante extracción de ADN total de la cepa complementante y posterior transformación de *E. coli*. La identidad del plásmido se analizó por restricción con las enzimas adecuadas.

**Figura 10A**



Parish & Stoker (2000). A: Características generales de los vectores pNIL y pGOAL: origen de replicación, resistencia a antibióticos y cassette con marcadores de selección. B: Estrategia de clonado para generar los vectores suicidas

**23. Southern blot.** Se realizó la extracción de ADN genómico como se describió previamente de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv *wild type* y de las candidatas a mutantes (fenotipo SacR, KmS, HigoR)  $\Delta mce3R$ . Se digirió 1 $\mu$ g de cada ADN con las enzimas de restricción *EcoR1* y *Kpn1* separadamente durante toda la noche. Las reacciones se sembraron en un gel de agarosa 0,8% y se corrieron en *buffer* TBE durante toda la noche a 1V/cm. Se incluyó el marcador de peso molecular 1Kb *ladder* (Promega). Al finalizar la electroforesis se tomó una fotografía del gel usando un analizador de imágenes *Fotodyne* y el programa *Collage* para Machitoch. Como referencia se colocó una regla para comparar las distancias de migración de los fragmentos de ADN desde el punto de siembra con respecto al marcador de peso molecular. Esta referencia se usó para determinar los pesos moleculares relativos de las bandas en las posteriores autorradiografías. Luego se procedió al tratamiento del gel siguiendo los protocolos de Ausubel *et al.* (1996). Primeramente se realizó la depuración mediante incubación con HCL 0,25M durante 8-12 minutos. Luego de enjuagar con H<sub>2</sub>O bidestilada se realizaron 2 lavados con NaOH 0,5M/ NaCl 1,5M de 15 minutos cada uno para la desnaturalización del ADN. Se enjuagó nuevamente con H<sub>2</sub>O bidestilada y se realizaron 2 lavados de 15 minutos cada uno con TrisClH 0,5M / NaCl 1,5M pH 7,5 para la neutralización. Finalmente se procedió a la transferencia del ADN a una membrana de Nylon (Hybond) por capilaridad en presencia de *buffer* SSC 10X (NaCl 1,5M, Na<sub>3</sub>citrato 0,15M pH7) durante toda la noche. El ADN se fijó mediante *crosslinking* con UV a 0,12 J/ cm<sup>2</sup> y la membrana se mantuvo en oscuridad hasta su uso.

**23.1 Marcado de la sonda e Hibridación.** Se utilizaron como sondas las secuencias correspondientes a los genes *mce3R* e *higromicina*. Se marcaron radioactivamente 50ng de ADN con [<sup>32</sup>P]  $\alpha$ -dCTP (3,000Ci/mmol) por el método de polimerización a partir de oligonucleótidos al azar (Prime-a-Gene, Promega). La misma membrana fue hibridada con ambas sondas en forma consecutiva previo lavado de la misma con SDS1% a 65° C hasta eliminar por completo la marca correspondiente a la primera sonda. Se pre hibridó durante 1 hora a 65° C en *buffer* PAES 0,1%, SDS 1%. La hibridación se realizó en condiciones de alta astringencia agregando las sondas e incubando durante toda la noche a 65° C. Luego se descartaron las sondas y se realizaron 2 lavados de 15 minutos a temperatura ambiente con SSC 1X, SDS 0,1%; 2 lavados a temperatura ambiente de 15 minutos con SSC 0,1X, SDS 0,1% y finalmente 2 lavados de 15 minutos a 65° C con

SSC 0,1X, SDS 0,1%. Las membranas se expusieron con películas radiográficas X-Omat (Kodak) a -70° C hasta su revelado.

## **24. Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta mce3R$**

**24.1. Inoculación de ratones.** Se inmunizaron ratones hembras BalbC de 2 meses de edad por vía intraperitoneal con  $10^6$  bacterias por ratón en 200  $\mu$ l de PBS. Tres grupos, de 12 ratones cada uno, fueron inoculados con las cepas H37Rv, MutReg y Complementante respectivamente. Al día 1 post inoculación 2 ratones por grupo fueron sacrificados para evaluar la eficiencia de infección. Luego 5 ratones por grupo se sacrificaron a los 15 y 45 días post inoculación. Se extrajeron los bazos y se homogeneizaron en 1 ml de PBS para la dilución y plaqueo en medio con el antibiótico correspondiente. Luego de 4 semanas se contaron colonias y calcularon unidades formadoras de colonia (UFC). Los experimentos fueron realizados por única vez y los datos se expresaron como el promedio de los 5 animales por cada grupo.

**24.2. Curvas *in vitro*.** Cultivos líquidos en fase exponencial de las cepas de *M. tuberculosis* H37Rv salvaje,  $\Delta mce3R$  y Complementante se diluyeron en medio fresco hasta una OD<sub>600nm</sub> de 0.01 ( $5 \times 10^7$  bacterias). Se tomaron alícuotas a distintos tiempos para efectuar una curva de crecimiento.

**24.3 Infección de macrófagos.** La línea de Macrófagos murinos J774 se infectó como se describió previamente con las cepas  $\Delta mce3R$  y la complementante. Se evaluaron UFC a las 4, 24 y 72 horas post infección realizando diluciones seriadas a partir del lisado de macrófagos con Tritón X100 1%.

**25. Análisis bioinformático.** Se realizó un alineamiento de la secuencia aminoacídica de la proteína Mce3R utilizando la base de datos BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). Un análisis de la secuencia para la búsqueda de dominios se realizó con InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>). La búsqueda de promotores se realizó mediante un programa de predicción de promotores procariotas (<http://www.fruitfly.org>) y (<http://www.softberry.com>). El análisis de la secuencia del genoma de *M. smegmatis* para la búsqueda de homología por BLAST se realizó utilizando la base de datos (<http://tigrblast.tigr.org/cmr-blast/>). El software para el análisis de secuencias DNA *Strider* se utilizó para la búsqueda de consensos y sitios de restricción para el diseño de los clonados. El genoma de *M. tuberculosis* H37Rv está disponible en el sitio (<http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/>) y se utilizó para obtener las secuencias codificantes e intergénicas para la generación de oligonucleótidos, para la búsqueda *in silico* de los consensos Tet en todo el genoma de *M. tuberculosis* y para alineamientos de secuencias. El servidor PredictRegulon (<http://www.predictregulon.>) fue utilizado para la identificación de posibles genes blanco de regulación por Mce3R.

## Primera parte

### 1. Caracterización de un posible gen regulador del operón *mce3*

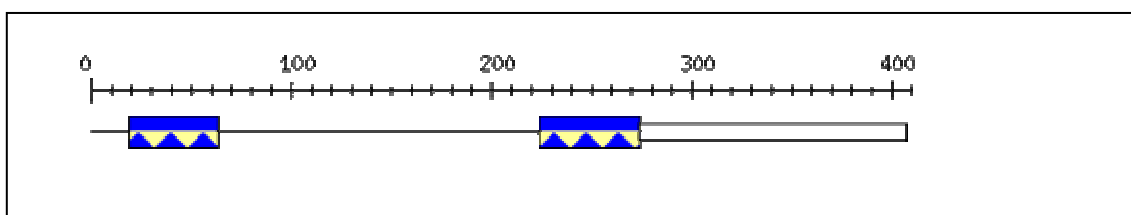
#### 1.1 Análisis bioinformático de la secuencia aminoacídica de Rv1963c

Río arriba del operón *mce3* de *M. tuberculosis* y en sentido divergente de su transcripción, se encuentra el gen *Rv1963c* anotado por los autores de la secuencia del genoma como un putativo regulador transcripcional (Cole *et al.* 1998). *Rv1963c* codifica para una proteína de 44,3kDa y un total de 407 aminoácidos (aa). En un alineamiento de la secuencia aminoacídica utilizando la base de datos BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), *Rv1963c* presentó homología con reguladores transcripcionales de diferentes bacterias pertenecientes a la familia TetR. Los más altos *hits* en GenBank correspondieron a una putativa proteína reguladora de *Streptomyces coelicolor* (número de acceso AL163641) con una similitud del 42% y un valor E  $6e^{-24}$ , y otra de *M. tuberculosis* (número de acceso AE007094) con un 43% de similitud y un valor E  $1e^{-08}$ , además de su ortólogo en *M. bovis*, con una similitud del 100% y un valor E de  $e^{-122}$ .

El análisis de la secuencia para la búsqueda de dominios en la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) mostró dos motivos característicos de la familia Tet basándose en Pfam (PF00440 HMM *Hidden Markov Model*) y ProSite (PS01081), uno entre los aa 19 - 65 y otro en la posición 223-269. También reflejó la presencia de un motivo de unión al ADN del tipo hélice- vuelta- hélice (HTH) según la base de datos PRINTS (PR00455) entre los aa 36-57 (**Figura 11**). Estos resultados sugieren que *Rv1963c* puede tratarse de un regulador transcripcional de la familia TetR, posiblemente involucrado en la regulación del operón *mce3*.



Figura 11



Representación de los dominios Tet presentes en la secuencia proteica de Rv1963c identificados por el programa Pfam (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>). La barra indica la posición aminoacídica.

En la **Figura 12** se muestra un alineamiento de 42 proteínas que ejemplifican el perfil de la familia TetR según la base de datos BacTregulators (<http://www.bactregulators.org>). En la parte (A) se muestran los dos motivos Tet presentes en la secuencia de Rv1963c identificados por Pfam, y alineados con los motivos Tet identificados por BacTregulators. En la parte B se señalan los aa más conservados involucrados en la interacción con el ADN.

Figura 12

A

Rv1963c 15-63	RKKQILDQAVGLFIERGFHSVKIEDIAEAAGVTARALYRHYDNKQALL
Rv1963c 219-266	RYETLLAAGARLFRAQGYPAVNTSEIGKGAGIAGPGLYRSFSSKQALL



## 1.2 Caracterización de la función de *Rv1963c* en la transcripción del operón *mce3*

### 1.2.1 Estudios del rol de *Rv1963c* en la transcripción del operón *mce3* en *M. tuberculosis* H37Rv mediante el uso de un gen reportero en un vector replicativo

Comúnmente las proteínas reguladoras modulan la transcripción de genes cercanos. Es por ello que nos propusimos estudiar el rol de *Rv1963c* en la regulación de la expresión del operón *mce3*. Para ello se construyeron fusiones transcripcionales al gen reportero *lacZ* en el vector replicativo pJEM15 desarrollado para el estudio de promotores micobacterianos por Timm y colaboradores (1994). La región intergénica denominada P3 comprendida entre los genes *Rv1963c* y el primer gen del operón *mce3*, *Rv1964*, conteniendo o no el putativo gen regulador *Rv1963c* (**Figura 13A**), se clonó río arriba del gen *lacZ* en pJEM15 para dar los plásmidos pP3-*Rv1963c* (*mce3R*) y pP3 y se evaluó su actividad promotora transformando la cepa de referencia *M. tuberculosis* H37Rv. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa expresada como unidades de Miller (Miller *et al.* 1972) se midió en una curva a lo largo del tiempo de cultivo y los resultados se muestran en la **Figura 13B**. En el gráfico puede observarse que la actividad enzimática fue mucho mayor en la cepa de *M. tuberculosis* transformada con el plásmido pP3 que la de la cepa transformada con el plásmido conteniendo el gen regulador pP3-*Rv1963c* (*mce3R*). Como control se utilizó el vector pJEM15 sin inserto. Estos resultados sugieren que *Rv1963c* regula negativamente la expresión del operón *mce3* y por ello la proteína que codifica fue denominada Mce3R.

El uso de *M. tuberculosis* en los experimentos de regulación presenta algunas desventajas: es patógena por lo que debe trabajarse en cabina de bioseguridad de tipo P3, y obtener transformantes, realizar las curvas de crecimiento y los experimentos de  $\beta$ -galactosidasa requieren varios meses ya que se trata de una cepa de crecimiento lento. Por otra parte, la cepa salvaje contiene una copia del gen endógeno, por lo que se decidió realizar los experimentos de  $\beta$ -galactosidasa en *M. smegmatis*.

*M. smegmatis* mc<sup>2</sup> 155 es una cepa de crecimiento rápido (tiempo de duplicación 3 horas vs 20 horas de *M. tuberculosis*) y no es patógena por lo que su uso como sistema heterólogo es una herramienta muy útil para los estudios de función y expresión de genes y es fácil de transformar. Además un análisis de la secuencia del genoma (<http://tigrblast.tigr.org/cmrb-blast/>) reveló la ausencia de un gen ortólogo a *mce3R*. Río

arriba del operón *mce3* de *M. smegmatis* se encuentra un regulador transcripcional de la familia TetR con una identidad del 28% y un valor E de  $1,8 \times 10^{-15}$  respecto de Mce3R. Por otro lado, el gen con mayor similitud a *mce3R* en *M. smegmatis* se encuentra en otro lado en el genoma con una identidad del 30% y un valor E de  $2,9 \times 10^{-35}$ .

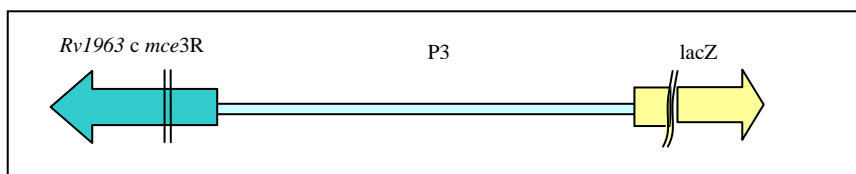
### 1.2.2 Estudio del rol de Mce3R en la transcripción del operón *mce3* evaluado en la cepa heteróloga *M. smegmatis*

Las mismas construcciones ensayadas anteriormente en *M. tuberculosis* se utilizaron para electroporar *M. smegmatis*. Como puede verse en la figura, el efecto del regulador en la actividad del gen reportero a lo largo del tiempo de cultivo fue similar al observado en *M. tuberculosis* (**Figura 13C**). Estos resultados refuerzan la hipótesis del rol que cumple la proteína Mce3R en la transcripción del operón *mce3*.

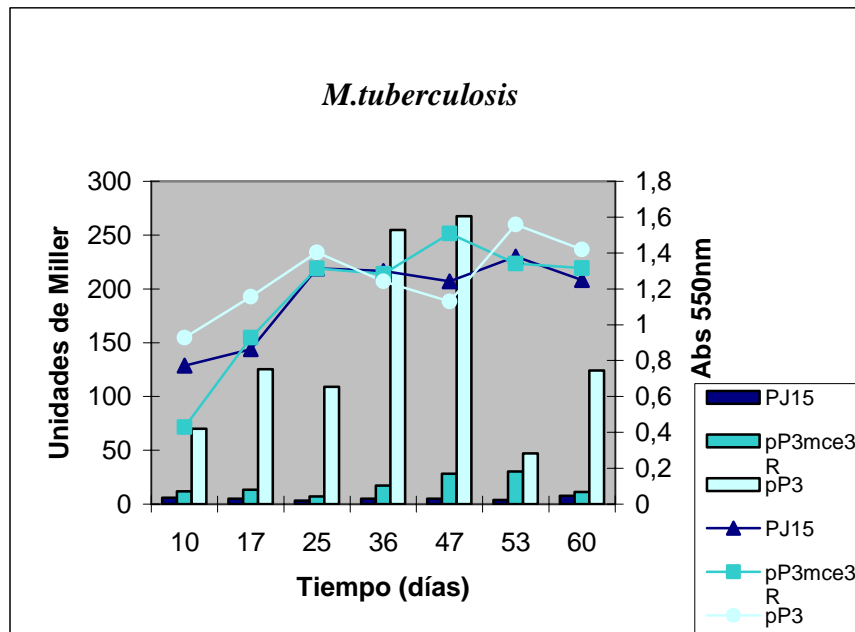
A pesar de las evidencias experimentales obtenidas en ambos sistemas estudiados, que indican que el promotor P3 es reprimido por Mce3R, no se puede descartar que el efecto observado en los experimentos previos se deba a la sobreexpresión del regulador transcripcional a partir del plásmido multicopia pJEM15. La sobreexpresión de Mce3R podría resultar en la unión al ADN y represión de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa de manera inespecífica, o de manera específica pero en ausencia de las condiciones ambientales adecuadas. Para descartar dichas posibilidades se repitieron las construcciones usando esta vez un vector integrativo.

**Figura 13**

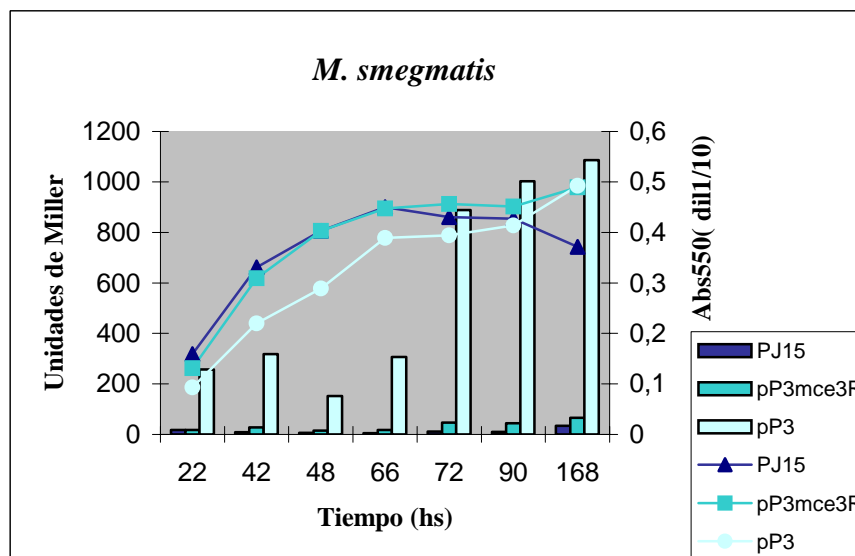
**A**



B



C



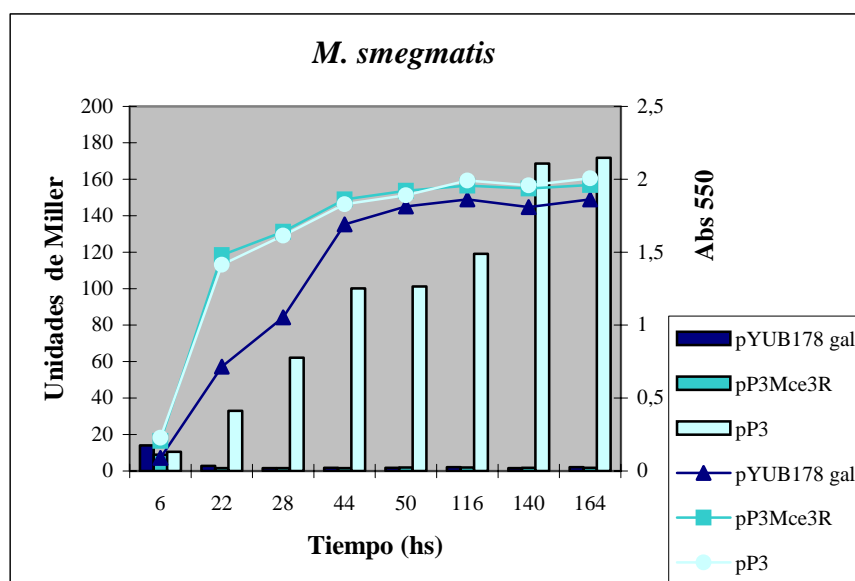
A. Representación de la región intergénica P3 y el gen *mce3R* fusionados a  $\beta$ -galactosidasa en el vector replicativo pJEM15. El esquema es representativo y no está en escala.

El efecto de Mce3R en la actividad promotora de la región intergénica P3 se evaluó midiendo la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a través del tiempo en cultivos de *M. tuberculosis* (B) o *M. smegmatis* (C) transformadas con pJEM15 (vector sólo como control), pP3 (construcción que lleva sólo la región intergénica *Rv1963c- Rv1964*) y pP3-*mce3R* (construcción que además contiene el gen regulador Mce3R). Los datos se expresan en unidades de Miller. Se muestra como ejemplo una de numerosas curvas realizadas, obteniendo resultados similares.

### 1.2.3 Estudios de regulación en *M. smegmatis* utilizando un vector integrativo

Para evaluar el efecto represor de Mce3R sobre P3 cuando es expresado en un sistema de copia única, se construyó un vector integrativo que lleva un gen reportero para el estudio de promotores en micobacterias. El vector pYUB178 (Lee *et al.* 1991) posee el gen *int* y el sitio *attP* del micobacteriofago L5 que permite la integración estable en el genoma micobacteriano en el sitio *attB*. Se clonó entonces el gen *lacZ* para dar el vector pYUB178-*gal*. Róo arriba del gen reportero se insertó la región P3 en presencia o ausencia del gen regulador Mce3R resultando en los plásmidos pYUB178*gal*- P3 y pYUB178*gal*-P3-Mce3R. En la **Figura 14** se muestran los valores enzimáticos obtenidos a lo largo del tiempo de cultivo expresados como unidades de Miller. Nuevamente podemos observar que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa es mayor en ausencia de Mce3R y por lo tanto confirmar que Mce3R es un regulador negativo de la expresión del operón *mce3*, activo durante el crecimiento *in vitro*.

**Figura 14**



**Efecto de Mce3R en la actividad promotora de la región intergénica P3.** La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se evaluó a través del tiempo en cultivos de *M. smegmatis* transformadas con pYUB178*gal* (vector sólo como control), pP3 (pYUB178*gal*-P3) y pP3-*mce3R* (pYUB178*gal*-P3Mce3R). Los datos se expresan en unidades de Miller. Se muestra como ejemplo una de numerosas curvas realizadas, obteniendo resultados similares.

## 2. Análisis de la región intergénica P3

### 2.1 Mapeo del promotor del operón *mce3*

#### 2.1.1 Fusiones transcripcionales a $\beta$ - galactosidasa de diferentes deleciones de la región P3 en el vector replicativo pJEM15

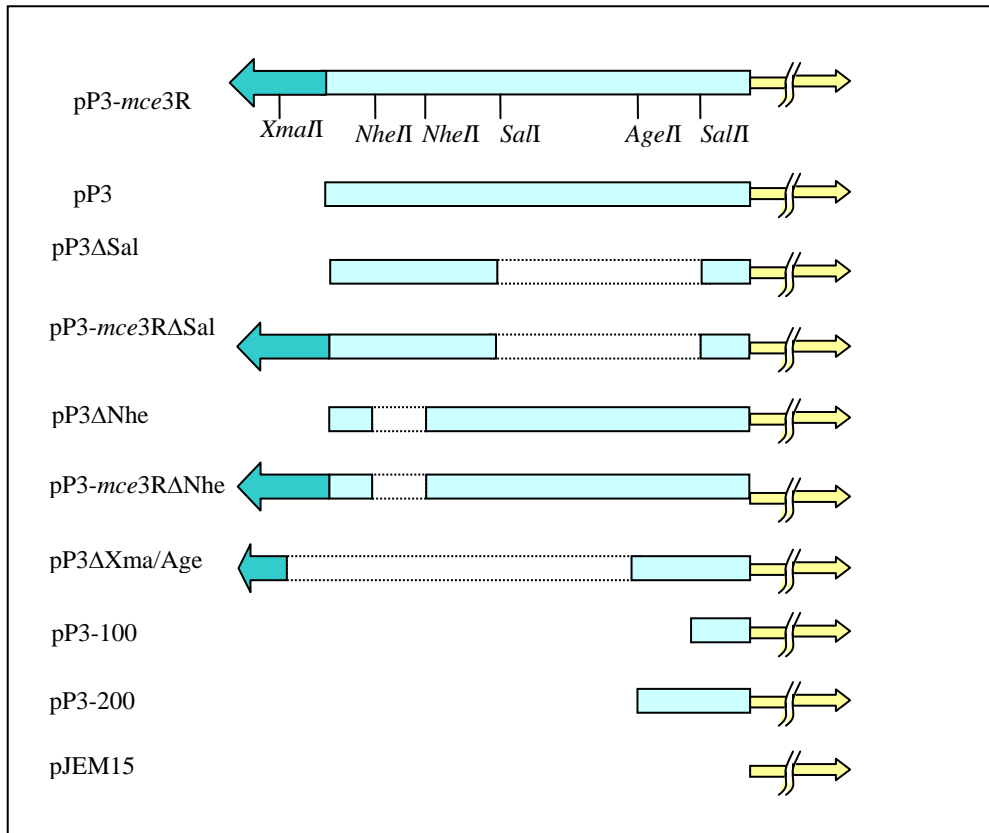
Con el objetivo de definir la región promotora del operón *mce3*, distintos segmentos de la región intergénica P3, obtenidos por deleciones con enzimas de restricción, se evaluaron en su actividad promotora en *M. smegmatis* mediante fusión a  $\beta$ -galactosidasa en el vector replicativo pJEM15 (**Figura 15**).

La cepa conteniendo la construcción pP3 $\Delta$ Xma/Age presentó una alta actividad de  $\beta$ -galactosidasa y esto podría deberse a que la deleción afecta la expresión de la proteína Mce3R. Este resultado también permite suponer que el promotor del operón *mce3* estaría comprendido entre el sitio Age y el codón de iniciación del gen Rv1964. El sitio AgeI está ubicado 266 pb río arriba de dicho ATG. La deleción del fragmento comprendido entre los sitios SalI ( $\Delta$ Sal) suprimió la actividad de  $\beta$ -galactosidasa, aún en la construcción que no contiene el represor Mce3R, por lo que se puede presumir que algún elemento del promotor estaría localizado entre ambos sitios SalI. Esta deleción afecta un fragmento de 458 pb comprendidas entre las posiciones -534 y -76 respecto del ATG del gen Rv1964. La deleción del fragmento comprendido entre los sitios Nhe ( $\Delta$ Nhe) no alteró la actividad del gen reportero, por lo que no estaría afectando ni la región promotora ni el sitio de unión del regulador.

Para localizar más precisamente el promotor del operón *mce3* los fragmentos de 100 y 206 pb comprendidas río arriba del codón de iniciación del gen Rv1964 (P3-100 y P3-200 respectivamente) se obtuvieron por PCR y se evaluaron en su actividad promotora. P3-200 presentó una actividad de  $\beta$ -galactosidasa 80 veces mayor que P3-100, indicando que entre las 100 y 206 pb río arriba del inicio de Rv1964 se encuentra un promotor activo.

Figura 15

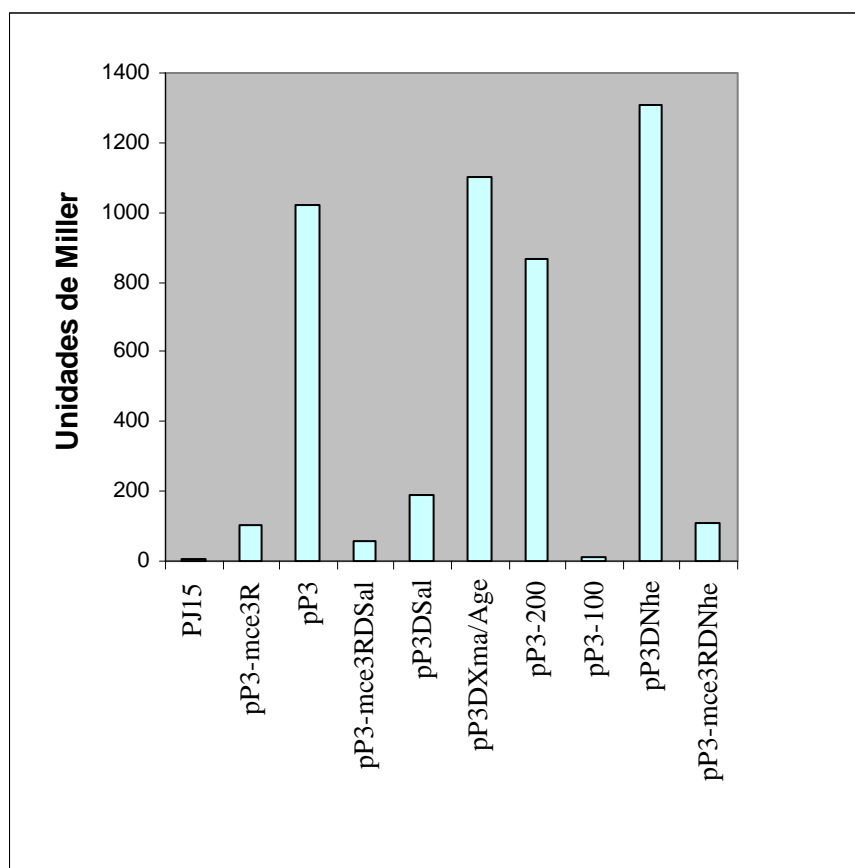
A



Actividad de  $\beta$ - galactosidasa de los distintos segmentos de la región intergénica P3 en presencia o ausencia del regulador Mce3R. (A) Representación esquemática de las distintas deleciones con las enzimas de restricción señaladas en la construcción completa pP3-mce3R. El gen regulador Mce3R está representado con la flecha verde, la región intergénica en celeste, las deleciones en blanco y *lacZ* con la flecha amarilla.

B





**(B) Actividad de  $\beta$ - galactosidasa correspondiente a las distintas construcciones obtenidas por delección de fragmentos de restricción expresada en unidades de Miller. En el gráfico se muestra un solo punto tomado a partir de cultivos en fase de crecimiento exponencial de numerosas mediciones realizadas, obteniendo resultados similares**

### 2.1.2 Identificación del sitio de inicio de la transcripción

A partir de los experimentos presentados en la sección previa fue posible localizar una región promotora del operón *mce3* en la región acotada a las bases 100 y 206 dentro de P3-200. En esta sección se describen los ensayos realizados para el estudio más detallado de dicha región y el mapeo del promotor de *mce3*.

Para determinar el sitio de inicio de la transcripción del operón se realizaron experimentos de *primer extension* empleando un oligonucleótido complementario a la región codificante del gen *Rv1964*. Los resultados revelaron un posible sitio de inicio de la transcripción (TSP) en la citosina ubicada 143 nucleótidos río arriba del ATG de

dicho gen y, con una menor intensidad, otro probable TSP en la citosina situada cinco bases río abajo de la anterior (**Figura 16A**).

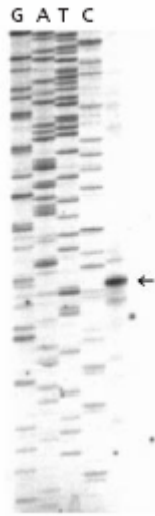
### 2.1.3 Análisis *in silico* de la región promotora del operón *mce3*

La búsqueda de secuencias promotoras mediante un programa de predicción de promotores procariontes (<http://www.fruitfly.org>) localizó un probable promotor entre las bases -230 y -170 respecto del ATG del gen *Rv1964*. Sin embargo, como se describió en la sección 2.1.1 el promotor seguía manteniendo su máxima actividad en la región P3-200 que sólo excluye 24 pb de este segmento -230-170. El programa DNA *Strider* identificó una posible secuencia -10 TATATG entre -182 y -178 que se corresponde 4/6 con la secuencia -10 típica de *E. coli* y una posible caja -35 TAGCAA entre las bases -204 y -198 que se corresponde en 4/6 con el *box* -35 del promotor *hsp60* de BCG (Mudler *et al.* 1997, Gomez *et al.* 2000). Aunque estas secuencias colocalizan con el promotor predicho, el motivo -10 se ubica a -32 nucleótidos del TSP. Otra secuencia con menor similitud TATTTA se localiza a -12 bases del TSP propuesto y probables sitios de unión a ribosomas se encontraron entre las bases 36 y 10 río arriba del ATG de *Rv1964* (**Figura 16B**).

Mediante la búsqueda *in silico* de un posible sitio de unión de reguladores Tet (operador *tet*) en la región P3-200 utilizando el programa DNA *Strider*, se identificó una secuencia con alta homología (10/14 bases) al consenso descrito para el operador del regulador TetR de *E. coli* TCCCTATCAGTGAT (Grkovik *et al.* 2002). En la **Figura 16B** dicha región se destaca en verde y puede observarse que se superpone con el TSP predicho por *primer extension*. Por similitud a la nomenclatura utilizada en *E. coli* fue denominada *tetO<sub>1</sub>'*.

Figura 16

A



B

```

TACTAGCAAGGATACATCATAGCCAATATATGCCAGTTTGCATTGCTAT
      tetO'1
TTACCGATCAGTTGTCCAAGCAATCGCGTATTGGCTATGGACATCAGC
GGTTCTGCCGCGTACGCTCACCAATGTCACCGATCGTCGACCTGTCCGGGGGGCCA
GCGTGCGCCACCTCACCCAACGGCCCAGCATCGAATCCAGCTGGTGCGCCGCGCC

TCCCTATCAGTGAT tetR E. coli
TACCGATCAGTTGT tetO'1

```

(A). El sitio de inicio de la transcripción TSP se determinó por *primer extension*. En la autorradiografía se señala con una flecha. La secuencia se llevó a cabo a partir del oligonucleótido low861 marcado radioactivamente con  $\gamma$ ATP. (B). Región promotora del operón *mce3* localizada en la región P3- 200 (en mayor tamaño de letra se señala la región comprendida entre las 206 y 100 pb). Los consensos -10 TATATG y -35 TAGCAA se señalan en negrita, y en itálica dos posibles sitios de unión a ribosomas (RBS). El TSP se indica en mayor tamaño de letra y subrayado. En verde se destaca el motivo *tetO'*<sub>1</sub>. Debajo se muestra el alineamiento de los motivos *tet* de *E. coli* y *tetO'*<sub>1</sub> señalando en rojo las bases más conservadas.

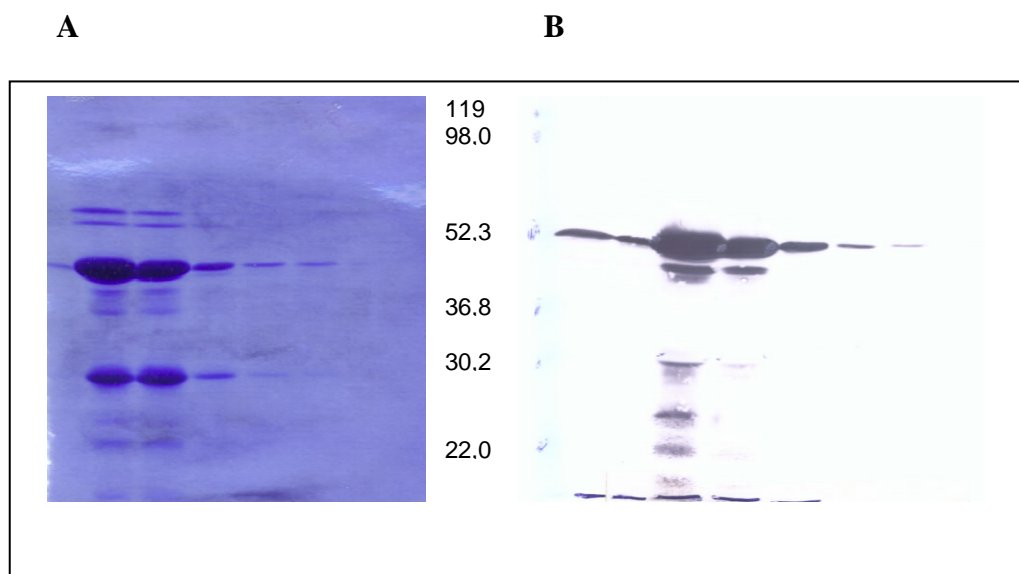
## 2.2 Unión de Mce3R a la región promotora del operón *mce3*, P3-200

### 2.2.1 Expresión y purificación de Mce3R en *E. coli*

Los represores transcripcionales suelen actuar uniéndose a secuencias consenso que generalmente se superponen con el promotor o con el TSP llamadas operadores, bloqueando así el inicio de la transcripción. En función de los datos obtenidos previamente, la proteína Mce3R fue evaluada en su capacidad de unirse a la región promotora del operón *mce3* (P3- 200) *in vitro* mediante ensayos de retardo en geles de poliacrilamida (*gel shift*).

Para producir grandes cantidades de la proteína recombinante en *E. coli*, la región codificante del gen *mce3R* se clonó en el vector de expresión pRSET-A que permite la fusión traduccional a un hexapéptido de histidinas. Con el plásmido resultante se transformaron bacterias *E. coli* BL21 ( $\lambda$ DE3) competentes, la expresión de la proteína recombinante (Mce3R) se indujo por el agregado de IPTG y se evaluó la expresión en las fracciones soluble e insoluble. La proteína formó cuerpos de inclusión en las condiciones de cultivo e inducción utilizadas comúnmente en el laboratorio (37°C e inducción con 1M de IPTG), por lo que inicialmente no fue posible la purificación en condiciones nativas. Luego de evaluar diferentes condiciones de cultivo y *buffers* de extracción, se lograron obtener altos niveles de expresión de la proteína recombinante soluble por el agregado de 0,1 M de IPTG a un cultivo de *E. coli* BL21 crecido a 28°C, y su posterior purificación en condiciones nativas en columnas de níquel- agarosa. En la **Figura 17** puede observarse que la proteína fue purificada prácticamente a homogeneidad y que se obtuvieron algunos productos de degradación.

Figura 17



**Purificación de Mce3R en columna de níquel. (A).** Tinción con Azul de *Coomassie* correspondiente a las distintas fracciones de elución con el agregado de 250 mM, 500 mM y 1M de IPTG. **(B).** *Western blot* de las mismas fracciones utilizando el anticuerpo monoclonal Anti Histidina (Amersham dilución 1: 3000), el segundo anticuerpo conjugado a fosfatasa alcalina y revelado con NBT/ BCIP. La banda de aproximadamente 50kDa corresponde al tamaño esperado para la proteína recombinante y las más pequeñas corresponden a productos de degradación. El marcador de peso molecular fue *Broad Range prestain* de Biorad

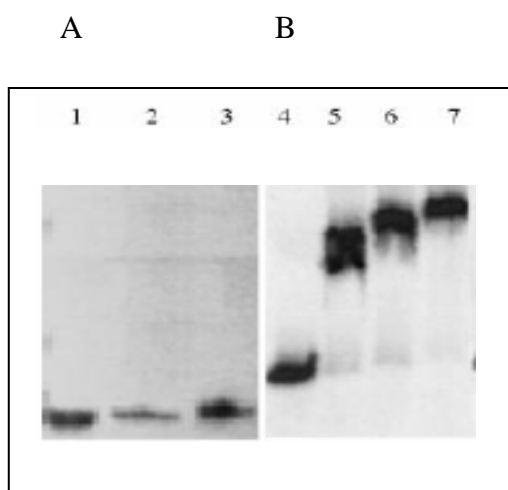
### 2.2.2 Estudio de la interacción de Mce3R con la región P3-200 mediante geles de retardo

Posteriormente se evaluó la capacidad de Mce3R de unirse a la región P3-200 que contiene el promotor del operón *mce3*. Para ello se evaluaron diferentes sondas en los experimentos de retardo en geles de poliacrilamida en presencia de concentraciones crecientes de proteína purificada. Mce3R se unió al fragmento correspondiente a P3-200 (206 pb río arriba del codón de iniciación de Rv1964) en una manera dependiente de la dosis, mientras que no se observó unión al fragmento correspondiente a P3-100 (100 bases río arriba del inicio de Rv1964) en ninguna de las concentraciones de proteína evaluadas (**Figura 18**). Estos resultados demuestran que al menos un sitio de unión de

Mce3R a la región promotora del operón *mce3* estaría localizado entre las bases 100 y 206 río arriba del ATG de Rv1964 y corroboran los resultados obtenidos en las secciones 2.1.1 y 2.1.3.

La disminución en la movilidad de la banda retardada a concentraciones mayores de proteína (calles 6 y 7) podría deberse o bien a la unión de Mce3R a otro sitio en P3-200 o de otra molécula de Mce3R a la proteína ya unida.

**Figura 18**



Ensayos de retardo en geles de poliacrilamida. En el panel (A) se utilizó como sonda el fragmento P3-100 y en el (B) P3-200, marcadas radioactivamente con  $\gamma$ ATP. Las calles 1 y 4 corresponden a sonda sola y las calles 2, 3, 5, 6 y 7 a las interacciones en presencia de concentraciones crecientes de proteína (2-16 $\mu$ g). Se muestra un autorradiografía de varios experimentos realizados obteniendo igual resultado.

### 2.2.3 Identificación del motivo *tet* de *M. tuberculosis* en P3-200

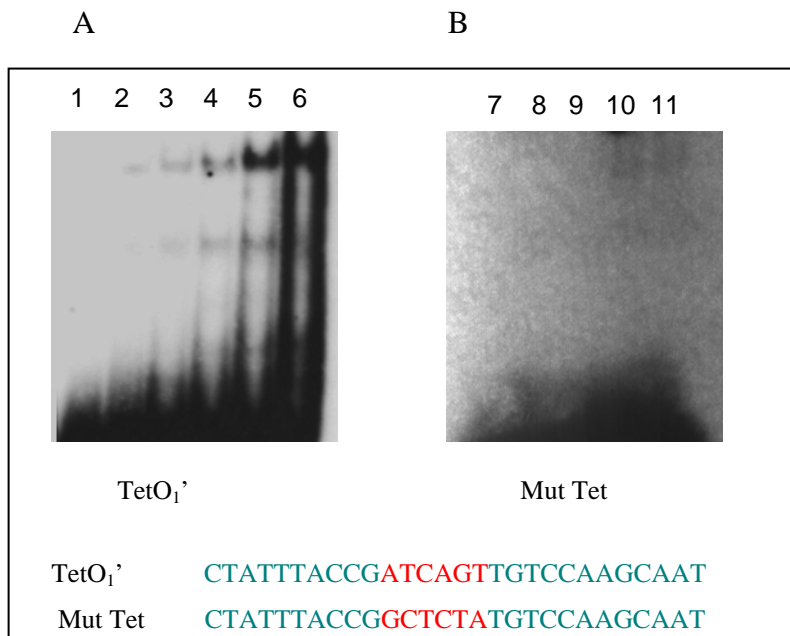
Para caracterizar detalladamente el sitio de unión de Mce3R al promotor P3-200, y definir un motivo *tet* al que se une en *M. tuberculosis*, se diseñó un oligonucleótido doble cadena que comprende la región denominada *tetO*<sub>1</sub>'. Este oligo se utilizó para la generación de sondas a ser evaluadas en los experimentos de geles de retardo. También se utilizó una sonda conteniendo mutaciones al azar en las seis bases más conservadas entre los motivos *tet* de *E. coli* y *M. tuberculosis* (*core*). En la **Figura 19** se muestra la interacción de ambas sondas denominadas TetO<sub>1</sub>' y Mut Tet con el regulador Mce3R.

Se observó una interacción específica entre la sonda TetO<sub>1</sub>' y Mce3R dependiente de la concentración de proteína.

La sonda Tet mutada no parece interactuar con el regulador Mce3R puesto que no se observó retardo en ninguna de las concentraciones proteicas ensayadas.

Estos resultados sugieren que la región identificada en P3- 200, tetO<sub>1</sub>' homóloga al operador *tet* de *E. coli* podría corresponder al operador *tet* de *M. tuberculosis* y que las bases del *core* central conservadas entre los operadores *tet* estarían involucradas en la interacción con Mce3R.

**Figura 19**



**Interacción de Mce3R con las sondas (A). TetO<sub>1</sub>' y (B). Mut Tet (Consenso mutado) marcadas radioactivamente con  $\gamma$ ATP. Las calles 1, y 7 corresponden a sonda sola, la calle 2 a la interacción en presencia de 1  $\mu$ g de proteína purificada, las calles 3 y 8 a 2  $\mu$ g de proteína purificada, las calles 4 y 9 a 4  $\mu$ g de proteína purificada, las calles 5 y 10 a 8  $\mu$ g de proteína purificada, las calles 6 y 11 a 16  $\mu$ g de proteína purificada. Las secuencias de las sondas se muestran debajo señalando en verde el consenso Tet, en rojo las seis bases más conservadas (*core*) y mutadas en Mut Tet.**

#### 2.2.4 Estudio de la interacción de Mce3R con la región P3-200 mediante ensayos de fusión a $\beta$ -galactosidasa

Con el objetivo de confirmar los resultados previos y poder definir el motivo *tet* en *M. tuberculosis* al que se une Mce3R se empleó la técnica de mutagénesis dirigida para modificar el consenso *tet* de *M. tuberculosis* conservado *tetO*<sub>1</sub>' en la región promotora P3-200. La región resultante P3-200Mut fue clonada en el vector pYUB178-*gal* para dar el plásmido pYUB178-*gal* P3-200Mut el cual fue utilizado junto con el plásmido que lleva la región P3-200 salvaje pYUB178-*gal* P3-200, para transformar la cepa de *M. smegmatis* y determinar la actividad de ambos promotores en presencia o ausencia del regulador. Como puede observarse, la mutación no afectó la actividad promotora de P3-200. Estos ensayos mostraron una disminución de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en presencia de Mce3R con respecto a la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en ausencia del regulador, aún en la construcción que lleva la mutación en el motivo *tetO*<sub>1</sub>' (**Figura 20 C**). Sin embargo en la construcción P3-200 que lleva *tetO*<sub>1</sub>' tal cual esta disminución fue alrededor de ocho veces, mientras que en la construcción que lleva el motivo *tetO*<sub>1</sub>' mutado la misma fue de sólo dos veces (**Figura 20C**).

Analizando con mayor detalle la región P3-200 identificamos otra secuencia río abajo de *tetO*<sub>1</sub>' con menor homología al consenso *tet* de *E. coli* (8/14 bases) pero con alta homología aún por las regiones adyacentes a *tetO*<sub>1</sub>' que fue denominado *tetO*<sub>2</sub>'. En la **Figura 20 A** se muestra nuevamente la región correspondiente a P3-200 señalando en verde ambos motivos *tetO*'. En la parte **B** de la figura se detalla el alineamiento de los motivos *tetO*'<sub>1</sub> y <sub>2</sub> y se señalan en rojo las bases más conservadas.

La presencia de otro motivo *tet* (*tetO*'<sub>2</sub>) en P3-200 explicaría por qué la mutación de las principales bases en el consenso *tetO*<sub>1</sub>' no elimina por completo el efecto represor de Mce3R. Estos resultados junto con los obtenidos en los experimentos anteriores de *gel shift* nos permiten concluir que las bases ATCAGT correspondientes a *tetO*'<sub>1</sub> son necesarias para la interacción con Mce3R y que el motivo *tetO*'<sub>2</sub> también estaría involucrado en la unión de Mce3R para la completa represión de P3-200.



Figura 20

A

```

TACTAGCAAGATACATCATAGCCAATATATGCCAGTTTGCATTGCTAT
      tetO'1                                tetO'2
TTACCGATCAGTTGTCCAAGCAATCGCGTATTGGCTATGGACATCAGC
GGTTCTGCCGCGTACGCTCACCAATGTCACCGATCGTCGACCTGTCCGGGGGGCCA
GCGTGCGCCACCTCACCCAACGGCCCAGCATCGAATCCAGCTGGTGCGCCGCGCC

```

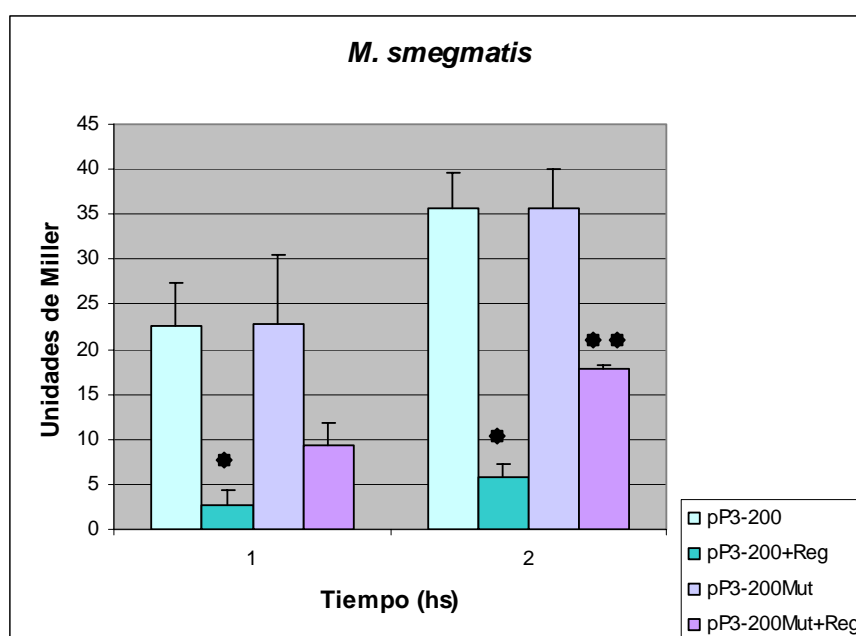
B

```

TACCGATCAGTTGT tetO'1
TGGACATCAGCGGT tetO'2

```

C



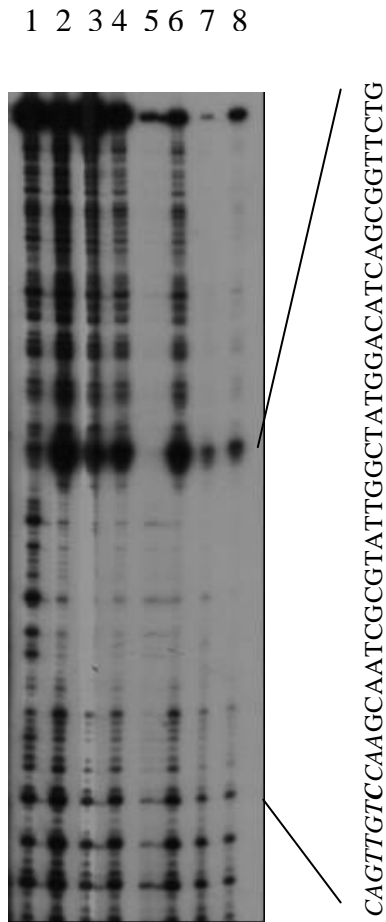
(A) Región promotora del operón *mce3* localizada en la región P3- 200 (ver Figura 6) destacando en verde los motivos *tetO'*<sub>1</sub> y *tetO'*<sub>2</sub>. (B). Alineamiento de los motivos *tetO'*<sub>1</sub> y *tetO'*<sub>2</sub>. En rojo se señalan las bases conservadas. (C). Actividad de  $\beta$ - galactosidasa de dos puntos de cultivos de *M. smegmatis* transformadas con pP3-200 (pYUB178gal-P3-200), pP3-200-Mce3R (pYUB178gal-P3-200+ pNVB-*mce3R*), pP3-200Mut (pYUB178gal-P3-200Mut) y pP3-200Mut-Mce3R (pYUB178gal-P3-200Mut+ pNVB-*mce3R*). Los datos se expresan en unidades de Miller y representan el promedio de dos experimentos independientes con sus respectivos desvíos estándar. \*Corresponde a diferencias estadísticamente significativas entre las construcciones pP3-200 y pP3-200 Mce3R. \*\* Corresponde a diferencias estadísticamente significativas entre pP3-200 Mce3R y pP3-200Mut Mce3R según la Prueba T con un valor  $p < 0.05$ .

### 2.2.5 Mapeo del sitio de unión de Mce3R a la región por promotora mediante la técnica de *Footprinting*.

Para identificar y mapear experimentalmente el sitio de unión de Mce3R a la región promotora del operón *mce3* se utilizó la técnica de *Footprinting*. Este ensayo consiste en la protección a la digestión por la enzima DNasa I de una secuencia de ADN por la unión de una proteína con afinidad por ácidos nucleicos. La técnica fue puesta a punto en el laboratorio evaluando distintas concentraciones de proteína purificada utilizada en la interacción, distintas cantidades de DNasa I y diferentes tiempos de reacción. Así se determinó que las bases que resultan protegidas por Mce3R en P3- 200 de la digestión por la DNasaI van desde -7 hasta +40 con respecto al TSP identificado por los experimentos de *primer extension* (**Figura 21**). Esta región no abarca completamente, y sólo se superpone parcialmente con el motivo *tetO*<sub>1</sub>' comprendido entre las bases -14 y -1 y si comprende totalmente el motivo *tetO*<sub>2</sub>' situado entre las bases +23 y +36. De acuerdo a lo observado en el *Footprinting*, la ausencia de protección completa en el motivo *tetO*<sub>1</sub>' podría indicar que el mismo sería de baja afinidad y las concentraciones proteicas utilizadas en el ensayo no serían suficientes para proteger eficientemente los dos motivos *tet*. En base a estos datos podríamos inferir que Mce3R reconoce con mayor afinidad el motivo de menor homología con el de *E. coli tetO*'<sub>2</sub>, y por lo tanto el motivo *tetO*' micobacteriano consistiría en un consenso con algunas diferencias respecto del de *E. coli*.

Por otro lado, estos resultados estarían indicando que el operador *tet* reconocido por Mce3R en micobacterias también consiste, al igual que el de *E. coli*, en dos motivos *tet* de diferente afinidad. En la figura se observan sitios de hipersensibilidad que indican una mayor exposición del ADN a la DNasaI provocado por la unión de la proteína reguladora.

Figura 21

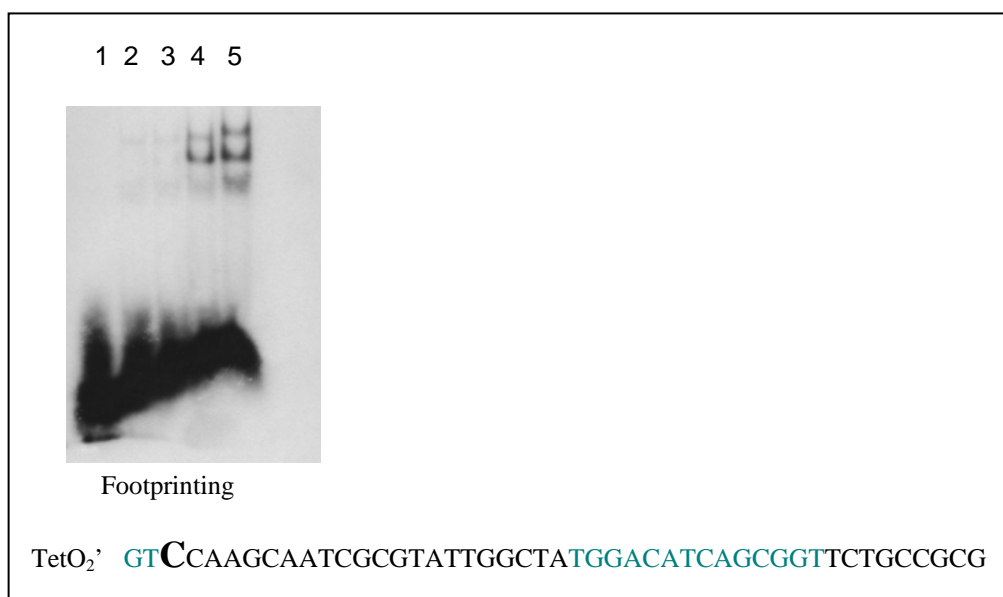


Identificación del sitio de unión de Mce3R a la región promotora del operón *mce3*. Autorradiografía del ensayo de *Footprinting* utilizando la sonda P3- 200 marcada radioactivamente con  $\gamma$ ATP e incubado con 0  $\mu$ g (calles 1 y 5) u 8  $\mu$ g (calles 2, 3, 4, 6, 7 y 8) de proteína recombinante purificada. Las reacciones se incubaron con 1X DNasaI (calles 1 a 4) o 2X DNasaI (calles 5 a 8) por 1 minuto (calles 2, 5, y 6), 3 minutos (calles 1, 3 y 7) o 10 minutos (calles 4 y 8).

### 2.2.6 Evaluación de la interacción de Mce3R con la región identificada en los experimentos de *Footprinting*

Finalmente, para evaluar la capacidad de Mce3R de unirse *in vitro* a la región protegida por *Footprinting* y que comprende el motivo *tetO<sub>2</sub>'*, se diseñó una sonda doble cadena de dicha región para ser evaluada en experimentos de retardo en gel. Se observó una interacción específica entre la sonda *TetO<sub>2</sub>'* y Mce3R dependiente de la concentración de proteína, confirmando los resultados observados en el experimento de *Footprinting* (Figura 22).

Figura 22



Interacción de Mce3R con la sonda *TetO<sub>2</sub>'* marcada radiactivamente con  $\gamma$ ATP. Autorradiografía del experimento de *gel shift*: calle 1, sonda sola, calle 2, interacción en presencia de 2  $\mu$ g de proteína purificada, calle 3, con 4  $\mu$ g de proteína purificada, calle 4 con 8  $\mu$ g de proteína purificada, calle 5 con 16  $\mu$ g de proteína purificada. En la secuencia de la sonda se señalan en verde el consenso *tetO<sub>2</sub>'* y parte de *tetO<sub>1</sub>'*.

## 2.3 Análisis de la región promotora de *mce3R*

### 2.3.1 Análisis *in silico*

Empleando herramientas bioinformáticas para la búsqueda de promotores procariotas en la región intergénica P3 (<http://www.softberry.com>), se identificaron posibles secuencias -10 y -35 en la región ubicada río arriba del gen *mce3R*. Un posible *box* -10 CGCGATGAT fue ubicado 242 bases río arriba del codón de iniciación del gen *mce3R*, y un posible *box* -35 en la posición -269 correspondiente a las bases TTGCAA (Figura 13). Mediante el análisis *in silico* utilizando el programa DNA *Strider* para la búsqueda de motivos *tet* se identificó un posible operador *tetO'* localizado entre las bases -300/-313 a partir del ATG de *Mce3R*. Este motivo presenta una homología con respecto al consenso *tet* de *E. coli* de 11/14 bases. También se identificaron otras dos secuencias con alta homología al consenso *tet* de *E. coli* (9/14 y 10/14) y muy similares entre sí en las posiciones -279/-292 y -196/-209. Dichas regiones fueron denominadas *tetO<sub>3</sub>'*, *tetO<sub>4</sub>'* y *tetO<sub>5</sub>'* respectivamente (**Figura 23**). En la figura también se muestran los operadores *tetO<sub>1</sub>'* y *tetO<sub>2</sub>'* identificados en P3-200 comprendidos entre las bases -14/-1 y +23/+36 respecto del TSP propuesto para el operón *mce3*. Todos los operadores se muestran alineados con el correspondiente *tet* de *E. coli* destacando en rojo las bases conservadas. Estos datos, sumados a los resultados obtenidos previamente permiten proponer el siguiente motivo *tet'* reconocido por *Mce3R* en *M. tuberculosis*: Tn c/g nnATCA g/c t/c nnT.

La presencia de estos operadores *tet* en las inmediaciones de la región promotora de *mce3R* hace suponer que *Mce3R* regula su propia transcripción, y es por ello que se procedió a evaluar si *Mce3R* autorregula su expresión.

Figura 23

TTGCGCACCGGAATCACAAATCCTGCTAGCAGCATCGCCTCAGCTTCACCCCGCTCATTC  
 TTCACCTCGAATGCGCCGGTCACCGGGTGCGACACTTACCGGCCGTCGTTTCATGGTGACG  
 TTTCGAGGCTGTGCTGCTGCCAAGACCCAGGAAGTCTCGGACGAGAGACTCGCTAGCCT  
 CCGTGGTATCGGGCATCCCTATCACCCCTGCTCGATCCTCAATATCGGACTAACAAAATA  
 CATCATCGCGCCTGTATACGCGATTACATTGCAATTTATCCTTATCACCCCTTCTTAGAGTG  
 CATATCAGTAATAGACATATCGCGCTCCTCGCGCCCCAGGAGGCGGTGACGAATTCGCC  
 GTGCGCAACGACATGAGCCGTCGCTGAGCCTGAAAACCTGCAGACAAAGCGCGAGTGGG  
 GGCTGGCAAACTACAGGCTCGTTAGCAGCAAGTTGCTTCGACGACCATGGTGGCAACCT  
 CGCCGGTCGCGAAGGCTCTGGTCGGCGGGCCGAATCGAGGCGGTGAGGATGCGGCATC  
 CGATCACCGCCCGTCGGGCGCGCTGTTGATGCCTGATCGTGGTGCCTCGCCAGCGTGACT  
 CGAGCCAACGGCTTGACCGGTGATGCGCCTGTCGGCCGCAAGGCAGCAGAGCACATCG  
 CCCC GCGCTATAGGATACTAGCAAGATACATCATAGCCAATATATGCCAGTTTGCATT  
**GCTATTACCGATCAGTTGT**CCAAGCAATCGCGTATTGGCTATGGACATCAGCGGT  
 TCTGCCGCGTACGCTACCAATGTCACCGATCGTCGACCTGTCCGGGGGGCCAGCG  
 TGCGCCACCTCACCCAACGGCCCAGCATCGAATCCAGCTGGTGCGCCGCGCC

TCCCTATCAGTGAT	TetR seq <i>E. coli</i>
TACCGATCAGTTGT	-14/-1 <i>tetO</i> <sub>1</sub> ' (10/14)
TGGACATCAGCGGT	+23/+36 <i>tetO</i> <sub>2</sub> ' (8/14)
TGCATATCAGTAAT	-300/-313 <i>tetO</i> <sub>3</sub> ' (11/14)
TCCTTATCACCCCT	-279/-292 <i>tetO</i> <sub>4</sub> ' (9/14)
TCCCTATCACCCCT	-196/-209 <i>tetO</i> <sub>5</sub> ' (10/14)

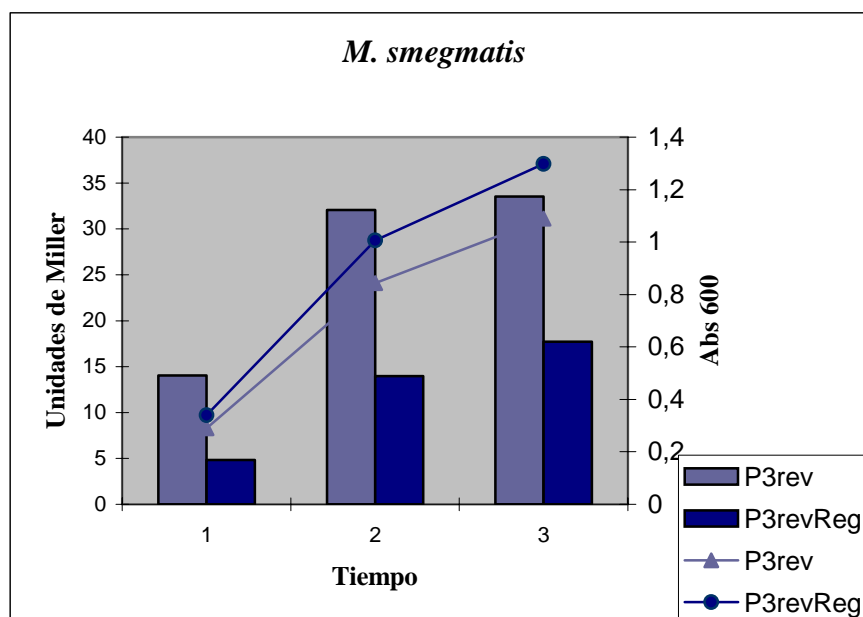
Secuencia correspondiente a la región intergénica completa comprendida entre los genes *mce3R* y *Rv1964* (P3). En negrita se destaca la región P3- 200 utilizada en los ensayos de mapeo del promotor, *gel shift* y *footprinting*. La C subrayada corresponde al TSP identificado por *primer extension*. Las regiones -10 y -35 correspondientes a los promotores de *mce3R* y del operón *mce3* se muestran en sombreado. En azul y en verde se resaltan las regiones con homología al consenso *tet* de *E. coli* (*tetO*<sub>3</sub>', *tetO*<sub>4</sub>'y *tetO*<sub>5</sub>'y *tetO*<sub>1</sub>' *tetO*<sub>2</sub>'respectivamente). Finalmente, se muestra el alineamiento de los 5 motivos *tet* encontrados junto al consenso *tet* de *E. coli*.

### 2.3.2 Estudio del rol de Mce3R en la regulación de su propia transcripción

La presencia de tres posibles motivos *tetO'* en las inmediaciones de las regiones -10 y -35 identificadas *in silico* como posible región promotora de Mce3R, sumado a lo descrito en la bibliografía para otros reguladores transcripcionales donde se señala que generalmente los mismos regulan su propia transcripción (Ramos *et al.*2005, Recchi *et al.*2003), nos propusimos evaluar si Mce3R autorregula su expresión. Siguiendo con la misma estrategia experimental se determinó la actividad de  $\beta$ - galactosidasa de la cepa de *M. smegmatis* transformada con la región intergénica completa P3 clonada en sentido inverso (P3rev) en el vector integrativo pYUB178-*gal*. Se observó una actividad promotora más débil que la observada para P3 en sentido directo, sugiriendo que la expresión de *mce3R* sería menor que la de los genes estructurales del operón *mce3*. En presencia de Mce3R expresado en *trans* en un vector replicativo bajo su propio promotor, la actividad promotora disminuye a la mitad, demostrando que Mce3R autorregula su propia transcripción (**Figura 24**).

Las diferencias observadas en los niveles de represión de ambos promotores P3-200 y P3rev permiten suponer que Mce3R reconoce diferentes motivos *tet* con mayor o menor afinidad indicando la necesidad de controlar minuciosamente la expresión de los genes que regula.

Figura 24



Efecto de Mce3R en la actividad promotora de la región intergénica P3rev. La actividad de  $\beta$ -galactosidasa se evaluó a través del tiempo en cultivos de *M. smegmatis* transformadas con pP3rev (pYUB178gal-P3rev) y pP3rev-*mce3R* (pYUB178gal-P3rev+pNVB-Mce3R). Los datos se expresan en unidades de Miller. Se muestra como ejemplo una de numerosas curvas realizadas, obteniendo resultados similares.



### 3. Expresión de los operones *mce* en *M. tuberculosis*

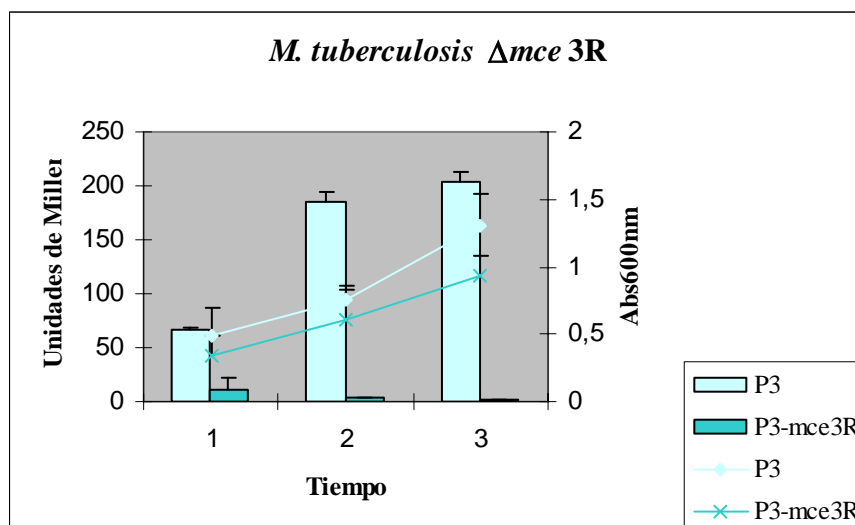
#### 3.1 Análisis de la expresión del operón *mce3* en *M. tuberculosis*

##### 3.1.1 Estudios de la actividad promotora de P3 por fusión a $\beta$ -galactosidasa

En vista de los resultados obtenidos que sugieren que la expresión de *mce3* está negativamente regulada, y demuestran el rol de Mce3R sobre P3 en el sistema heterólogo de *M. smegmatis*, a continuación se procedió a estudiar la cinética de expresión del operón *mce3* en *M. tuberculosis* mediante la cuantificación de la actividad de su promotor en los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa utilizando el vector de copia única pYUB178gal-P3. Como era de esperar, no se observó actividad de  $\beta$ -galactosidasa en los experimentos realizados en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv salvaje transformada con dicho vector, debido a la presencia del regulador endógeno (datos no mostrados). Por lo tanto, fue necesario obtener una cepa mutante en el gen regulador *mce3R* la que fue utilizada para realizar estos ensayos. La construcción de la mutante y su caracterización se detallan más adelante en este trabajo.

La cepa mutante en el gen regulador  $\Delta mce3R$  fue transformada con los plásmidos pYUB 178gal-P3 y pYUB178gal-P3-*mce3R* para obtener las cepas  $\Delta mce3R$ -P3 y  $\Delta mce3R$ -P3-*mce3R* (complementante) y se midió la actividad enzimática a lo largo del tiempo de cultivo *in vitro*. En la cepa  $\Delta mce3R$ -P3 se observaron altos niveles de actividad del promotor, mientras que en presencia de Mce3R (complementante), éste se encontró totalmente reprimido. Estos resultados confirman el rol de represor de Mce3R sobre la transcripción de *mce3* en *M. tuberculosis* y demuestran que la expresión de este operón se encuentra fuertemente reprimida durante el crecimiento *in vitro* (**Figura 25**).

Figura 25

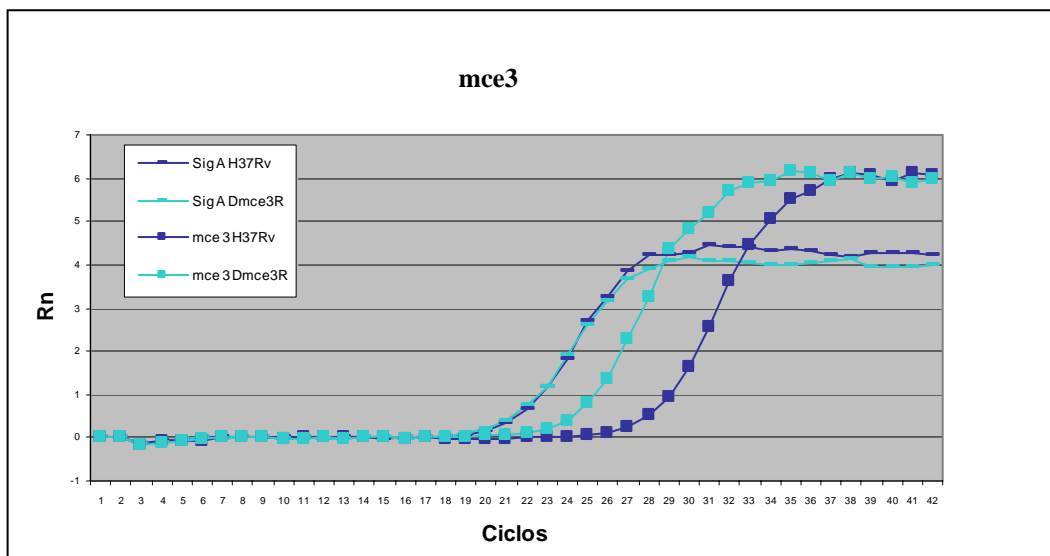


Actividad del promotor del operón *mce3*. Actividad de  $\beta$ - galactosidasa a través del tiempo en cultivos de *M. tuberculosis*  $\Delta mce3R$  transformada con las construcciones pYUB178gal-P3 (promotor del operón *mce3*), pYUB178gal- P3-Mce3R (promotor del operón *mce3* en presencia del regulador Mce3R: complementante). Los datos se expresan en Unidades de Miller y son el resultado del promedio de tres curvas independientes con los respectivos desvíos estándar.

### 3.1.2 Estudios de la expresión del operón *mce3* por RT- PCR cuantitativa

Para confirmar los resultados obtenidos en la sección previa, se evaluó la expresión del operón *mce3* *in vitro* mediante estudios de RT- PCR cuantitativa a partir de ARNm de las cepas H37Rv y  $\Delta mce3R$  en fase exponencial (Figura 26). Para esto se diseñaron oligonucleótidos compatibles con la técnica y que amplifican una región interna del gen *lprM* (Rv1970) del operón *mce3*. En concordancia con las observaciones anteriores, la expresión del operón *mce3* resultó alrededor de 8 veces mayor en la cepa  $\Delta mce3R$  que en la salvaje H37Rv durante la fase exponencial. Los datos se analizaron según el método de cuantificación relativa descrito por Pfaffl (2001), utilizando como calibrador el gen *housekeeping sigA*. Estos resultados confirman categóricamente que Mce3R regula negativamente la expresión del operón *mce3* en *M. tuberculosis* y que dicha regulación es a nivel transcripcional.

Figura 26



Expresión del operón *mce3* *in vitro* mediante estudios de RT-PCR cuantitativa. Los datos se analizaron según el método de cuantificación relativa descrito por Pfaffl (2001), utilizando como calibrador el gen *housekeeping sigA*.  $R (fold) = (E_{target})^{\Delta CP_{target} (control-muestra)} / (E_{referencia})^{\Delta CP_{referencia} (control-muestra)}$ . Donde  $E = 10^{(-1/pendiente)}$ ,  $CP = Ct$ ,  $target = mce3$ ,  $referencia = sigA$ ,  $control =$  cepa *wild type* H37Rv,  $muestra =$  cepa  $\Delta mce3R$ . Las curvas en azul corresponden a la cepa salvaje (H37Rv) y en verde a la mutante ( $\Delta mce3R$ ). Las rayitas corresponden al gen *sigA*, y los cuadrados rellenos al gen *lprM* (Rv1970) del operón *mce3*. Se grafica una curva de varias obtenidas con igual resultado.

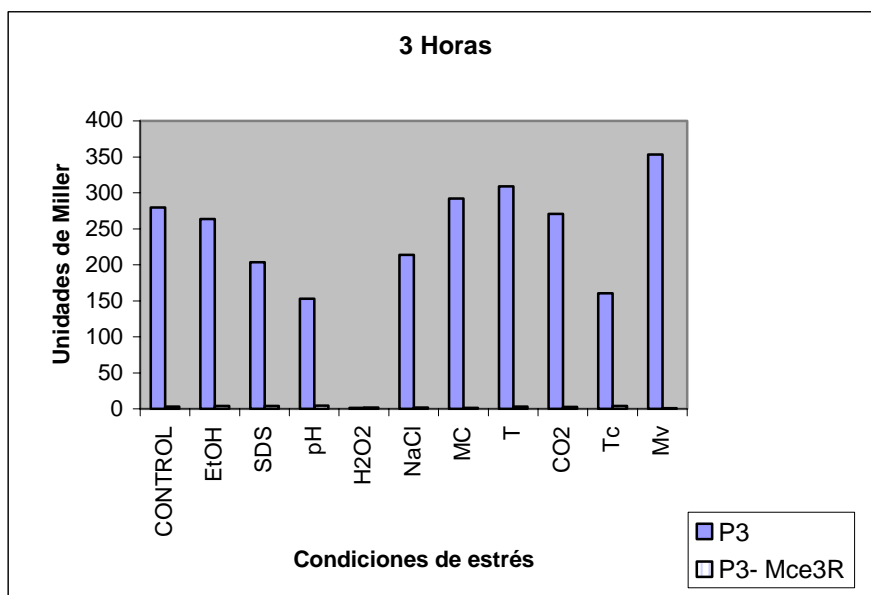
### 3.1.3 Estudios de la expresión del operón *mce3* en condiciones de estrés

Muchos genes de virulencia de bacterias se expresan bajo determinadas condiciones de estrés. Durante la infección la bacteria debe exponerse a intermediarios reactivos de oxígeno y nitrógeno producidos por los macrófagos activados, al bajo pH del fagosoma y a las condiciones de hipoxia del granuloma, a la escasez de nutrientes y a la acción de detergentes. Estos factores podrían contribuir a la inducción de la dormancia. Para evaluar si la expresión del operón *mce3* se induce bajo alguna de estas condiciones, se utilizaron las cepas  $\Delta mce3R$ - P3 y  $\Delta mce3R$ - P3- Mce3R complementante y se evaluó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa a distintos tiempos en cultivos *in vitro* sometidos a diferentes condiciones de estrés. Un cultivo líquido de ambas cepas en fase exponencial fue alicuotado y sometido a condiciones de baja temperatura, etanol, NaCl, SDS, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Tetraciclina, baja tensión de oxígeno (CO<sub>2</sub>), bajo pH, medio condicionado y metilviológeno (un agente que genera iones superóxido O<sub>2</sub><sup>-</sup> produciendo daños en el ADN). A las 3 y 48 horas se midió actividad de  $\beta$ - galactosidasa y los datos obtenidos se compararon con el control sin estrés. Los resultados mostraron que ninguna de las condiciones evaluadas induce la expresión del operón *mce3* (**Figura 27**). La presencia de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> parece interferir en la medición de la actividad de  $\beta$ - galactosidasa ya que la actividad enzimática es baja aún en ausencia del gen regulador.

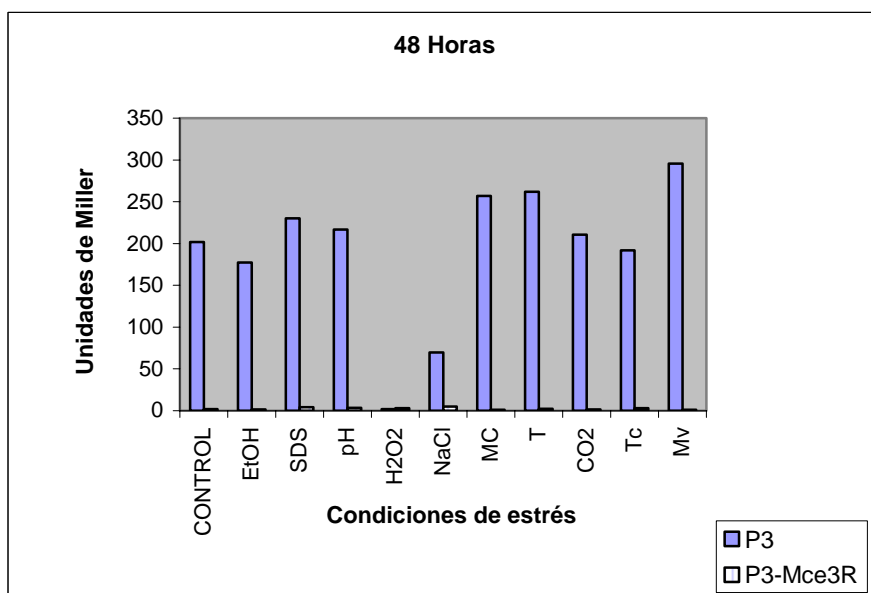
La actividad de  $\beta$ - galactosidasa en presencia del regulador en la cepa  $\Delta mce3R$ - P3- Mce3R en los controles sin tratar fue aproximadamente cien veces menor que en ausencia del mismo en la cepa  $\Delta mce3R$ - P3.

Figura 27

A



B



Efecto de distintas condiciones de estrés en la actividad de  $\beta$ - galactosidasa de la cepa  $\Delta mce3R$  transformada con el vector pYUB178gal-P3 (P3, representada por las barras celestes) y pYUB178gal-P3-mce3R (P3- mce3R, representada por las barras blancas con rayas celestes). El panel (A) corresponde a las mediciones realizadas 3 horas luego del pulso de estrés y el panel (B) a las 48 horas. La actividad enzimática se expresa como unidades de Miller. EtOH: 5% etanol; SDS: 0,05% SDS; pH: ácido acético pH3; H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>: 100mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; NaCl: 0,5M NaCl; MC: medio condicionado, T: baja temperatura 4°C; Tc: 50ng/ml Tc, Mv: 0,25mg/ml metilviológeno.

### 3.1.4 Estudio de la expresión del operón *mce3* *ex vivo* en un modelo de infección de macrófagos murinos

Con el objetivo de evaluar la expresión del operón *mce3* en *M. tuberculosis* durante la infección y teniendo en cuenta que *M. tuberculosis* es capaz de sobrevivir y dividirse dentro del macrófago, se evaluó la actividad de  $\beta$ -galactosidasa luego de infectar la línea de macrófagos murinos J774 con la cepa H37Rv salvaje transformada con las construcciones pP3 y pP3- *mce3R* en el vector replicativo PJEM15. Se midió la actividad enzimática a distintos tiempos de infección y se calcularon las UFC. Los resultados obtenidos demuestran que la actividad promotora de P3 parecería aumentar durante la infección ya que al comparar la actividad de  $\beta$ - galactosidasa *in vitro* vs *ex vivo* esta última aumenta respecto de la primera. Sin embargo no ocurre una desrepresión de la expresión durante la infección ya que la relación entre la actividad de P3 vs P3- *Mce3R* se mantiene entre 7 y 10 veces tanto en las bacterias crecidas *in vitro* como *ex vivo* (**Tabla VII**). La presencia del gen endógeno en la cepa salvaje y la expresión del gen regulador en alto número de copias en el vector replicativo podrían estar enmascarando algún efecto de inducción. Es por ello que se repitieron las infecciones utilizando la cepa mutante  $\Delta$ *mce3R* transformada con las construcciones P3 y P3- *mce3R* clonadas en el vector integrativo pYUB178*gal*. Los resultados obtenidos fueron similares a los mostrados en la **Tabla VII** indicando que en el modelo de infección utilizado no habría una desrepresión de la expresión del operón *mce3*.

**Tabla VII**

J774 infectadas con	Unidades de Miller <i>in vitro</i> *	Unidades de Miller <i>ex vivo</i> (h.p.i) **			
		4	24	72	144
H37Rv PJ15	2	20	20	185	142
H37Rv P3- <i>mce3R</i>	20	50	55	454	2000
H37Rv P3	140	540	590	4700	14000

\*Actividad de  $\beta$ - galactosidasa del cultivo *in vitro* utilizado como inóculo

\*\*horas post infección

Efecto del regulador *Mce3R* en la expresión del operón *mce3* durante la infección del la línea de macrófagos murinos J774.

### 3.2 Análisis de la expresión de los operones *mce* en *M. tuberculosis*

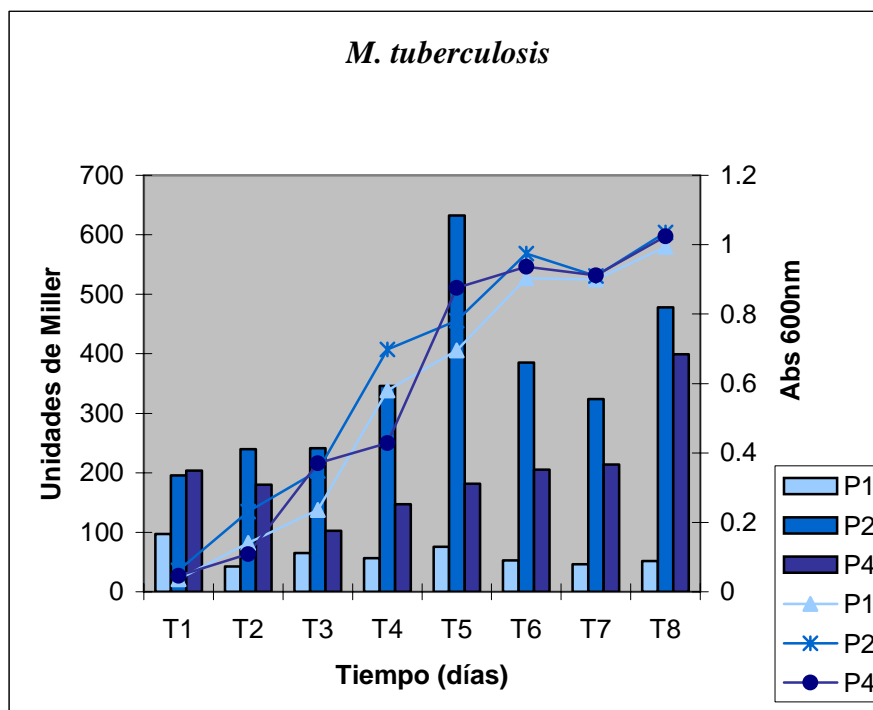
#### 3.2.1 Estudios de expresión por fusión a $\beta$ - galactosidasa de los promotores P1, P2 y P4.

La presencia de cuatro operones *mce* similares en secuencia y organización en el genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998), la expresión diferencial de los mismos durante la infección y fase de crecimiento (Kumar *et al.* 2003) y la presencia de otros genes reguladores en las inmediaciones de los operones *mce1* y 2 (Casali *et al.* 2006, nuestro grupo, datos sin publicar) sugieren fuertemente que habría una regulación fina de la expresión de los operones *mce* en *M. tuberculosis* durante la infección.

Inicialmente con el objetivo de estudiar el perfil de expresión de los operones *mce*, se realizaron ensayos de actividad de  $\beta$ - galactosidasa en la cepa de *M. tuberculosis* salvaje transformada con las regiones promotoras de los operones *mce1*, 2 y 4 (P1, P2 y P4) clonadas en el vector integrativo pYUB178*gal* (**Figura 28**).

En el gráfico puede observarse que todos los promotores son activos durante la fase exponencial del crecimiento *in vitro*. Mientras que P1 mostró una actividad débil y constante a lo largo del tiempo de cultivo, los valores de actividad de P2 fueron los más elevados con un incremento hacia la fase exponencial tardía. La actividad de P4 aumentó progresivamente hacia comienzos de la fase estacionaria. Estos resultados indican que a pesar del alto grado de conservación de las secuencias de los operones *mce*, la expresión de los mismos en las condiciones evaluadas en este trabajo es completamente diferente.

Figura 28



Actividad de los promotores de los operones *mce1*, 2 y 4. Actividad de  $\beta$ -galactosidasa a través del tiempo en cultivos de *M. tuberculosis* salvaje transformada con las construcciones pYUB178-*gal* P1 (promotor del operón *mce1*), pYUB178-*gal* P2 (promotor del operón *mce2*) y pYUB178-*gal* P4 (promotor del operón *mce4*). Los datos se expresan en unidades de Miller. Se muestra como ejemplo una de numerosas curvas realizadas, obteniendo resultados similares.



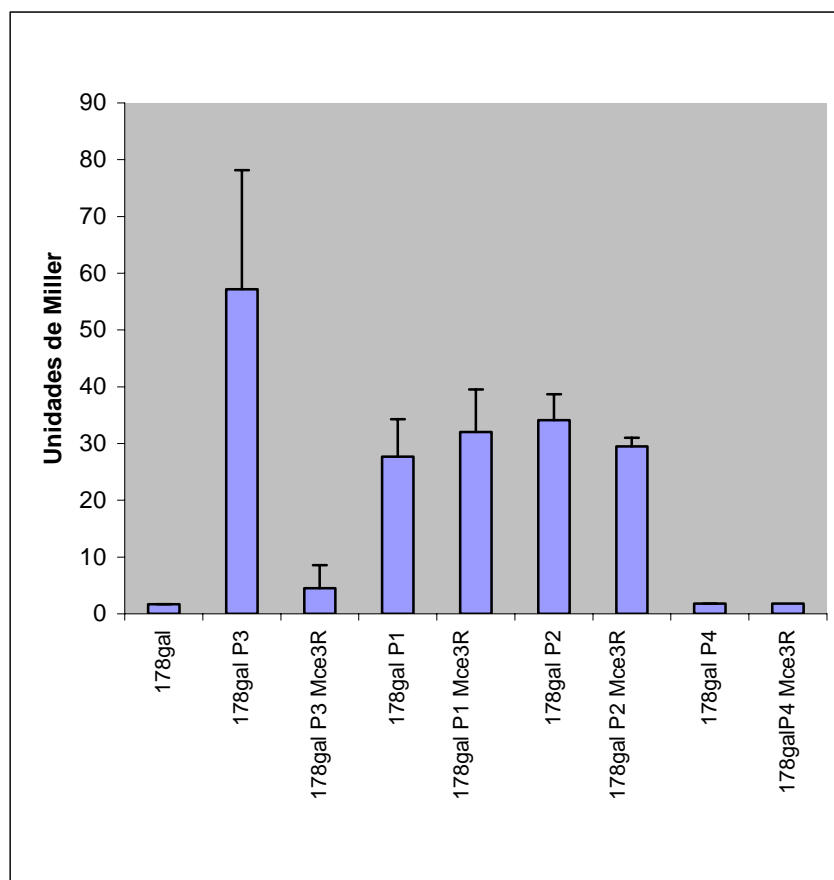
#### 4. Regulación de los operones *mce*

##### 4.1 Evaluación del rol de Mce3R en la transcripción de los operones *mce1*, *mce2* y *mce4*

###### 4.1.1 Estudios de regulación por fusión a $\beta$ - galactosidasa

Con el objetivo de estudiar la existencia de algún mecanismo de regulación conjunta ejercido por Mce3R y que actúe sobre la expresión de los otros operones *mce*, se realizaron experimentos de actividad de  $\beta$ - galactosidasa en la cepa *M. smegmatis* transformada con las cuatro regiones intergénicas clonadas en el vector integrativo en presencia o ausencia del regulador Mce3R expresado en *trans* en un vector replicativo bajo su propio promotor. Las cepas resultantes se denominaron 178gal-P3, 178gal-P3-*mce3R*, 178gal-P1, 178gal-P1-*mce3R*, 178gal-P2, 178gal-P2-*mce3R*, 178gal-P4 y 178gal-P4-*mce3R*. Los resultados representados en la **Figura 29** indican que Mce3R no parece regular la expresión de los operones *mce1*, *mce2* y *mce4* al menos en las condiciones evaluadas. La actividad relativa de los promotores *mce* en fase exponencial de los cultivos de *M. smegmatis* fue diferente a la observada en *M. tuberculosis* (ver Figura 28) lo cual puede deberse posiblemente a la ausencia en la primera de los mecanismos regulatorios propios de cada promotor.

Figura 29

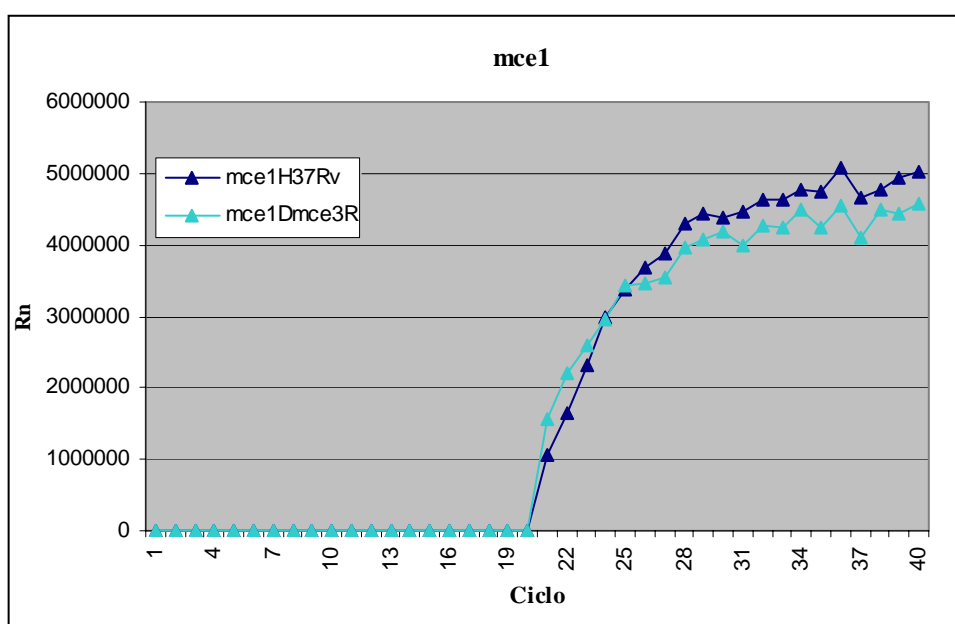


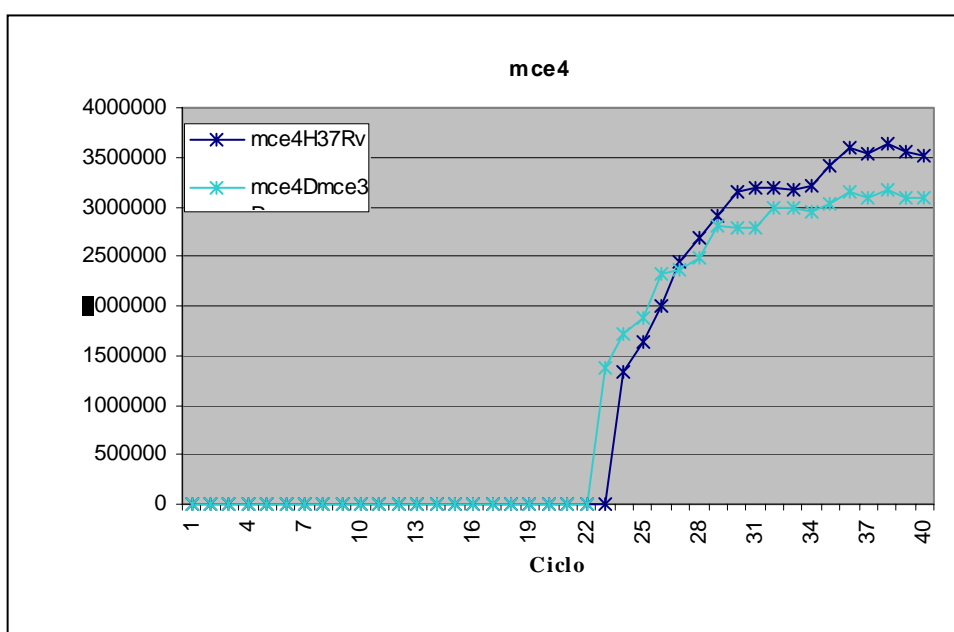
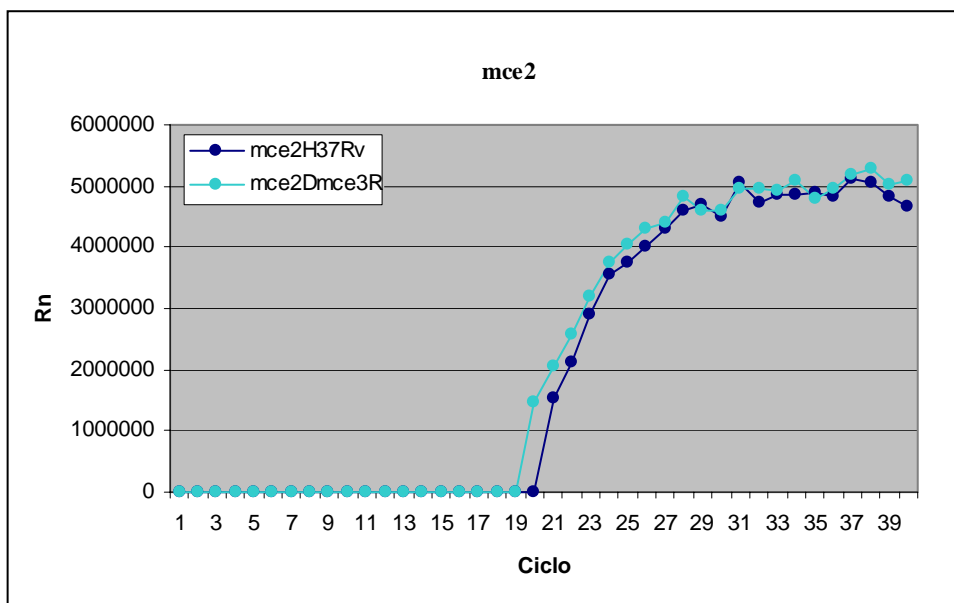
Efecto de Mce3R sobre los promotores *mce*. Actividad de  $\beta$ - galactosidasa de las regiones intergénicas correspondientes a los operones *mce*1, 2, 3 y 4 en presencia o ausencia del regulador Mce3R (178gal-P3, 178gal-P3-*mce*3R, 178gal-P1, 178gal-P1-*mce*3R, 178gal-P2, 178gal-P2-*mce*3R, 178gal-P4 y 178gal-P4-*mce*3R). Los datos corresponden al promedio de tres mediciones independientes tomadas en fase exponencial de crecimiento *in vitro* con los respectivos desvíos Standard y la actividad enzimática se expresa en unidades de Miller.

#### 4.1.2 Estudios de expresión de los operones *mce* por RT-PCR cuantitativa

Con el mismo fin se evaluó la expresión de los operones *mce1*, 2 y 4 mediante RT-PCR cuantitativa a partir de ARNm de las cepas H37Rv y  $\Delta mce3R$  en fase exponencial. Se diseñaron oligonucleótidos específicos para cada operón: *Rv0172* del operón *mce1*, *mce2A* (*Rv0589*) del operón *mce2* y *mce4A* (*Rv3499*) del operón *mce4* y se determinaron los niveles de expresión relativa utilizando el método de Pfaffl (2001). Los niveles de expresión fueron similares en ambas cepas, indicando que *Mce3R* no tendría efecto sobre la transcripción de los otros operones *mce* al menos en las condiciones evaluadas (**Figura 30**).

**Figura 30**





Expresión de los operones *mce1*, *mce2* y *mce4* *in vitro* mediante estudios de RT-PCR cuantitativa. Los datos se analizaron según el método de cuantificación relativa descrito por Pfaffl (2001), utilizando como calibrador el gen *housekeeping sigA*.  $R \text{ (fold)} = \frac{(E_{\text{target}})^{\Delta CP_{\text{target}}}}{(E_{\text{referencia}})^{\Delta CP_{\text{referencia}}}}$  (control-muestra) / (E<sub>referencia</sub>)<sup>ΔCP referencia (control-muestra)</sup>. Donde  $E = 10^{(-1/\text{pendiente})}$ , CP= Ct, target= *mce1*, 2 o 4, referencia= *sigA*, control= cepa *wild type* H37Rv, muestra= cepa Δ*Mce3R*. Las curvas en azul corresponden a la cepa salvaje (H37Rv) y en verde a la mutante (Δ*mce3R*). Los triángulos corresponden al gen (*Rv0172*) del operón *mce1*, los círculos rellenos al gen *mce2A* (*Rv0589*) del operón *mce2*, y los rombos al gen *mce4A* (*Rv3499*) del operón *mce4*.

### 4.1.3 Análisis de las regiones intergénicas de los operones *mce1*, 2 y 4

El análisis *in silico* de las regiones intergénicas correspondientes a los operones *mce1*, 2 y 4 (P1, P2 y P4) reveló la presencia de un posible sitio de unión de Mce3R en los promotores P2 y P4. Utilizando el programa DNA *Strider* para el análisis de secuencias y realizando la búsqueda para el consenso **Tn[**cg**]nn**ATCA**[**gc**][**tc**]nn**T****, donde n representa cualquiera de las cuatro bases y los [] implican una de las dos bases, se encontró un posible motivo con 7/14 correspondencias en los promotores P2 y P4 (**Figura 31**). Sin embargo ambos motivos carecen de alguna de las bases más conservadas en el consenso *tet'* y por lo tanto no serían suficientes para la unión de Mce3R de acuerdo con los resultados observados en los experimentos de expresión de β-galactosidasa y RT-PCR cuantitativa. Estos estudios nos permiten aseverar que Mce3R no reprime a los otros operones a nivel transcripcional, y apoyar lo que postulan otros autores: que los operones *mce* no estarían corregulados (Casali *et al.* 2006). Sin embargo no se puede descartar que exista otro regulador de mayor jerarquía controlando la expresión de los operones *mce*.

**Figura 31**

	Consenso <i>tet'</i>	Tn[ <b>cg</b> ]nn <b>ATCA</b> [ <b>gc</b> ][ <b>tc</b> ]nn <b>T</b>
P2		<b>T</b> c c ga <b>ATCA</b> g g gcc
P4		<b>T</b> t g ga <b>ATC</b> g g t gtc

**Alineamiento del consenso *tet'* de micobacterias (*tetO'*) con los motivos hallados en los promotores P2 y P4. En mayúscula se destacan las bases más conservadas que definen el consenso *tetO'*, en rojo se señalan las bases conservadas en los promotores P2 y P4.**

## 5. Identificación de otros posibles genes blanco regulados por Mce3R

### 5.1 Análisis *in silico* mediante el uso de los servidores Tuberculist y PredictRegulon

En las bacterias patógenas muchos factores de virulencia suelen estar regulados por el mismo regulador transcripcional. Dichos genes forman parte de un regulón, lo que le asegura a la bacteria expresar un grupo de genes en respuesta a un estímulo. Los genes que conformen el regulón de Mce3R deberían contener en su región promotora un sitio de unión *tetO'* y posiblemente estén relacionados al operón *mce3* en cuanto a la función que cumplen al expresarse o reprimirse en respuesta a una señal. Por lo tanto, con el fin de identificar el regulón de Mce3R, y de este modo tratar de esclarecer la función del operón *mce3*, se realizó una búsqueda *in silico* utilizando dos estrategias bioinformáticas. Por un lado el servidor que contiene la anotación del genoma de *M. tuberculosis* H37Rv, Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/Tuberculist/>) permite la búsqueda de una secuencia consenso en las regiones intergénicas de todo el genoma.

A partir del consenso **Tn[cg]nnATCA[gc][tc]nnT** donde n representa cualquiera de las cuatro bases y los [] implican una base o la otra, un total de veinte regiones resultaron de la búsqueda, incluyendo los cinco motivos *tet* (*tetO'*<sub>1-5</sub>) identificados previamente (**Tabla VIII**). Por otro lado, el servidor PredictRegulon (<http://www.predictregulon.>) permite predecir los genes que conforman un regulón a partir de secuencias conocidas a las que se une un determinado regulador transcripcional (Yellaboina *et al.* 2004; Prakash *et al.* 2005). Los cinco motivos *tetO'* fueron ingresados para realizar la búsqueda, y un total de treinta y nueve secuencias resultaron de la misma (**Tabla IX**). Interesantemente, nueve secuencias coincidieron entre ambas búsquedas. Cuatro corresponden a proteínas hipotéticas y otra de ellas fue *tetO'*<sub>1</sub>. Entre los genes de función conocida uno resultó ser el factor *rho* involucrado en la terminación de la transcripción, otro la lipoproteína MPT83 altamente inmunogénica, homóloga al antígeno MPB83 de *M. bovis*. También resultaron de la búsqueda los genes *celA2a* y *celA2b* que conforman un operón y son probables celulasas involucradas en la conversión de celulosa en glucosa y por último la proteína *ffh* (*fifty tour homolog*) posiblemente involucrada en el reconocimiento de secuencias señal (SRP: *signal recognition particle*) de proteínas a ser exportadas.

Tabla VIII

Gen	Función	Secuencia encontrada
<i>Rv0888</i>	Probable (pb) proteína exportada	tacgtatcagtgt
<i>celA2a</i>	Pb celulasa (endo-1-4 $\beta$ glucanasa)	tggagatcaccgtt
<b>PE10</b>	<b>Proteína de la familia PE</b>	
<i>rho</i>	Pb factor de terminación de la transcripción rho	tgggatcaccgtt
<i>Rv1682</i>	Pb proteína estructural con dominio coiled-coil	ttgtcatcagaat
<i>moeX</i>	Pb involucrada en la síntesis de molibdopterina	
<i>Rv1714</i>	Pb oxidoreductasa (metabolismo celular)	tacttatcaccgt
<i>mce3R</i>	Represor transcripcional de la familia TetR	tcctatcaccct <i>tetO</i> <sub>5</sub> '
<i>yrbE3A</i>	Hipotética proteína integral de membrana	tcctatcaccct <i>tetO</i> <sub>4</sub> ' tgcatacagtaat <i>tetO</i> <sub>3</sub> ' taccgatcagttgt <i>tetO</i> <sub>1</sub> ' tggacatcagcgggt <i>tetO</i> <sub>2</sub> '
<i>mpt83</i>	Lipoproteína	tccgaatcactggt
<i>Rv2917</i>	Proteína conservada rica en alanina y arginina	tcgcatcaccatt
<i>ffh</i>	Pb "signal recognition particle" SRP	
<i>esxS</i>	Familia <i>esat6</i>	ttcgaatcaccaat
<i>Rv3637</i>	Pb transposasa	tcgggatcaccggt
<i>fic</i>	Pb cell filamentation protein	tcgggatcaccggt
<i>Rv3640c</i>	Pb transposasa	
<i>Rv3644c</i>	DNA polimerasa	taccgatcagcgtt
<i>Rv3645</i>	Pb proteína transmembrana	

En la Tabla se señalan las regiones intergénicas que contienen el consenso Tn[*cglnnATCA[gc][tc]nnT* identificadas mediante el uso del servidor Tuberculist (<http://genolist.pasteur.fr/Tuberculist/>). La función se describe según la anotación de la secuencia del genoma (Cole *et al.* 1998). En gris se destacan las ocho regiones coincidentes entre ambas búsquedas bioinformáticas. Se excluyeron de la misma los genes *Rv2336*, *Rv2674*, *Rv2718c*, *Rv3179* por tratarse de proteínas hipotéticas de función desconocida.

Tabla IX

Gen	Función	Secuencia encontrada
<i>lipD</i>	Pb lipasa	tccacatcagcagt
<i>hemK</i>	Pb proteína HEMK	tgcgtatcacccat
<i>Rv1104</i>	Pb hidrólisis de antibióticos $\beta$ - lactámicos	tccagatcacccgt
<i>Rv3115</i>	Pb transposasa	tccgcatcagcgt
<i>gcvH</i>	Pb involucrada en degradación de glicina	tccagatcaacgat
<i>rphA</i>	Pb ribonucleasa RPHA	tgcggatcacccgt
<i>modC</i>	Pb ATP binding protein Transportador ABC de molibdeno	tccggatcagctact
<i>celA2b</i>	Pb celulasa (endo-1-4 $\beta$ glucanasa) forma operón con <i>celA2a</i>	tgctgatcaacggt
<i>lat</i>	Pb lisina amino transferasa	tggctatcactcct
<i>Rv0851c</i>	Pb deshidrogenasa - reductasa	tgcggatcaaccat
<i>Rv1474c</i>	Pb regulador transcripcional	tgcacatcacccgt
<i>Rv2041c</i>	Lipoproteína pb involucrada en transporte de azúcares	tgcgtatcacggt
<i>rplA</i>	Pb proteína ribosomal 50S	tggagatcacccgtt
<i>lpqQ</i>	Lipoproteína	tggcgatcagtcgt
PPE	PPE	tgctcatcagggt
<i>menE</i>	Involucrada en síntesis de menaquinona	tggatgatcacccat
PE	PE	taccaatcaatctt
PE-PGRS	PE-PGRS	tcaagatcacctat
<i>thiC</i>	Pb biosíntesis de tiamina	tgaccatcacccgtt
<i>Rv0111</i>	Pb proteína transmembrana aciltransferasa	tgacgatcacccgtt

En la Tabla se señalan las regiones intergénicas identificadas mediante el uso del servidor PredictRegulon (<http://www.predictregulon>). La función se describe según la anotación de la secuencia del genoma. Se excluyeron de la misma los genes comunes a ambas búsquedas detallados en la tabla V y los genes *Rv2079*, *Rv2632c*, *Rv2515c*, *Rv1847*, *Rv2718c*, *Rv1647*, *Rv3378c*, *Rv0857*, *Rv3604c*, *Rv3217c*, *Rv1509*, *Rv3662c* por tratarse de proteínas hipotéticas de función desconocida.



Entre los genes que resultaron únicos para cada búsqueda se obtuvieron de funciones diversas. Algunos como *moeX* y *modC* están relacionados con la síntesis y el transporte del cofactor molibdeno, este último formando parte de un transportador ABC, otras son lipoproteínas, cuatro son genes de la familia multigénica PE- PPE, y uno de la familia *esat6*. Otro de ellos está relacionado con el transporte de azúcares (*Rv2051c*) y forma un operón con otros genes todos ellos probablemente componentes de un sistema de transporte del tipo ABC.

Si bien es difícil especular a partir de estos resultados sobre la posible relación entre estos genes y los genes *mce* para conformar un regulón, al validar estos resultados por QRT-PCR posiblemente alguno de ellos nos pueda dar un indicio de la posible función de los genes *mce*

## Segunda parte

### 6. Construcción de la cepa mutante $\Delta mce3R$

#### 6.1 Obtención de una cepa mutante en el gen *mce3R* por reemplazo alélico

Hay varias evidencias que indican que los genes *mce* codifican para proteínas asociadas a la virulencia. Por ejemplo, se determinó que una cepa de *M. bovis* BCG mutante para el gen *mce1A* posee capacidad reducida de invadir las células epiteliales no fagocíticas HeLa (Flesselles *et al.*, 1999). Además la inactivación de los operones *mce1*, *mce2* y *mce3* en *M. tuberculosis* afecta el crecimiento de las cepas mutantes en un modelo de infección de ratones (Gioffré *et al.*, 2005). Riley y colaboradores (Shimono *et al.*, 2003) demostraron que una cepa mutante en el operón *mce1* resultó hipervirulenta *in vivo* por ser incapaz de establecer una infección persistente e identificaron el gen *mce1R*, un regulador transcripcional de la familia GntR que modula la expresión del operón *mce1* (Casali *et al.* 2006). La función de un regulador transcripcional puede estudiarse mediante la inactivación del gen que lo codifica y la caracterización fenotípica de la cepa resultante. Con el objetivo de estudiar más detalladamente la función de *mce3R* y su implicancia en la virulencia de *M. tuberculosis* se obtuvo una cepa mutante en dicho gen por reemplazo alélico en la cepa de referencia H37Rv. Para ello se utilizó el sistema desarrollado por Parish & Stoker esquematizado en la **Figura 32**. Este sistema consiste en la utilización de un vector suicida (p2Nil) para la entrada del alelo mutado a la célula, el cual carece de un origen de replicación (*oriM*) y por lo tanto, es incapaz de replicar en micobacterias. Así, si no se integra en el genoma se pierde en las sucesivas divisiones celulares. Para este sistema se requiere un único clon que haya sufrido un simple evento de recombinación homóloga luego de la transformación. La inclusión de múltiples marcadores como el gen de contraselección *sacB* y el marcador *lacZ*, permite distinguir los clones simple recombinantes de las mutantes espontáneas resistentes al antibiótico de selección y facilita la selección del segundo evento de recombinación homóloga. El desarrollo de estos vectores permitió la inactivación de genes por intercambio alélico en las micobacterias de crecimiento lento que hasta hace unos años era un procedimiento difícil de lograr, ya que a la baja eficiencia de transformación se sumaba una alta frecuencia de recombinación ilegítima. En este trabajo, la secuencia

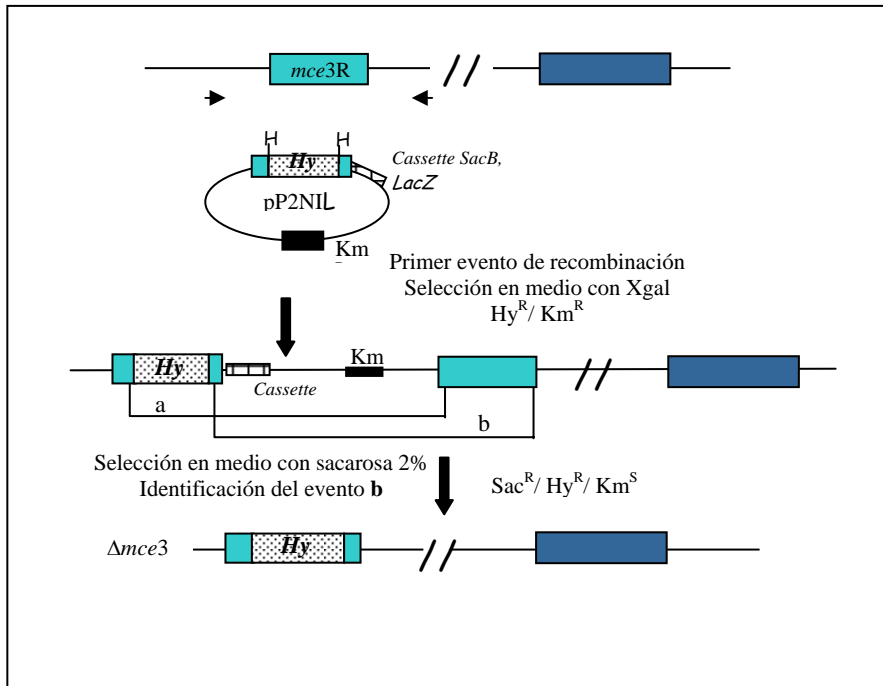
codificante del gen *mce3R* se interrumpió con un gen de resistencia a Higromicina y se transformó por electroporación la cepa *M. tuberculosis* H37Rv.

Las bacterias transformadas se plaquearon en medio selectivo y se seleccionaron simples recombinantes (*HygR*, *KmR*) y de color azul en presencia de X- gal. El segundo evento se seleccionó en medio con sacarosa para obtener transformantes *SacR/ HygR*. Se repicaron 50 colonias en réplica en placas con Kanamicina o Higromicina y se seleccionaron los clones *HygR/ KmS*. Finalmente, ocho clones fueron evaluados por *Southern blot* para confirmar la presencia del reemplazo alélico. La cepa *mce3R::Hy* se denominó  $\Delta mce3R$

## 6.2 Confirmación del genotipo de la cepa $\Delta mce3R$

Para confirmar la presencia del alelo mutado en la cepa  $\Delta mce3R$ , se analizaron ocho colonias de fenotipo  $Sac^R/ Hy^R/ Km^S$  por *Southern blot*. El ADN genómico de las cepas candidatas a evaluar y el de la parental salvaje fue digerido por las enzimas de restricción *EcoRI* y *KpnI* separadamente. En la **Figura 33A** se muestran los resultados del ensayo de *Southern blot* mostrando el patrón de bandas obtenido para la cepa salvaje y una de las mutantes (las ocho mutantes presentaron el mismo patrón de bandas correspondiente al genotipo mutado, pero una sola fue seleccionada para continuar con los experimentos subsiguientes). En la figura **33B** se detalla un esquema representando las enzimas de restricción utilizadas con los tamaños de las bandas esperadas.

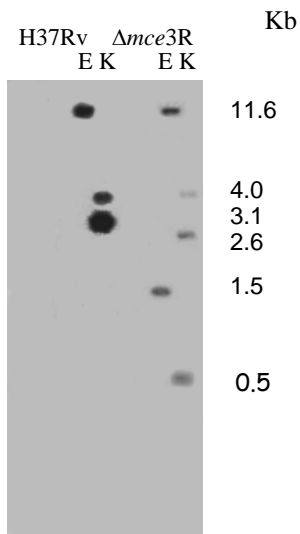
Figura 32



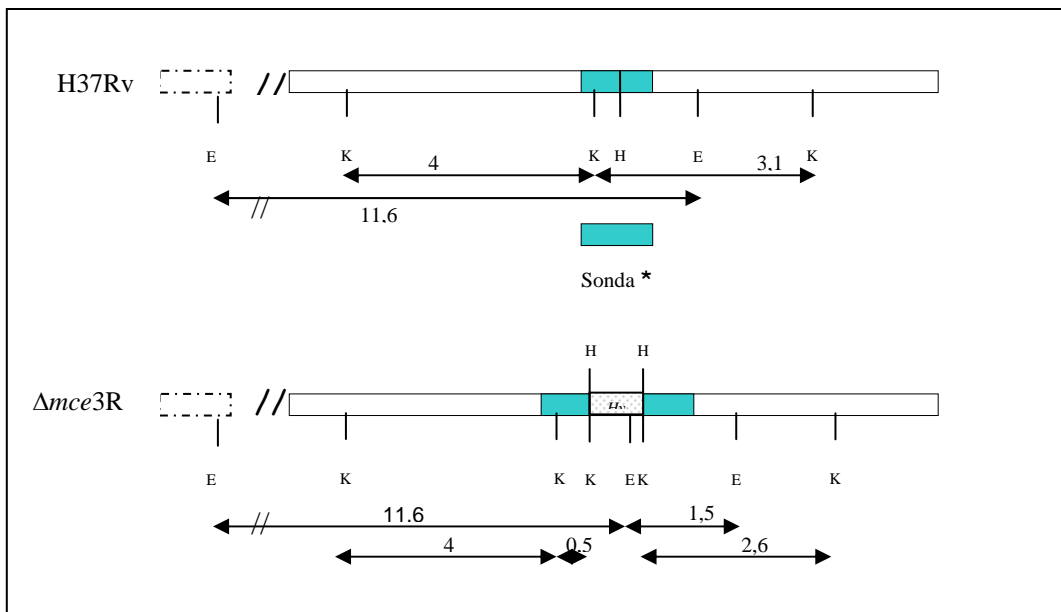
Estrategia de mutagénesis insercional para la obtención de una cepa mutante en el gen *mce3R* por reemplazo alélico. Se indica la cepa parental con la copia salvaje del gen, el vector *p2Nil* con los genes de resistencia a antibióticos Kanamicina (*Km*) e Higromicina (*Hy*) y el *cassette* con los genes de selección *sacB* y *lacZ*. Se señalan los dos eventos de recombinación homóloga posibles a y b y el fenotipo seleccionado. R significa resistencia y S sensibilidad. La cepa mutante obtenida se denominó  $\Delta mce3R$

Figura 33

A



B



Confirmación de la mutagénesis de *mce3R*. A *Southern blot* de las cepas H37Rv salvaje y  $\Delta mce3R$ . El ADN genómico fue digerido por las enzimas *EcoRI* (E) y *KpnI* (K) y la sonda utilizada fue el gen *mce3R*. El tamaño de las bandas obtenidas se estableció en base al marcador de peso molecular 1Kb de Promega y se expresa en Kb. B Mapa de restricción de los alelos salvaje y mutado correspondientes a las cepas H37Rv y  $\Delta mce3R$  respectivamente. Las flechas corresponden al tamaño de los fragmentos esperados. El esquema es representativo y no está en escala.

### 6.3 Obtención de la cepa $\Delta mce3R$ Complementante

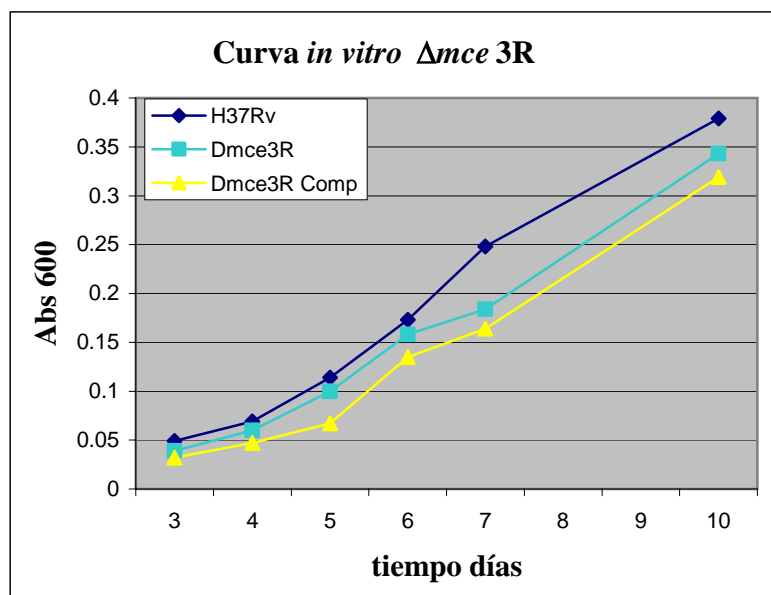
Para asociar un determinado fenotipo a la inactivación de un gen particular en una cepa mutante hace falta construir la correspondiente cepa complementante, incluyendo una copia del gen salvaje. Esta cepa debería revertir el fenotipo mutante al de la parental y solo así es posible atribuir el efecto observado a una mutación particular. Con el objeto de obtener una cepa complementante a la mutación de *mce3R*, se clonó una copia salvaje del gen en el vector replicativo pSUM41 bajo la regulación de su propio promotor y se electroporó en la cepa de *M. tuberculosis*  $\Delta mce3R$  competente. Para confirmar la presencia e identidad del plásmido se extrajo el ADN total de la cepa complementante y se lo usó para transformar bacterias *E. coli* competentes. Todos los clones analizados contuvieron el plásmido con la copia salvaje del gen y se seleccionó uno de ellos para los experimentos posteriores. Se empleó esta estrategia debido a que las extracciones de ADN plasmídico de micobacterias son de bajo rendimiento.

### 6.4 Caracterización fenotípica de la mutante $\Delta mce3R$

#### 6.4.1 Evaluación del crecimiento en cultivo *in vitro*

Con el objetivo de evaluar si la interrupción del gen *mce3R* en *M. tuberculosis* afecta su crecimiento *in vitro*, se realizaron curvas a lo largo del tiempo de cultivo de las cepas H37Rv salvaje,  $\Delta mce3R$  y  $\Delta mce3R$  complementante (**Figura 34**). El tiempo de duplicación fue similar en las tres cepas, indicando que la mutación no afecta el crecimiento *in vitro* en condiciones estándares.

Figura 34



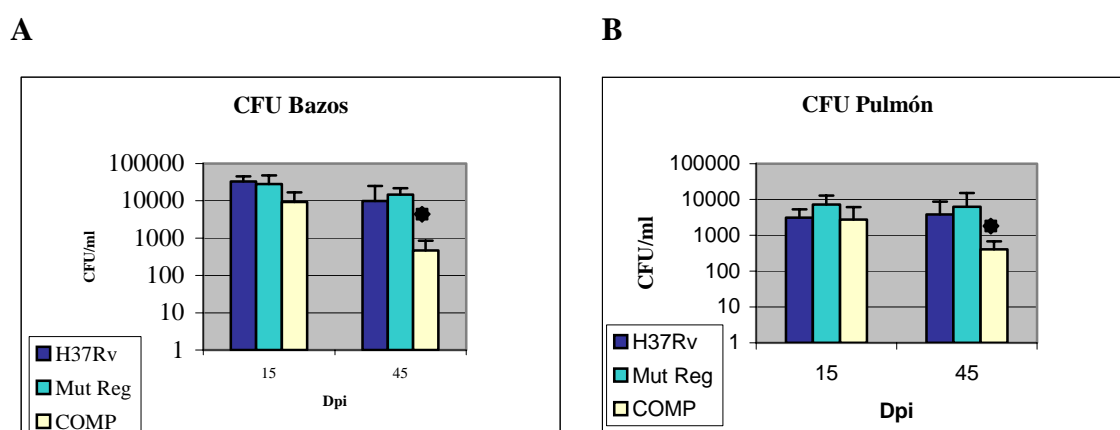
Curva de crecimiento *in vitro* de las cepas H37Rv (azul),  $\Delta mce3R$  (verde) y  $\Delta mce3R$  complementante (amarillo). Se tomaron alícuotas a los tiempos indicados y se midió la absorbancia a 600nm. Se muestra como ejemplo una de numerosas curvas realizadas, obteniendo resultados similares.

#### 6.4.2 Evaluación del crecimiento durante la infección en un modelo animal de ratón

En base a los antecedentes detallados anteriormente, se planteó investigar el efecto que produce en el crecimiento *in vivo* la inactivación del gen regulador *mce3R* en *M. tuberculosis*. En particular, presuponiendo que una consecuencia directa de esta mutación es la sobreexpresión del operón *mce3* en la cepa  $\Delta mce3R$ , el objetivo de este estudio fue determinar si un incremento en la expresión de los genes *mce3* induce alteraciones en la capacidad de multiplicar y persistir de *M. tuberculosis* en ratones. Para ello se inmunizaron ratones hembras BalbC de dos meses de edad por vía intraperitoneal con  $10^6$  bacterias por ratón. Tres grupos de 12 ratones cada uno, fueron inoculados con las cepas H37Rv,  $\Delta mce3R$  y  $\Delta mce3R$  complementante, respectivamente. La cinética de replicación y la supervivencia de las distintas cepas se determinaron

mediante la cuantificación de unidades formadoras de colonia (UFC) en homogenatos de bazos y pulmones luego del sacrificio de los ratones a los días 15 y 45 post inoculación (**Figura 35**). Los experimentos fueron realizados por única vez y los datos se expresan como el promedio de los cinco animales por cada grupo. Los resultados mostraron una tendencia en la replicación en bazo y pulmón levemente mayor en la cepa mutante con respecto a la salvaje, aunque las diferencias no fueron estadísticamente significativas. En cambio, en la cepa complementante la replicación es menor que en la salvaje y las diferencias son estadísticamente significativas, lo que indicaría que una sobreexpresión del gen regulador y por lo tanto la represión del operón *mce3* o la de algún otro gen del regulón de Mce3R, lleva a la atenuación de la virulencia.

**Figura 35**



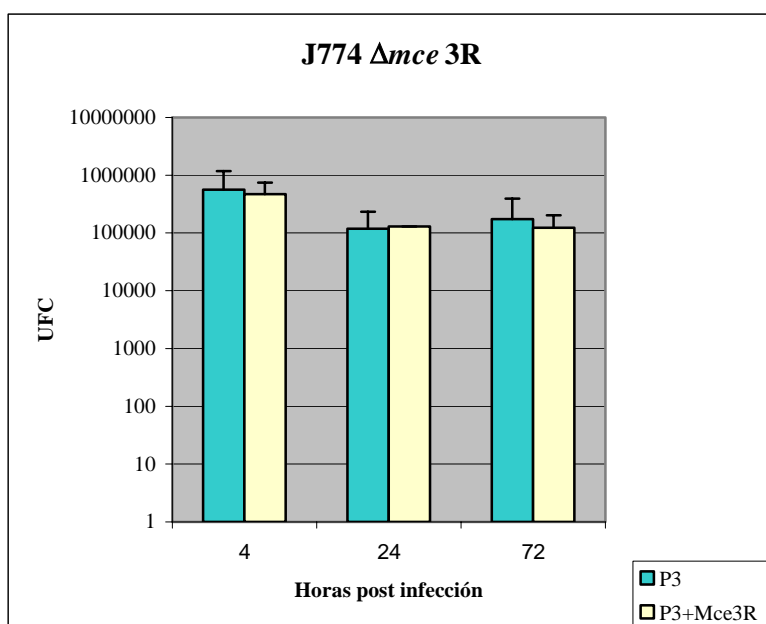
**Evaluación del crecimiento *in vivo* de las cepas H37Rv (azul),  $\Delta mce3R$  (verde) y  $\Delta mce3R$  Complementante (amarillo). Se evaluaron UFC de A Bazo y B Pulmón a los días 15 y 45 post inoculación. Los experimentos fueron realizados por única vez y los datos se expresaron como el promedio de los 5 animales por cada grupo con los respectivos desvíos estándar. \*Corresponde a diferencias estadísticamente significativas entre las cepas complementante y salvaje según la Prueba T con un valor  $p < 0.05$ .**



### 6.4.3 Evaluación del crecimiento *ex vivo* en un modelo de infección de la línea de macrófagos murinos J774

Uno de los modelos utilizados para evaluar virulencia en micobacterias son las líneas celulares inmortalizadas. *M. tuberculosis* infecta macrófagos alveolares y es capaz de multiplicarse y sobrevivir dentro del fagosoma, alterando de alguna manera los compartimentos intracelulares e impidiendo la fusión con lisosomas o la correcta maduración del fagolisosoma. Es por ello que se procedió a infectar la línea J774 para evaluar la virulencia de la cepa mutante  $\Delta mce3R$ . En la **Figura 36** se grafica el recuento de las UFC a las 4, 24 y 72 horas post infección de un experimento realizado por duplicado. No se observan diferencias estadísticamente significativas en la capacidad de sobrevivir y multiplicarse de la cepa mutante con respecto a la complementante.

**Figura 36**



Recuento de las UFC a las 4, 24 y 72 horas luego de la infección de la línea celular de macrófagos J774. En verde se muestra la cepa  $\Delta mce3R$  y en amarillo la cepa complementante. No se observaron diferencias estadísticamente significativas entre las cepas complementante y mutante según la Prueba T .

## 1. Mce3R pertenece a la familia de reguladores transcripcionales TetR

El análisis de la secuencia del genoma de *M. tuberculosis* (Cole *et al.* 1998) reveló la presencia de cuatro operones *mce* similares en secuencia y organización, por lo que posiblemente surgieron por duplicación y posterior diferenciación, probablemente para cumplir diferentes funciones específicas. Estos operones se encuentran ampliamente distribuidos en el género y su presencia fue demostrada en especies micobacterianas no tuberculosas MOTT (*Mycobacterium other than tuberculosis*), incluyendo *M. avium* y *M. smegmatis* (Haile *et al.* 2002). Previamente, nuestro grupo demostró que el operón *mce3* está ausente en *M. bovis*, *M. microti* y algunas cepas de *M. africanum* (Zumárraga, *et al.*, 1999). La consecuencia biológica de la delección del operón *mce3* en estas especies no es clara, pero es importante destacar que si bien *M. bovis* perdió casi todo el operón *mce3* (en su lugar posee una ORF híbrida entre *Rv1964* y *Rv1977*) conserva intacto el gen *mce3R*.

El genoma de *M. leprae* (3,3 Mb) es mucho menor que el genoma de *M. tuberculosis* (4,4 Mb) lo que refleja que ha sufrido rearrreglos y delecciones durante la evolución reductiva. Este proceso, también observado en otros organismos intracelulares obligados, conlleva a la pérdida de funciones durante la colonización de un nicho específico, definiendo el mínimo grupo de genes necesarios para las micobacterias patógenas (Cole *et al.* 2001). Dicho genoma sólo conserva el operón *mce1* (Wiker *et al.* 1999).

Una proteína con características de invasina se encuentra codificada en cada uno de los operones *mce*. Este hallazgo junto con el hecho de que los cuatro operones están presentes en la cepa saprofítica *M. smegmatis* indicaría que la habilidad de invadir células de mamífero fue adquirida antes de convertirse en un patógeno exitoso y sugiere que ésta no sería la única función de los operones *mce*. Se deduce además que la sola presencia de los operones *mce* no correlaciona con patogenicidad. Sin embargo, cuando se bloquea la expresión de algunos genes *mce* en *M. tuberculosis*, el bacilo pierde capacidad de multiplicar y persistir en el hospedador (Gioffré, *et al.*, 2005).

La presencia de los genes reguladores *Rv0165c*, *Rv0586* y *Rv1963c* en las cercanías de tres de los cuatro operones (*mce1*, *mce2* y *mce3* respectivamente), indicaría que existen mecanismos que controlan el nivel de expresión de los genes *mce* y que esto podría ser la clave que determina la asociación de los operones *mce* con la virulencia de las micobacterias patógenas. *Rv1963c* se encuentra adyacente y en sentido contrario al de la

transcripción de los genes *Rv1964- Rv1971* que conforman el operón *mce3*, y ya que los reguladores transcripcionales suelen regular la expresión de genes cercanos, fue de interés en este trabajo estudiar el rol de dicho gen en la regulación de la expresión del operón *mce3*.

En general, las bacterias están expuestas a cambios ambientales, para lo que requieren de un amplio rango de respuestas adaptativas gatilladas por proteínas reguladoras. Estos reguladores responden a señales ambientales y celulares y modulan la expresión génica a nivel de la transcripción o traducción. En particular, dada la complejidad del ambiente al cual debe enfrentarse *M. tuberculosis*, posee un amplio repertorio de reguladores: factores sigma, numerosos activadores y represores, sistemas de dos componentes y la familia de serina- treonina proteínas quinasas (STPKs) (Cole *et al.* 1998). Los reguladores transcripcionales son proteínas que poseen un dominio de respuesta a un estímulo y un dominio de unión al ADN que transduce la señal. Están agrupados en familias de acuerdo a similitud de secuencia, estructura y función (**Tabla X**).

**Tabla X**

Family	Action	Some regulated functions	DBD motif	Position
LysR	Activator/repressor	Carbon and nitrogen metabolism	HTH	N-terminal
AraC/XylS	Activator	Carbon metabolism, stress response and pathogenesis	HTH	C-terminal
TetR	Repressor	Biosynthesis of antibiotics, efflux pumps, osmotic stress, etc.	HTH	C-terminal
LuxR	Activator	Quorum sensing, biosynthesis and metabolism, etc.	HTH	C-terminal
LacI	Repressor	Carbon source utilization	HTH	N-terminal
ArsR	Repressor	Metal resistance	HTH	Central
IcIR	Repressor/activator	Carbon metabolism, efflux pumps	HTH	N-terminal
MerR	Repressor	Resistance and detoxification	HTH	N-terminal
AsnC	Activator/repressor	Amino acid biosynthesis	HTH	N-terminal
MarR	Activator/repressor	Multiple antibiotic resistance	HTH	Central
NtrC (EBP)	Activator	Nitrogen assimilation, aromatic amino acid synthesis, flagella, catabolic pathways, phage response, etc.	HTH	C-terminal
OmpR	Activator	Heavy metal and virulence (response regulator of a two-component system)	Winged helix	C-terminal
DeoR	Repressor	Sugar metabolism	HTH	N-terminal
Cold shock	Activator	Low-temperature resistance	RNA binding domain (CSD)	Variable
GntR	Repressor	General metabolism	HTH	N-terminal
Crp	Activator/repressor	Global responses, catabolite repression and anaerobiosis	HTH	C-terminal

Ramos *et al.* (2005). Familia de reguladores transcripcionales procariotas. Se detallan las familias más importantes, las funciones que regulan, el motivo de unión al ADN y si se trata de represores o activadores transcripcionales.

El alineamiento de la secuencia proteica de *Rv1963c* en la base de datos BLASTP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>) presentó homología con otros reguladores transcripcionales de la familia TetR y la búsqueda de dominios en la base de datos InterPro (<http://www.ebi.ac.uk/interpro>) arrojó la presencia de dos motivos Tet basándose en Pfam (PF00440 HMM *Hidden Harkov Model*) y ProSite (PS01081), uno entre los aminoácidos 19 - 65 y otro en la posición 223-269. También reflejó la presencia de un motivo de unión al ADN del tipo hélice- vuelta- hélice (HTH) entre los aminoácidos 36-57 según PRINTS (PR00455). *Rv1963c* codifica para una proteína de un peso molecular teórico de 44,3 kDa, mayor al de la mayoría de los reguladores TetR que van de 21 a 25 kDa y es probable que por eso posea, al igual que los otros miembros de similar tamaño, dos motivos Tet en el extremo amino terminal.

La familia de reguladores TetR está bien representada y ampliamente distribuida entre los distintos géneros y especies de bacterias,  $\alpha$ -,  $\beta$ - y  $\gamma$ -proteobacterias, cianobacterias y archaea indicando una gran distribución taxonómica. Se encuentran principalmente en microorganismos expuestos a cambios ambientales como *Nocardia*, *Streptomyces*, *Pseudomonas*, *Bacillus* spp o patógenos de plantas o animales como *Agrobacterium*, *Brucella*, *E. coli*, *Bordetella*, *Mycobacterium* y *Salmonella* spp, indicando que podrían estar relacionados con la adaptación a ambientes complejos y cambiantes. Estos datos se correlacionan con el hecho de que muchos miembros de la familia TetR se encuentran en organismos que poseen numerosos factores sigma de función extracitoplasmáticos ECF (Martinez- Bueno *et al.* 2002, Yoshimura *et al.* 2004). Poseen un motivo de unión al ADN de tipo hélice-vuelta-hélice (HTH) en el extremo amino terminal de la proteína que, contrariamente al resto de la secuencia, está altamente conservado. Esto probablemente refleja diferencias en el tipo de señal que sensa el dominio variable, como diferentes antibióticos, solventes orgánicos, homoserinlactonas, etc. Sólo se conocen las funciones que regulan 85 miembros de la familia de los 2353 que la componen, los que están involucrados en resistencia a drogas, catabolismo, biosíntesis de antibióticos, estrés osmótico y patogenicidad de bacterias Gram positivas y Gram negativas (Ramos *et al.* 2005). Todos ellos son represores transcripcionales y podrían actuar de manera similar: la unión del inductor al dominio no conservado de la proteína produce un cambio conformacional en el dominio de unión al ADN, lo que resulta en la liberación del represor de la región operadora, y por lo tanto en la transcripción de dicho promotor.

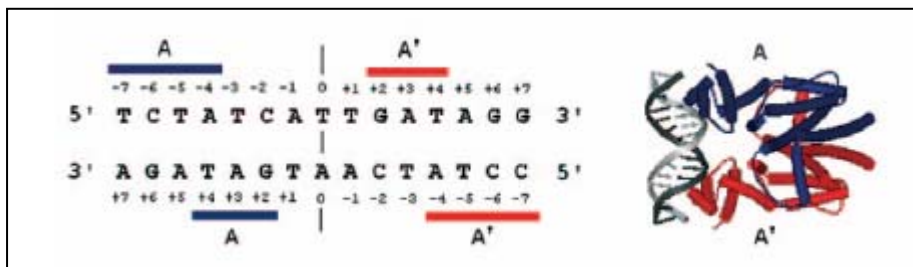
*M. tuberculosis* posee alrededor de 40 reguladores transcripcionales de la familia TetR pero es poco lo que se conoce sobre su mecanismo de acción y las funciones que regulan. Rv1963c, denominado a partir de este trabajo Mce3R, fue el primer regulador de la familia TetR descrito en *M. tuberculosis* (Santangelo *et al.* 2002). Posteriormente Engohang-Ndong *et al.* (2004) caracterizaron otro miembro de la familia TetR/ CamR, ETR, el cual reprime la expresión de *ethA* (Rv3854c), un homólogo a monoxigenasas. *ethA* activa a Etionamida (ETH), un antibiótico de segunda línea utilizado en el tratamiento contra la TB que afecta la síntesis de lípidos complejos (Baulard *et al.* 2000). Los dos genes de la familia TetR de *M. tuberculosis* con mayor homología a Mce3R, Rv2506 y Rv3557c se encuentran cercanos a genes relacionados con el metabolismo de lípidos.

## 2. Mce3R regula la transcripción del operón *mce3*

Los resultados obtenidos en los experimentos de geles de retardo realizados con diferentes sondas evidenciaron una unión específica de la proteína Mce3R purificada al promotor del operón *mce3*, P3-200. Más consistentemente, los ensayos de regulación utilizando el gen *lacZ* como reportero en las cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* mostraron que la actividad promotora de P3 es mucho menor en presencia de la proteína Mce3R que en ausencia de la misma. Y por último, la eliminación de la expresión de Mce3R en *M. tuberculosis* en la cepa mutante  $\Delta mce3R$  resultó en un incremento significativo en el nivel de mRNA del operón *mce3*. Por lo tanto es posible concluir que Mce3R regula negativamente la transcripción del operón *mce3* por unión a la región promotora, posiblemente impidiendo la unión de la ARNP, tal como fue descrito para otros reguladores TetR (Ramos *et al.* 2005).

El miembro mejor caracterizado genética y bioquímicamente de esta familia es la proteína TetR de *E. coli*. En bacterias entéricas Gram negativas, TetR reprime la transcripción de los genes determinantes de resistencia a Tetraciclina (tc) *tetA*, que codifican para un sistema de eflujo de tc acomplexado a  $Mg^{2+}$  [tc.Mg]<sup>+</sup> localizado en la membrana citoplasmática (Yamaguchi *et al.* 1990). El represor actúa como homodímero uniéndose a dos regiones operadoras idénticas y palindrómicas (*tetO*) presentes en la región intergénica, previniendo la transcripción de ambos promotores (**Figura 37**) (Orth *et al.* 2000).

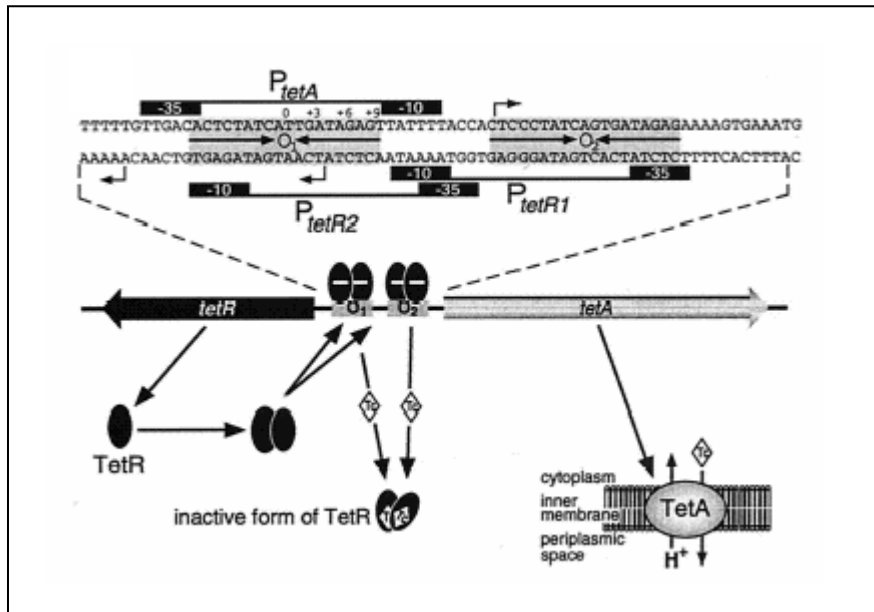
Figura 37



Orth *et al.* 2000. Unión de TetR a la región operadora palindrómica *tetO*. Las barras horizontales en azul y en rojo representan los sitios de contacto de cada monómero A o A'.

En ausencia del inductor, el dímero TetR se une a la región operadora *tetO*<sub>1</sub> y *tetO*<sub>2</sub> apagando completamente la transcripción del propio *tetR* y del gen de resistencia *tetA* con una afinidad por O<sub>2</sub> cuatro veces mayor que por O<sub>1</sub> (**Figura 38**) (Grkovik *et al.* 2002; Kleinschmidt *et al.* 1991). Una vez que entra tc a la célula, se une a TetR con una alta afinidad como complejo [tc.Mg]<sup>+</sup> induciendo un cambio conformacional en TetR, lo que resulta en la disociación de *tetO*. La subsiguiente expresión de los genes *tetA* y *tetR* lleva a una rápida disminución de la concentración de tc en el citoplasma, lo que a su vez produce la represión de la expresión de ambos genes otra vez (Lederer *et al.* 1996, McMurry *et al.* 1980). Este sistema debe estar finamente regulado ya que la expresión de TetA en ausencia de tc es dañino para la célula debido a la pérdida del potencial de membrana (Eckert *et al.* 1989), pero debe ser expresada antes de que los niveles de tc en citoplasma inhiban la síntesis de proteínas. Este mecanismo de encendido y apagado puede ser similar en otros miembros de la familia TetR que respondan de manera específica a otra señal.

Figura 38



Grkovik *et al.* 2002. Control de la transcripción de TetA por TetR. En la figura se muestra la región intergénica de 71pb conteniendo los dos operadores *tetO* ( $O_1$  y  $O_2$  sombreados en gris), los promotores  $P_{tetA}$  y  $P_{tetR1}$  y  $P_{tetR2}$  con los consensos -10 y -35 y los TSP asociados a cada uno de ellos (señalados con una flecha). Ambos genes se señalan con flechas en negro (*tetR*) y en gris (*tetA*) indicando el sentido de la transcripción. El producto de *tetR* (TetR, representado por un óvalo en negro) se une a  $O_1$  y  $O_2$  impidiendo la transcripción de ambos genes. En presencia de tetraciclina (Tc), se une al dímero TetR acompañado a  $Mg^{2+}$  promoviendo un cambio conformacional que resulta en la liberación del operador y la subsiguiente expresión de TetA, la que exporta Tc a través de la membrana citoplasmática intercambiando  $H^+$ .

### 3. Caracterización de la región 5' no codificante del operón *mce3*: mapeo del promotor e identificación del operador *tetO'*

El promotor del operón *mce3* fue localizado dentro de la región de 880 pb comprendida entre los genes *mce3R* y *Rv1964* (P3). La región promotora fue identificada dentro de las 206pb (P3-200) ubicadas río arriba del codón de iniciación del gen *Rv1964* mediante deleciones de la región intergénica y determinación de la actividad promotora por fusión a  $\beta$ -galactosidasa. La búsqueda de promotores procariotas en la base de datos (<http://www.fruitfly.org>) localizó un probable promotor entre las bases -170 y -230 respecto del ATG de dicho gen. Por comparación de secuencias promotoras micobacterianas publicadas, Mulder y colaboradores han establecido un consenso -10 TAT[A/G][A/C]T y también un consenso -35 TTGAC[G/A] muy poco conservado (Mulder *et al.* 1997). En teoría los consensos -10 y -35 micobacterianos están conservados con respecto a los de *E. coli* TATAAT y TTGACA con una tendencia a reemplazar A/T por G/C debido al alto contenido de G+C en el genoma de *M. tuberculosis*. La presencia de una caja -35 poco conservada podría relacionarse con la presencia de una ARNP poco específica o con la existencia de múltiples factores sigma que reconocen consensos -10 similares y consensos -35 disímiles. Por otro lado, la importancia del consenso -35 podría estar dada por influir en la fuerza de un promotor determinado (Bashyam *et al.* 1996, Gomez *et al.* 2000).

El programa DNA *Strider* identificó en P3-200 una secuencia -10 TATATG entre -182 y -178 que se corresponde 4/6 con la secuencia -10 típica de *E. coli* y con el consenso de Mulder; y una secuencia -35 TAGCAA entre las bases -204 y -198 que coincide en 4/6 con el *box* -35 del promotor *hsp60* de BCG y 3/6 con el consenso de Mulder (Mulder *et al.* 1997, Gomez *et al.* 2000). Estos motivos colocalizan con el promotor mapeado por los experimentos de  $\beta$ -galactosidasa. Sin embargo el sitio de inicio de la transcripción (TSP) identificado mediante la técnica de *primer extension* ubica la secuencia -10 TATATG a -32 nucleótidos del TSP. Una secuencia TATTTA con menor correspondencia al consenso -10 se localiza a -12 bases del TSP propuesto. Al respecto, se ha demostrado que los promotores micobacterianos acomodan las secuencias -10 y -35 a distintas distancias, probablemente debido a la versatilidad de los diferentes factores sigma (Bashyam *et al.* 1996).



En la misma región P3-200 se identificó mediante diferentes técnicas la región operadora *tetO'* a la que se une Mce3R. La búsqueda *in silico* de un consenso *tet* dentro de esta región utilizando el programa DNA *Strider*, reflejó la presencia de un posible operador *tet*, con una homología de 10/14 bases con respecto al consenso *tet* de *E. coli* (Grkovic *et al* 2002). El mismo se encuentra situado entre las bases -14/-1 respecto del TSP propuesto, y por analogía a la nomenclatura utilizada en *E. coli* fue denominada (*tetO<sub>1</sub>'*). Por los experimentos de retardo en geles de poliacrilamida se demostró la unión específica de Mce3R a *tetO<sub>1</sub>'* y la mutación de las seis bases más conservadas del motivo con respecto al consenso *tet* de *E. coli*, ATCAGT, impidió la unión del regulador y el consiguiente retardo en el *gel shift*. Finalmente, los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa en las cepas de *M. smegmatis* transformadas con las regiones promotoras P3-200 que contienen el motivo *tetO<sub>1</sub>'* tal cual o mutado, en presencia o ausencia del regulador en *trans*, demostraron que si bien dicho motivo está involucrado en la represión de P3-200, no es el único responsable. Esta mutación en el consenso *tetO<sub>1</sub>'* no elimina por completo la represión de Mce3R, sino que la disminuye a sólo la mitad.

Río abajo de *tetO<sub>1</sub>'* a una distancia de 22 bases fue posible identificar otro motivo *tetO'* denominado *tetO<sub>2</sub>'* con una similitud con respecto al consenso *tet* de *E. coli* de 8/14 bases. La región protegida en el *footprinting* por Mce3R en P3-200 de la digestión por la DNasaI abarca las bases que van desde -7 hasta +40. Sorprendentemente esta región no abarca completamente y sólo se superpone parcialmente con el motivo *tetO<sub>1</sub>'* y si comprende totalmente el motivo *tetO<sub>2</sub>'* situado entre las bases +23 y +36. De acuerdo con estos resultados podríamos proponer que el sitio *tetO<sub>2</sub>'* de menor homología con respecto al de *E. coli*, sería el que Mce3R reconoce con mayor afinidad. Así mismo estarían indicando que el operador *tet* reconocido por Mce3R en micobacterias también consiste al igual que el de *E. coli*, en dos motivos *tet* de diferente afinidad. Para demostrar esto último haría falta otro experimento de *footprinting* utilizando en la interacción concentraciones de proteína purificada mayores a las aquí utilizadas y observar si en esas condiciones *tetO<sub>1</sub>'* se protege de la digestión por DNasa I.

Al analizar la región promotora del represor *mce3R in silico*, otros tres posibles consensos *tet* fueron identificados en las inmediaciones de las secuencias CGCGATGAT y TTGCAA con homología a regiones promotoras -10 y -35, respectivamente. Uno de ellos es un motivo ubicado entre las bases -300/-313 río arriba del ATG de Mce3R, que presentó una homología con respecto al consenso *tet* de *E. coli*

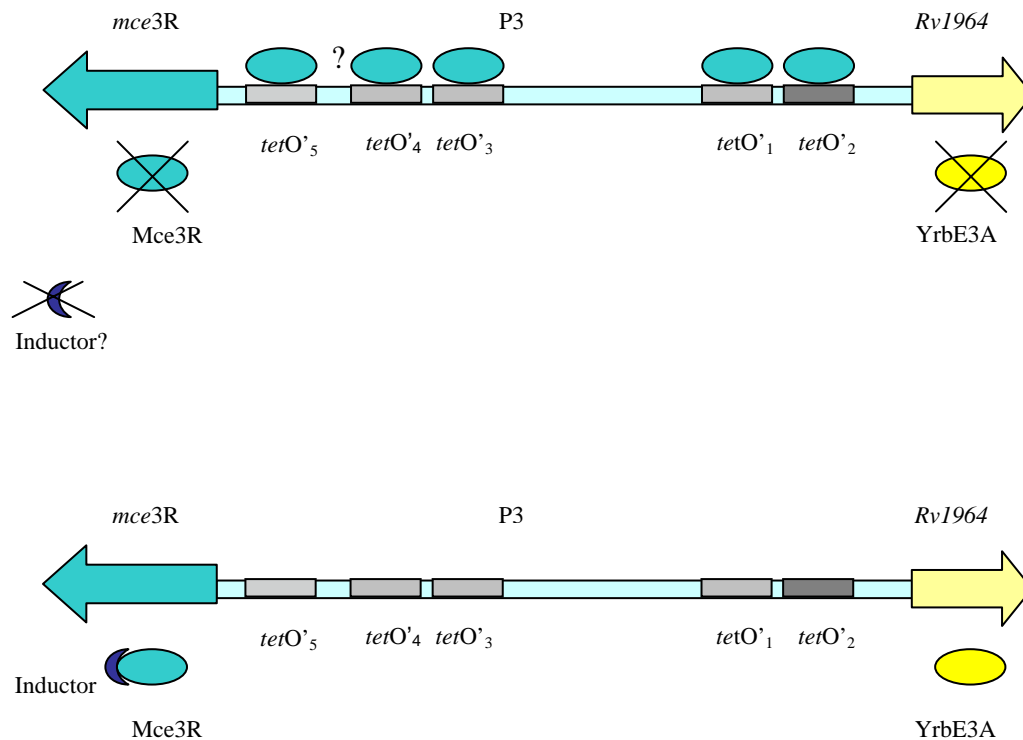
de 11/14 bases y continuando con la nomenclatura propuesta fue denominado *tetO*<sub>3</sub>'. Las otras dos secuencias que se identificaron también tienen alta homología al consenso *tet* de *E. coli* (9/14 y 10/14), son muy similares entre sí y están ubicadas en las posiciones -279/-292 y -196/-209. Dichas regiones fueron denominadas *tetO*<sub>4</sub>' y *tetO*<sub>5</sub>' respectivamente. La presencia de estos operadores *tet* sugiere que Mce3R podría reconocer un sitio de unión en su propio promotor autorregulando su expresión. Esto último fue demostrado mediante los ensayos de actividad de β-galactosidasa y se condice con los datos disponibles para numerosos reguladores transcripcionales que regulan su expresión como una manera de responder rápidamente a la presencia de un estímulo (Ramos *et al.* 2005).

#### 4. Modelo propuesto de regulación del operón *mce3* por Mce3R

En base a los resultados obtenidos en los experimentos de *gel shift*, *footprinting* y de fusiones a β-galactosidasa y considerando la necesidad de realizar algunos experimentos confirmatorios, nos planteamos proponer el siguiente modelo de regulación: en ausencia del inductor Mce3R se une en una primera instancia al sitio de alta afinidad *tetO*'<sub>2</sub>. Desde allí es capaz de unir directamente otra molécula de Mce3R o modificar la estructura espacial del ADN de manera de favorecer la unión al segundo sitio *tetO*'<sub>1</sub> y de este modo prevenir la transcripción del operón *mce3*. De acuerdo a nuestras observaciones la unión a ambos motivos *tet* previene casi completamente la expresión de los genes *mce3*. A continuación, en presencia de altos niveles de regulador, Mce3R se uniría a los otros motivos *tet* cercanos al promotor de *mce3R* (*tet O*'<sub>3, 4 y 5</sub>) reprimiendo su propia transcripción, ya que la unión de Mce3R por los mismos parecería de menor afinidad (**Figura 39**).

En presencia del inductor por ahora desconocido, éste se une a Mce3R produciendo un cambio conformacional que resultaría en la liberación del operador y la subsiguiente expresión del propio Mce3R y de los genes estructurales del operón *mce3*. El sistema se apaga cuando desaparece el inductor y la proteína Mce3R sintetizada se une nuevamente a los operadores *tet*. Las condiciones bajo las que este sistema vuelve a encenderse y un inductor se une a Mce3R favoreciendo la expresión de los genes *mce3*, aún no se conocen y serán motivo de investigaciones futuras.

**Figura 39**



**Modelo propuesto de regulación del operón *mce3* por Mce3R.** En ausencia del inductor Mce3R se une al sitio de alta afinidad *tetO'*<sub>2</sub>. Desde allí es capaz de unir directamente otra molécula de Mce3R o curvar el ADN de manera de favorecer la unión al segundo sitio *tetO'*<sub>1</sub> y de este modo prevenir la transcripción del operón *mce3*. Finalmente a concentraciones mayores de proteína se une a los motivos de baja afinidad (*tetO'*<sub>3</sub>, *tetO'*<sub>4</sub> y *tetO'*<sub>5</sub>) reprimiendo su propia transcripción. En condiciones que aún no se conocen, en presencia del inductor se libera la transcripción de ambos genes otra vez.

Como se mencionó anteriormente, interrumpiendo la maduración del fagosoma mediante la neutralización del pH, *M. tuberculosis* puede sobrevivir y multiplicarse dentro del macrófago. Las condiciones ambientales a las que debe enfrentarse durante la infección no se conocen pero numerosos factores como cambios de temperatura, bajas concentraciones de oxígeno y diferente disponibilidad de nutrientes. Las condiciones hostiles dentro del macrófago tales como bajo pH, intermediarios del oxígeno y condiciones anaeróbicas, podrían contribuir a la expresión por parte del bacilo de los factores que le permitan adaptarse a esos cambios e inducir una infección persistente. Sin embargo ninguno de los estreses aquí evaluados que simulan las condiciones dentro del macrófago, tampoco la Tetraciclina que induce el regulador TetR de *E. coli* o el metilviológico, un agente que daña el ADN y promueve la expresión de genes

involucrados en la reparación y síntesis del ADN, fueron capaces de inducir la expresión de los genes *mce3*. Durante la infección de una línea de macrófagos murinas se observó una leve inducción al comparar la actividad promotora durante el crecimiento *ex vivo* con respecto al crecimiento *in vitro*. Sin embargo en el modelo de infección utilizado no pudo lograrse una liberación de la expresión del operón *mce3*. Por otro lado, en los últimos días de infección de la línea J774, se observó un aumento de la expresión tanto en la cepa H37Rv-P3 como en H37Rv-P3-*mce3R*, lo que indicaría que la expresión del operón *mce3* podría estar regulada también en una manera independiente de Mce3R.

Los estudios de regulación revelaron que el promotor del operón *mce3* (P3) parecería ser un promotor fuerte, aunque en presencia del regulador está casi totalmente reprimido lo que sugiere la necesidad de controlar rigurosamente la transcripción del operón *mce3*. El promotor del regulador *mce3R*, en cambio, es más débil y no se reprime totalmente lo cual puede ser argumentado por la diferencia en la afinidad de Mce3R por los operadores *tet*, como se explicó anteriormente. Estas condiciones garantizarían que en presencia de bajas cantidades de Mce3R en primer lugar se reprima la transcripción del operón *mce3* y continúe la síntesis del regulador hasta alcanzar un nivel tal que comience a reprimirse también su propia transcripción. Posiblemente, esto beneficie a la bacteria ya que sólo expresaría los genes *mce3* en un momento determinado y en la dosis adecuada. Podría ser que la sobreexpresión o la expresión constitutiva de estos genes resulte perjudicial para la bacteria. De hecho, los experimentos realizados en este trabajo para evaluar la virulencia en un modelo de infección de ratón de una cepa mutante en el gen *mce3R* ( $\Delta mce3R$ ) en los que se expresan altos niveles del operón *mce3*, demostraron que esto resulta en un fenotipo levemente más virulento con respecto a la cepa salvaje, y la sobreexpresión de la proteína Mce3R en la cepa complementante le confirió un fenotipo atenuado. Sin embargo no se puede descartar que el fenotipo observado también se deba a la desregulación de algún otro de los genes que forman parte del regulón de Mce3R.

Estos resultados coinciden con los observados previamente en nuestro laboratorio, cuando una cepa mutante en el operón *mce3* ( $\Delta mce3$ ) resultó atenuada en un modelo de infección de ratón (Gioffré *et al.* 2005). También concuerdan con los observados por Riley y colaboradores quienes obtuvieron una mutante en el operón *mce1* que resultó hipervirulenta en un modelo de infección de ratón. Los autores postulan que la ausencia del operón *mce1* contribuye a una respuesta inmune aberrante por parte del huésped que

lleva a la formación de un granuloma mal organizado (Shimono *et al.* 2003). Por lo tanto, haría falta una fina regulación de la expresión de *mce1* para desencadenar una respuesta inmune pro inflamatoria que sea tanto protectora para el huésped como crítica para una correcta formación de un granuloma organizado y, por ende, para el establecimiento de una infección persistente por parte de *M. tuberculosis*.

### 5. Expresión de los operones *mce*.

La expresión de los operones *mce* es objeto de estudio por parte de diferentes grupos de investigación. La expresión de las proteínas Mce de *M. tuberculosis* ha sido demostrada tanto *in vitro* (Harboe *et al.* 1999) como durante la infección *in vivo* (Ahmad *et al.* 1999, 2005). La localización de las proteínas Mce1 en la membrana citoplasmática fue demostrada (Chitale *et al.* 2001; Shimono *et al.* 2003) y es consistente con el rol en la invasión originalmente propuesto por Riley y colaboradores (Arruda *et al.* 1993). Otros autores monitorearon la expresión del gen *mceA* de cada operón mediante la técnica de RT-PCR en cultivos de *M. tuberculosis* en distintos estadios del crecimiento *in vitro*, y observaron la expresión de los cuatro operones en las fases más tempranas del crecimiento y una disminución en la expresión de *mce3* y 4 hacia las fases más tardías (Haile *et al.* 2002).

Contrariamente a estas observaciones, en los experimentos de regulación utilizando el gen *lacZ* como reportero llevados a cabo en este trabajo, no fue posible detectar expresión del operón *mce3* en presencia del gen regulador en ninguna de las condiciones evaluadas en las cepas de *M. smegmatis* y *M. tuberculosis* crecidas *in vitro* en el medio sintético 7H9. Al utilizar la técnica de RT-PCR cuantitativa, fue posible detectar bajos niveles de transcripción del operón *mce3* en la cepa de *M. tuberculosis* salvaje, aunque la ausencia de Mce3R en la cepa mutante  $\Delta mce3R$  mostró un aumento en la transcripción de ocho veces. Por lo tanto es posible postular que o bien el transcripto detectado en la cepa salvaje no es traducido o que la actividad de  $\beta$ -galactosidasa en dicha cepa no es detectable debido a la baja sensibilidad del método. Al respecto, es interesante destacar la importancia de las técnicas utilizadas para el estudio de la expresión génica en micobacterias.

Al comparar la expresión de los cuatro promotores *mce* en *M. tuberculosis* se observó que los operones *mce1* y 2 se expresaron *in vitro* a lo largo del tiempo de cultivo. El promotor P1 no parece ser un promotor muy fuerte mientras que P2 es un promotor

activo y más fuerte que el anterior, y a pesar de la presencia de Mce2R, no parecería estar completamente reprimido bajo las condiciones estudiadas. El promotor P4 es activo en fase exponencial aumentando los niveles de expresión hacia comienzos de la fase estacionaria, pero aún no se conoce qué mecanismos de regulación controlan su expresión. Por último el promotor P3 que es muy fuerte en ausencia de Mce3R, en cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis* salvaje está casi totalmente apagado por la represión que ejerce Mce3R. Estos resultados fueron confirmados en la cepa mutante para el gen endógeno  $\Delta mce3R$ , ya que cuando la misma fue transformada con la construcción que sólo lleva la región P3 presentó una alta actividad enzimática, mientras que cuando fue complementada con una copia salvaje del gen, la actividad fue aproximadamente cien veces menor.

Los datos acerca del perfil de expresión de los operones *mce* durante el cultivo *in vitro* de *M. tuberculosis*, coinciden con los obtenidos por Kumar y colaboradores (2003) quienes no detectaron expresión de los operones *mce2* y *3* en ninguna de las fases del crecimiento *in vitro*. En fase exponencial observaron niveles significativos del operón *mce1*, volviéndose casi indetectable en fase estacionaria donde comenzaron a aumentar los niveles de expresión del operón *mce4*. Al analizar la expresión en modelos animales también detectaron diferencias en el perfil de expresión de los operones *mce*. Por lo tanto, el patrón de expresión es diferencial en distintas fases de crecimiento *in vitro* y en distintos tejidos durante la infección *in vivo*. En otro trabajo, los mismos autores pudieron detectar transcripción de los operones *mce2*, *3* y *4* *in vitro* a partir de cultivos crecidos en medio sólido Lowenstein- Jensen (LJ) (Kumar *et al.* 2005).

La obtención de estos resultados contrapuestos nos llevó a observar las condiciones de cultivo utilizadas en cada trabajo. Es interesante destacar que existe una marcada diferencia en los medios de cultivo utilizados para crecer *M. tuberculosis* y evaluar expresión de los genes *mce*. En medio sintético 7H9 no se puede detectar la expresión del operón *mce3* (este trabajo y Kumar *et al.* 2003), mientras que en medios ricos como Dubos o LJ, tanto Kumar (2005) como Haile (2002) pudieron detectar la presencia del transcripto *mce3*. Esto nos lleva a pensar que en los medios ricos y no en 7H9 podría estar presente algún inductor que se une a Mce3R liberando la transcripción de los genes *mce3*. Esta hipótesis podría ser contrastada evaluando la transcripción del operón *mce3* mediante RT-PCR cuantitativa a partir de cultivos de *M. tuberculosis* crecidos en distintos medios y fases de cultivo.

Por otro lado, Kumar y colaboradores en cultivos en medio sintético 7H9 de *M. bovis* que no posee el operón *mce3*, detectaron la expresión de *mce2* tanto en fase exponencial como en fase estacionaria (Kumar *et al.* 2005). Al estudiar la expresión de los cuatro operones en *M. smegmatis*, observaron que en esta cepa de crecimiento rápido y no patógena la expresión depende de las condiciones de la aireación, disponibilidad de nutrientes y fase de crecimiento. Por lo tanto, la aparente redundancia de los operones *mce* en micobacterias podría haber evolucionado hacia una mejor adaptación a las condiciones variables de crecimiento y a la adquisición por parte de las cepas patógenas de mecanismos de entrada y supervivencia en las células del huésped.

En todos estos trabajos se observa que, dependiendo del sistema y/o modelo animal bajo estudio o las estrategias experimentales empleadas, el patrón de expresión de los operones *mce* es variable. Si bien el análisis de este conjunto de resultados no ha sido suficiente para definir cuales son los factores que determinan el encendido/apagado de cada operón y explicar el significado biológico de estas variaciones, ha permitido establecer que no existe asociación entre los perfiles de expresión de cada operón y que el medio ambiente circundante condiciona la expresión, indicando que la misma debe ser regulada.

## 6. Regulación de los operones *mce*

El complejo patrón de expresión temporal descrito para cada uno de los operones *mce*, junto con la presencia de posibles reguladores transcripcionales en las inmediaciones de *mce1* y *mce2* indicarían, que al igual que lo que ocurre para el operón *mce3*, la expresión de *mce1*, *mce2* y *mce4* está también regulada. Por otro lado, el alto grado de conservación entre los genes *mce* plantea la posibilidad de que Mce3R actúe regulando la expresión de los otros operones *mce*, en especial *mce4* que es el único carente de un gen regulador vecino. Para evaluar esta hipótesis se determinó la capacidad de Mce3R de regular la expresión de los operones *mce1*, *mce2* y *mce4* mediante la utilización de un gen reportero. No fue posible detectar actividad regulatoria de Mce3R sobre *mce1*, 2 y 4 en los ensayos en los que se empleó  $\beta$ -galactosidasa lo que indica que al menos en las condiciones evaluadas, Mce3R no regula la expresión de los otros operones *mce*. Un análisis de las regiones intergénicas *in silico* utilizando el programa DNA Strider localizó secuencias en los promotores de los operones *mce2* y *mce4* parcialmente

homólogas al consenso *tet* identificado en P3. Sin embargo estas regiones no serían suficientes para la unión y la represión por parte de Mce3R.

El uso de *M. smegmatis* como cepa heteróloga en los experimentos de regulación tiene ventajas tales como el tiempo más corto de duplicación y la posibilidad de trabajar en un fondo genético similar sin tratarse de una cepa patógena. No obstante, podría ocurrir que algún factor presente en *M. tuberculosis* y ausente en *M. smegmatis* también participe en la regulación de los operones *mce* y sea necesario para desencadenar una red de regulación conjunta interaccionando directa o indirectamente con las regiones promotoras de los operones *mce*. Sin embargo, al evaluar la transcripción de los operones *mce1*, 2 y 4 en la cepa de *M. tuberculosis*  $\Delta mce3R$  mediante RT-PCR cuantitativa no fue posible detectar diferencia de expresión de ninguno de los operones con respecto a la salvaje. Por lo tanto podemos concluir que el hecho de encontrar reguladores transcripcionales de la familia GntR adyacentes a los operones *mce1* y *mce2* y la expresión diferencial de los cuatro operones estaría reflejando que son regulados cada uno por su propio regulador específico y que podrían cumplir funciones diferentes o similares pero inducidas por factores distintos.

Casali y colaboradores caracterizaron a Mce1R como el responsable de reprimir la transcripción del operón *mce1* intracelularmente, lo que demuestra que genes importantes para la virulencia no son necesariamente expresados en macrófagos. Mce1R es un represor de la subfamilia FadR de la familia GntR y se encuentra adyacente a los genes *Rv0166- Rv0178* que conforman el operón *mce1*. Estos reguladores suelen estar involucrados en modular la degradación de ácidos grasos. Es interesante destacar que la organización del operón *mce1* es levemente diferente a los demás ya que la primera ORF codifica para una acyl CoA sintetasa, *fad5*, que catalizaría el primer paso en la degradación de ácidos grasos. Además *mce1* parecería estar regulado también en una manera independiente de Mce1R, lo que sugiere que la expresión del operón podría estar bajo la regulación de un regulador global o de varios represores transcripcionales (Casali *et al.* 2006).

En un trabajo aún no publicado, nuestro grupo de investigación caracterizó el gen *Rv0586* (Mce2R), también de la familia GntR, como un represor de la transcripción del operón *mce2*. La organización de este operón es peculiar, ya que posee un pequeño marco de lectura abierto entre los genes *mce2B* y C. Además, *mce2R* se encuentra en el mismo sentido de la transcripción que el resto de los genes y sería la primera ORF de la unidad transcripcional. Sin embargo, los niveles de transcripto detectados por RT-PCR



cuantitativa son mayores para *mce2R* que para el resto del operón (datos no mostrados, manuscrito en preparación), sugiriendo la existencia de algún mecanismo de regulación post- transcripcional adicional.

## 7. Identificación del regulón de Mce3R

La regulación de la expresión génica permite a las bacterias responder a un estímulo y así adaptarse continuamente al medio ambiente. La regulación de la transcripción juega un rol central en la interacción huésped- patógeno y muchos genes de virulencia son expresados durante el proceso de infección en respuesta al huésped. *M. tuberculosis* es un patógeno intracelular, capaz de replicar en células fagocíticas y en algunos casos de resistir a las defensas del huésped. Por lo tanto el diálogo entre ambos debe ser complejo y posiblemente involucre numerosas redes de regulación. El conjunto de genes regulados por un mismo regulador transcripcional conforman un regulón, y la identificación del mismo puede contribuir a esclarecer la función que regula o las señales que inducen la expresión del regulón.

Las técnicas de *gel shift*, *footprinting*, ensayos con genes reporteros y ADN *microarrays* han sido ampliamente utilizadas para determinar los genes pertenecientes a un mismo regulón (Gold *et al* 2001; Camacho *et al* 1999). Sin embargo también se ha reportado el desarrollo de herramientas bioinformáticas para la predicción de posibles sitios de unión de un regulador transcripcional en las regiones intergénicas del genoma de *M. tuberculosis* (Prakash *et al.* 2005; Yellaboina *et al.* 2004). IdeR (*Iron-dependent regulator*) es uno de los reguladores clave en la transcripción de factores de virulencia y de genes involucrados en la adquisición de hierro. La comparación de los perfiles de transcripción de una cepa de *M. tuberculosis* salvaje y una mutante en el gen *ideR* mediante la técnica de *microarrays*, permitió identificar un grupo de genes regulados por hierro y por IdeR (Rodríguez *et al.* 2002). Posteriormente esta lista fue engrosada por genes identificados a partir de predicciones *in silico* (Prakash *et al.* 2005). Otros autores desarrollaron un servidor (PredictRegulon) que permite identificar potenciales sitios de unión de un regulador transcripcional a partir de un consenso dado. Una limitante de esta estrategia podría ser la identificación de candidatos falsos positivos. Sin embargo estos resultados deberían ser validados por evidencia experimental, ya sea por *gel shift* o RT- PCR (Yellaboina *et al.* 2004).

A partir de la identificación de los motivos *tetO'* a los que se une Mce3R en P3 fue posible definir un consenso y postularlo como posible sitio de unión en *M. tuberculosis*: **Tn[*cg*]nnATCA[*gc*][*tc*]nnT**, donde n representa cualquiera de las cuatro bases y las bases entre [] implican la presencia de una o la otra. Infiriendo que los genes que conformen el regulón de Mce3R deberían poseer un motivo *tetO'* en su región promotora, y deberían estar relacionados en la función que cumplen o la señal a la que responden, se procedió a identificar dichos genes mediante dos estrategias bioinformáticas. La disponibilidad de la secuencia del genoma <http://genolist.pasteur.fr/TubercuList/> facilitó la búsqueda en las regiones intergénicas del consenso *tet* reconocido por Mce3R. Un total de veinte regiones resultaron de la misma, incluyendo los cinco motivos *tet* (*tetO'*<sub>1-5</sub>). Por otro lado el servidor PredictRegulon ([www:http://predictregulon.com](http://predictregulon.com)) desarrollado para tal fin permite predecir los genes que conforman un regulón a partir de secuencias conocidas a las que se une un determinado regulador transcripcional (Yellaboina *et al.* 2004; Prakash *et al.* 2005). Los cinco motivos *tetO'* fueron ingresados para realizar la búsqueda, y un total de treinta y nueve secuencias resultaron de la misma, nueve de ellas coincidentes con la búsqueda en Tuberculist. Entre los genes de función conocida uno resultó ser el factor *rho* involucrado en la terminación de la transcripción, otro la lipoproteína *mpt83* altamente inmunogénica homóloga al antígeno MPB83 de *M. bovis*, un tercero el operón *celA2* involucrado en la conversión de celulosa en glucosa y por último la proteína *ffh* (*fifty tour homolog*) posiblemente involucrada en el reconocimiento de secuencias señal (SRP: *signal recognition particle*) de proteínas a ser exportadas. En otras bacterias las SRPs forman parte de la vía de secreción dependiente de Sec. También resultaron de la búsqueda otros genes de funciones variadas. Interesantemente algunos de ellos también están relacionados con transporte y son componentes de los sistemas ABC como *modC* y *Rv2041c*. Estos datos podrían relacionar a los genes *mce* con funciones de transporte. Los dos primeros genes de los operones *mce* (*yrbEA* y B) codifican para proteínas integrales de membrana y los otros seis *mceA-F* también codifican para proteínas exportadas. Otros autores ya habían insinuado el rol de los operones *mce* en transporte (Tekaia *et al.* 1999, Kumar *et al.* 2005), y si bien harán falta más experimentos que lo confirmen, las evidencias aquí presentadas también sugieren la implicancia de los operones *mce* en sistemas de transporte.

Recientemente Sasseti y colaboradores utilizaron una novedosa estrategia para identificar interacciones genéticas (epístasis). Estas interacciones pueden ser negativas

(sinérgicas), o positivas (antagónicas). Las interacciones negativas se encuentran frecuentemente entre genes de diferentes vías que cumplen funciones redundantes, mientras que las positivas ocurren entre genes de la misma vía que dependen uno del otro para cumplir su función. Previamente los autores desarrollaron una técnica que combina la mutagénesis insercional de alta densidad con la técnica de *microarrays* TraSH (Sasseti *et al.* 2001) y en este trabajo la utilizaron para identificar genes que interaccionan con los operones *mce1* y *mce4*. Además de identificar una interacción negativa entre ambos *loci* que sugiere que realizan funciones similares o redundantes, hallaron un gen *Rv0655* (denominado *mceG*) que codifica para una proteína con homología a los dominios de unión a nucleótidos (NBD) de los transportadores ABC. Ya que *mceG* no posee dominios transmembrana, ni se encuentra cercana a otros componentes de transporte, los autores postulan que podría asociarse a los genes *yrbAB* de los operones *mce* para formar cuatro sistemas de transporte diferentes (Joshi *et al.* 2006). Una gran proporción de los genes que identificaron están involucrados en funciones de transporte o metabolismo de lípidos. Coincidentemente, uno de ellos *Rv2038c* (probable *ATP binding protein*) probablemente involucrado en el transporte activo de azúcares a través de la membrana, conforma un operón con *Rv2041c* el cual fue identificado en este trabajo mediante el análisis *in silico* para la predicción del regulón de Mce3R, y formarían parte de un mismo transportador ABC.

## 8. Obtención de un sistema inducible y su aplicación biotecnológica

Los sistemas de expresión inducibles son herramientas útiles para el estudio de función de genes, regulación y la obtención de mutantes condicionales. En micobacterias es muy poco lo que se conoce sobre promotores inducibles. El sistema más usado es el de la acetamidasa una enzima que se induce en presencia de acetamida como fuente de carbono y es reprimido en presencia de succinato (Parish *et al.* 1997). Triccas y colaboradores desarrollaron un vector (pJAM2) que permite la expresión y purificación de antígenos bajo la regulación del promotor de la acetamidasa (Triccas *et al.* 1998). Sin embargo en nuestro grupo fue utilizado sin éxito.

El sistema Tet es ampliamente utilizado para la regulación de la expresión en células eucariotas: cultivos celulares, plantas transgénicas, moscas y roedores (Berens *et al.* 2003, Dingermann *et al.* 1992, Ulmasov *et al.* 1997). Combina las propiedades del regulador TetR de *E. coli*, su alta afinidad por el operador *tetO* y las propiedades

farmacocinéticas de la tetraciclina que atraviesa la membrana plasmática y puede ser utilizada como inductor en dosis mucho menores a la concentración inhibitoria mínima. El sistema caracterizado en este trabajo podría utilizarse como sistema inducible en micobacterias. El promotor P3 es un promotor fuerte y también es fuertemente reprimido, por lo que permitiría expresar bajo su regulación un antígeno en determinadas condiciones. Este sistema permitiría por ejemplo la identificación de promotores regulados por un factor de transcripción comparando en réplica la expresión de promotores de una *library* en presencia o ausencia del regulador. Hace falta realizar más experimentos para identificar el inductor de Mce3R y las condiciones en las que la expresión es liberada. Pero se podría tomar como ventaja el hecho de disponer de medios de cultivo en los que el promotor se encuentra reprimido o encendido.

Ehrt y colaboradores recientemente reportaron un sistema de expresión en micobacterias en medio líquido y durante la infección de células que utiliza el operador *tet* y el represor inducible por tc de *E. coli* (Ehrt *et al.* 2005). La utilización de este sistema permitió la obtención de una mutante condicional. Esto podría ser de utilidad para la caracterización de genes importantes para el crecimiento *in vivo* y la persistencia en micobacterias.

A partir de las evidencias presentadas en este trabajo podemos concluir que:

El gen *Rv1963c*, que codifica para la proteína Mce3R, pertenece a la familia de reguladores TetR y regula negativamente la transcripción del operón *mce3* de *M. tuberculosis*.

Mce3R reconoce un operador *tet* en el promotor del operón *mce3* en *M. tuberculosis*, al que se une posiblemente impidiendo la unión de la ARNP. A partir de estos datos fue posible proponer un modelo de regulación por el que Mce3R reprime la transcripción del operón *mce3*.

Mce3R autorregula su transcripción reconociendo otros motivos *tet* en su propio promotor. Sin embargo la afinidad por ambos operadores es diferente, garantizando una correcta regulación de los niveles de expresión de los genes *mce3* y *mce3R*.

Mce3R no regula la transcripción de los operones *mce1*, *mce2* y *mce4*. Esto refuerza la hipótesis de que los operones *mce* cumplirían funciones diferentes y cada uno de ellos estaría regulado por su propio regulador.

Los operones *mce* podrían estar relacionados con funciones de transporte ya que algunos de los genes putativos *targets* de Mce3R (regulón de Mce3R) identificados *in silico* son componentes de los sistemas ABC o de la vía de secreción dependiente de Sec.

Los genes *mce3* cumplen un rol durante la infección, ya que se observó inducción de la expresión de estos genes durante la infección de una línea de macrófagos murinos tanto en presencia como en ausencia de Mce3R. Estos ensayos también demostraron que *mce3* parecería estar regulado en una manera independiente de Mce3R. Lo mismo ocurre con el operón *mce1* (Casali *et al* 2006), sugiriendo que la expresión de los operones *mce* podría estar bajo la regulación de un regulador global o de varios reguladores transcripcionales.

Los genes regulados por Mce3R son determinantes de virulencia de *M. tuberculosis*, ya que la mutación en el gen *mce3R* ( $\Delta mce3R$ ) resultó en un fenotipo levemente más virulento que H37Rv, mientras que la complementante en presencia del regulador en alto número de copia, resultó en una cepa más atenuada que la salvaje. En particular, se confirmó la implicancia del operón *mce3* en virulencia en concordancia con los datos reportados por Gioffré *et al.* 2005.

Se ha caracterizado un sistema inducible que podrá ser usado como herramienta en el estudio de regulación y función de genes y la obtención de mutantes condicionales en micobacterias.

Se ha obtenido una cepa mutante en el gen *mce3R* ( $\Delta mce3R$ ) que abre el camino hacia la exploración de este sistema de regulación mediante el empleo de tecnologías de genómica funcional.

**Abou-Zeid C, Ratliff T L, Wiker H G, Harboe M, Bennedsen J, Rook G A.** (1988). Characterization of fibronectin-binding antigens released by *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG. *Infect Immun*;56:3046–3051.

**Aguilar, L. D.; Infante, E.; Bianco, M. V.; Cataldi, A.; Bigi, F. and Hernandez Pando, R.** (2006). Immunogenicity and protection induced by *Mycobacterium tuberculosis mce-2* and *mce-3* mutants in a Balb/c mouse model of progressive pulmonary tuberculosis. *Vaccine*; 24 2333–2342.

**Ahmad S, Akbar PK, Wiker HG, Harboe M, Mustafa AS.** (1999). Cloning, expression and immunological reactivity of two mammalian cell entry proteins encoded by the *mce1* operon of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*; 50(5):510-8.

**Ahmad S, El-Shazly S, Mustafa AS, Al-Attayah R** (2005). The six mammalian cell entry proteins (Mce3A-F) encoded by the *mce3* operon are expressed during in vitro growth of *Mycobacterium tuberculosis*. *Scandinavian Journal of Immunology*; 62(1):16-24

**Aínsa, J. A.; Martín, C.; Cabeza, M.; De la Cruz, F. and Mendiola, M. V.** (1996). Construction of a family of *Mycobacterium/ Escherichia coli* shuttle vectors derived from pAL5000 and pACYC184: their use for cloning an antibiotic- resistance from *Mycobacterium fortuitum*. *Gene*; 176, 23-26.

**Andersen, P.** (1997). Host responses and antigens involved in protective immunity to *Mycobacterium tuberculosis*. *Scand. J. Immunology*. 45, 115-131.

**Armitige LY, Jagannath C, Wanger AR, Norris SJ.**(2000) Disruption of the genes encoding antigen 85A and antigen 85B of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv: effect on growth in culture and in macrophages. *Infection and Immunity* 68(2):767-78

**Arruda, S.; Bomfim, G.; Knights, R.; Huima- Byron, T. & Riley, L.** (1993). Cloning of an *M. tuberculosis* DNA fragment associated with entry and survival inside cells. *Science*; 261, 1454-1457.

**Ausubel, F. M.; Brent, R.; Kingston, R. E.; Moore, D.; Seidman, J. G.; Smith, J. A. and Struhl, K. (ed.).** (1996). Current protocols in Molecular Biology; J. Wiley & Sons, Inc., N. Y.

**Azad, A.; Sirakova, T.; Fernandes, N. and Kolattukudy, P.** (1997). Gene knockout reveals a novel gene cluster for the synthesis of a class of cell wall lipids unique to pathogenic mycobacteria. *Journal of Biological Chemistry*, 272 (27) 16741- 16745.

**Balasubramanian, V., M. S. Pavelka, S. S. Bardarov, J. Martin, T. R. Weisbrod, R. A. McAdam, B. R. Bloom, and W. R. Jacobs. Jr.** (1996). Allelic exchange in *Mycobacterium tuberculosis* with long linear substrates. *Journal of Bacteriology*; 178:273–279.

**Bange, F. C.; Brown, A. M. and Jacobs, W. R. Jr.** (1996). Leucine auxotrophy restricts growth of *Mycobacterium bovis* BCG in macrophages. *Infection and Immunity*; 64(5): 1794–1799.

**Bardarov, S.; Bardarov, S. Jr.; Pavelka, M.S. Jr.; Sambandan, V. Larsen, M.** (2002). Specialized transduction: an efficient method for generating marked and unmarked targeted gene disruption in *Mycobacterium tuberculosis*, *M. bovis* BCG and *M. smegmatis*. *Microbiology*, 148: 3007-3017.

**Bashyam, M. D.; Kaushal, D.; Dasgupta, S. K. And Tyagi, A. K.** (1996). A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *Journal of bacteriology*; 178: 4847-4853.

**Baulard, A. R.; Betts, J.; Engohang-Ndong, J.; Quan, S.; McAdam, R.; Brennan, P.; Locht, C. and Besra, G.** (2000). Activation of the pro-drug ethionamide is regulated in *Mycobacteria*. *Journal of Biological Chemistry*, 275, (36) 28326-28331.

**Belisle J T, Vissa V D, Sievert T, Takayama K, Brennan P J, Besra G S.** (1997). Role of the major antigen of *Mycobacterium tuberculosis* in cell wall biogenesis. *Science*;276:1420–1422

**Berens, Ch and Hillen, W.** (2003). Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. *Eur. J. Biochem.* 270, 3109–3121.



**Berthet FX, Lagranderie M, Gounon P, Laurent-Winter C, Ensergueix D, Chavarot P, Thouron F, Maranghi E, Pelicic V, Portnoi D, Marchal G, Gicquel B.** (1998). Attenuation of virulence by disruption of the *Mycobacterium tuberculosis* *erp* gene. *Science* 282(5389):759-62.

**Bigi, F.; Gioffré, A.; Klepp, L.; Santangelo, M. P.; Alito, A.; Caimi, K.; Meikle, V.; Zumárraga, M.; Taboga, O.; Romano, M. I. and Cataldi, A.** (2004). The knockout of the *lprG-Rv1410* operon produces strong attenuation of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbes and Infection*; 6, (2), 182-187.

**Bigi, F.; Gioffré, A.; Klepp, L.; Santangelo, M. P.; Velicovsky, C.; Giambartolomei, G.; Fossati, C.; Romano, M. I.; Mendum, T. and McFadden, J.** (2005). Mutation in the gene of provokes attenuation of the bacillus in a mouse model. *Tuberculosis*, 85, (4) 221-226.

**Bigi, F; Alito, A.; Fisanotti, J. C.; Romano, M. I and Cataldi, A.** (1995). Characterization of a novel *Mycobacterium bovis* secreted antigen containing PGLTS repeats. *Infection and Immunity*; 63 (7) 2581-2586.

**Braunstein, M. and Belisle, J.** (2000). Genetics of protein secretion. *Molecular Genetics of Mycobacteria*, ASM Press, Washington D.C:

**Brennan PJ, Nikaido H.** (1995). The envelope of mycobacteria. *Annu Rev Biochem.*; 64:29-63.

**Brosch, R., Philipp, W. J., Stavropoulos, E., Colston, M. J., Cole, S. T. & Gordon, S. V.** (1999) Genomic analysis reveals variation between *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv and the attenuated *M. tuberculosis* H37Ra strain. *Infection and Immunity*; 67, 5768–5774.

**Brosch, R; Gordon, S.V.; Marmiesse, M.; Brodin, P.; Buchrieser, C.; Eiglmeier, K.; Garnier, T.; Gutierrez, C.; Hewinson, G.; Kremer, K.; Parsons, L.M.; Pym, A.S.; Samper, S.; van Soolingen, D. and Cole, S.T.** (2002). A new evolutionary scenario for the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *PNAS*, 99 (6), 3684- 3689.

**Calmette, A.** (1927). *La vaccination preventive contre la tuberculose*. Paris : Masson et cie.

**Camacho, L.R.; Ensergueix, D.; Perez, E.; Gicquel, B. & Guilhot, C.** (1999). Identification of a virulence gene cluster of *Mycobacterium tuberculosis* by signature-tagged transposon mutagenesis. *Molecular Microbiology*; **34** (2), 257- 267.

**Casali, N.; White, A. M. and Riley, L. W.** (2006). Regulation of the *Mycobacterium tuberculosis mce1* Operon. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*, **188** (2) 441–449

**Chan, J., X. Ran, S. W. Hunter, P. J. Brennan, and B. R. Bloom.** (1991). Lipoarabinomannan, a possible virulence factor involved in persistence of *Mycobacterium tuberculosis* within macrophages. *Infection and Immunity*; **59**:1755–1761.

**Chitale, S.; Ehrt, S.; Kawamura, I.; Fujimura, T.; Shimono, N.; Anand, N.; Lu, S.; Cohen- Gould, L.& Riley, L.** (2001). Recombinant *Mycobacterium tuberculosis* protein associated with mammalian cell entry. *Cellular Microbiology*; **3**(4), 247-254.

**Cole, S. T.** (2002). Comparative and functional genomics of the *Mycobacterium tuberculosis* complex. *Microbiology*; **148**: 2919- 2928.

**Cole, S.T.; Brosch, R.; Parkhill, J.; Garnier, T.; Churcher, C.; Harris, D.; Gordon, S.V.; Eiglmeler, K.; Gas, S.; Barry III, C.; Tekaiia, F.; Badcock, K.; Basham, D.; Brown, D.; Chillingworth, T.; Connor, R.; Davies, R.; Devlin, K.; Feltwell, T.; Gentles, S.; Hamlin, N.; Holroyd, S.; Hornsby, T.; Jagels, K.; Krogh, A.; McLean, J.; Moule, S.; Murphy, L.; Oliver, K.; Osborne, J.; Quail, M.A.; Rajandream, M.-A.; Rogers, J.; Rutter, S.; Seeger, K.; Skelton, J.; Squares, R.; Squares, S.; Sulston, J.E.; Taylor, K.; Whitehead, S. & Barrell, B.G.** (1998). Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*; **393**, 537-544.

Collins et al, 1995

**Collins, D.M. & Gicquel, B.** (2000). Genetics of mycobacterial virulence. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. ASM Press, Washington D.C.

**Dannenber, A.M. Jr.; Rook, G.A.W.** (1994). Pathogenesis of pulmonary tuberculosis: an interplay of tissue- damaging and macrophage- activating immune

responses- dual mechanisms that control bacillary multiplication. Tuberculosis: Pathogenesis, Protection and control. ASM Press, Washington D.C.

**Dasgupta N, Kapur V, Singh KK, Das TK, Sachdeva S, Jyothisri K, Tyagi JS.** (2000). Characterization of a two-component system, devR-devS, of Mycobacterium tuberculosis. Tuberculosis and Lung Diseases; 80(3):141-59

**De Voss, J. J.; Rutter, K.; Schroeder, B. G.; Su, H; Zhu, Y. Q. and Barry III, C. E.** (2000). The salicylate-derived mycobactin siderophores of Mycobacterium tuberculosis are essential for growth in macrophages. PNAS. 97 (3) 1252–1257

**Dellagostin, O. A., G. Esposito, L. J. Eales, J. W. Dale, and J. McFadden.** (1995). Activity of mycobacterial promoters during intracellular and extracellular growth. Microbiology; 141:1785–1792.

**Dingermann *et al.* 1992,**

**Eckert B, Beck CF.**(1989). Overproduction of transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein results in cell death and loss of membrane potential. Journal of Bacteriology; 171(6):3557-9.

**Ehrt S, Guo XV, Hickey CM, Ryou M, Monteleone M, Riley LW, Schnappinger D.** (2005). Controlling gene expression in mycobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. Nucleic Acids Res.;1; 33(2):e21.

**Engohang-Ndong, J.; Baillat, D.; Aumercier, M.; Bellefontaine, F. ; Besra, G. ; Locht, C and Baulard, A.** (2004). EthR, a repressor of the TetR/CamR family implicated in ethionamide resistance in mycobacteria, octamerizes cooperatively on its operator. Molecular Microbiology; 51 (1) 175- 188.

**Epe, B. & Woolley, P.** (1984). The binding of 6-demethylchlortetracycline to 70S, 50S and 30S ribosomal particles: a quantitative study by fluorescence anisotropy. EMBO J. 3, 121–126.

**Fine PEM .** (1989). The BCG story —lessons from the past and implications for the future. Rev Infect Dis ; 11 :S353 –S359.

**Fisher, M.A.; Plikaytis, B.B. and Shinnic, T.M.** (2002). Microarray analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* transcriptional response to the acidic conditions found in phagosomes. *Journal of Bacteriology*; 184: 4025- 4032.

**Flesselles, B.; Anand, N. N.; Remani, J.; Loosmore, S.M. & Klein, M.H.**(1999). Disruption of the mycobacterial cell entry gene of *Mycobacterium bovis* BCG results in a mutant that exhibits a reduced invasiveness for epithelial cells. *FEMS Microbiology Letters*; **177**, 237-242.

**Gioffré, A.; Infante, E; Aguilar, D.; Santangelo, M. P.; Klepp, L.; Amadio, A.; Meikle, V.; Etchehoury, I.; Romano, M. I.; Cataldi, A.; Hernández Pando, R.and Bigi, F.** (2005). Mutation in *mce* operons attenuates *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Microbes and Infection*; 7 325–334.

**Gold, B.; Rodriguez, G. M.; Marras, S. A. E.; Pentecost, M. and Smith, I.** (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* IdeR is a dual functional regulator that controls transcription of genes involved in iron acquisition, iron storage and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*; 42 (3) 851-865.

**Gomez, M. and Smith, I.** (2000). Determinants of Mycobacterial gene expression. *Molecular Genetics of Mycobacteria*. (7)111-129. ASM Press, Washington, D. C.

**Gomez, M., G. Nair, L. Doukhan, and I. Smith.** (1998). *sigA* is an essential gene in *Mycobacterium smegmatis*. *Molecular Microbiology*; **29**:617–628.

**Gordon, S.V; Heym, B.; Parkhill, J.; Barrell, B. and Cole, S.** (1999). New insertion sequences and a novel repeated sequence in the genome of *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv. *Microbiology*; 145, 881- 892.

**Graham J.E. and Clark- Curtiss, J.E.** (1999). Identification of *Mycobacterium tuberculosis* RNAs synthesized in response to phagocytosis by human macrophages by selective capture of transcribed sequences (SCOTS). *Proc. Natl. Acad. Sci.; USA* 96: 11554- 11559.

**Grkovic, S.; Brown, M. H. and Skurray, R. A.** (2002). Regulation of Bacterial Drug Export Systems. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, **66** (4) 671–701

**Guinn, K. M.; Hickey, M. J.; Mathur, S. K.; Zakel, K. L.; Grotzke, J. E.; Lewinsohn, D. M.; Smith, S. and Sherman, D. R.** (2004). Individual RD1- region genes are required for export ESA-6/ CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*; 51 (2), 359-370.

**Haile, Y.; Caugant, D.A.; Bjune, G. & Wiker, H.G.** (2002). *Mycobacterium tuberculosis* mammalian cell entry operon (mce) homologs in *Mycobacterium* other than tuberculosis (MOTT). *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; **33**: 125-132.

**Harboe M, Christensen A, Haile Y, Ulvund G, Ahmad S, Mustafa AS, Wiker HG.**(1999). Demonstration of expression of six proteins of the mammalian cell entry (mce1) operon of *Mycobacterium tuberculosis* by anti-peptide antibodies, enzyme-linked immunosorbent assay and reverse transcription-polymerase chain reaction. *Scand Journal of Immunology*;50(5):519-27.

**Hart, P. D. & Sutherland, I.** (1977). BCG and vole bacillus vaccines in the prevention of tuberculosis in adolescence and early adult life. *Br Med J* 2, 293±295.

**Hensel, M.; Shea, J.E.; Gleeson, C.; Jones, M.D.; Dalton, E. & Holden, D.W.** (1995). Simultaneous identification of bacterial virulence genes by negative selection. *Science*; **269**, 400- 403.

**Hoch, J. A., and T. J. Silhavy (Ed.).** (1995). Two-component signal transduction. American Society for Microbiology; Washington, D.C.

**Hovav, A. H.; Mullerad, J.; Davidovitch, L.; Fishman, Y.; Bigi, F.; Cataldi, A. and Bercovier, H.** (2003). The *Mycobacterium tuberculosis* Recombinant 27-Kilodalton Lipoprotein Induces a Strong Th1-Type Immune Response Deleterious to Protection. *Infection and Immunity*; 71(6): 3146–3154.

**Huffman, J. and Brennan, R.** (2002). Prokaryotic transcription regulators> more than just the helix-turn-helix motif. *Current Opinion in Structural Biology*; 12, 98-106.

**Hunter, S. W., H. Gaylord, and P. J. Brennan.** (1986). Structure and antigenicity of the phosphorylated lipopolysaccharide antigens from the leprosy and tubercle bacilli. *Journal of Biological Chemistry*; **261**:12345–12351.

**Jackson, M.; Phalen, S.; Lagranderie, M.; Ensergueix, D.; Chavarot, P.; Marchal, G.; McMurray, D.; Gicquel, B. And Guilhot, Ch.** (1999). Persistence and protective efficacy of a *Mycobacterium tuberculosis* auxotroph vaccine. *Infection and Immunity*; 67 (6), 2867- 2873.

**Joshi, S. M. ; Pandey, A. K. ; Capite, N. ; Fortune, S.M. ; Rubin, E. J. And Sasseti, C. M.** (2006). Characterization of mycobacterial virulence genes through genetic interaction mapping. *PNAS*, 103 (31) 11760- 11765.

**Jungblut, P. R., U. E. Schaible, H. J. Mollenkopf, U. Zimny-Arndt, B. Raupach, J. Mattow, P. Halada, S. Lamer, K. Hagens, and S. H. Kaufmann.** (1999). Comparative proteome analysis of *Mycobacterium tuberculosis* and *Mycobacterium bovis* BCG strains: towards functional genomics of microbial pathogens. *Molecular Microbiology*; 33:1103–1117.

**Kaufmann, S. H. E.** (2002). Protection against tuberculosis: cytokines, T cells, and macrophages. *Annals of the Rheumatic Diseases*; 2002;**61**:54-58

**Kaufmann, S. H. E.** (2004). New issues in Tuberculosis. *Ann Rheum Dis*; 63;50-56

Kinger, A.K. and Tyagi, J.S. (1993). Identification and cloning of genes differentially expressed in the virulent strain of *Mycobacterium tuberculosis*. *Gene*; 131: 113-117.

**Kleinschmidt C, Tovar K, Hillen W.** (1991). Computer simulations and experimental studies of gel mobility patterns for weak and strong non-cooperative protein binding to two targets on the same DNA: application to binding of tet repressor variants to multiple and single tet operator sites. *Nucleic Acids Res.* 11; 19(5):1021-8.

**Koch, R.** (1882). Die Aetiologie der Tuberculose. *Berl Klin Wochenschr* 19, 221±230.

**Kumar, A.; Bose, M. & Brahmachari.** (2003). Analysis of expression profile of mammalian cell entry (*mce*) operons of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*; 71 (10), 6083-6087.

**Kumar, A.; Chandolia, A.; Chaudry, U.; Brahmachari, V. and Bose, M.** (2005). Comparison of mammalian cell entry operons of mycobacteria: in silico analysis and expression profiling. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*; 43, 185-195.

- Lederer, T., Kintrup, M., Takahashi, M., Sum, P.E., Ellestad, G.A. & Hillen, W.** (1996) Tetracycline analogs affecting binding to Tn10-encoded Tet repressor trigger the same mechanism of induction. *Biochemistry*; 35, 7439–7446.
- Lee, M. H.; Pascopella, L.; Jacobs, W. R. and Hatfull, G.** (1991). Site- specific integration- proficient vectors for *Mycobacterium smegmatis*, *Mycobacterium tuberculosis*, and bacilli Calmette- Guérin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88, 3111- 3115.
- Lei, B.; Wei, C.J.; Tu, S.C.**(2000). Action mechanism of antitubercular isoniazid. Activation by *Mycobacterium tuberculosis* KatG, isolation, and characterization of inha inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*; 28; 275(4):2520-6.
- Lewis, K. N.; Liao, R.; Guinn, K. M.; Hickey, M. J.; Smith, S.;Behr, M. A. and Sherman, D.** (2003). Deletion of RD1 from *Mycobacterium tuberculosis* Mimics Bacille Calmette-Guérin Attenuation. *The Journal of Infectious Diseases*;187,117-123.
- Lipman, D.J. & Pearson, W.R.** (1985). Rapid and sensitive protein similarity searches. *Science*; 227, 1435- 1441.
- Manganelli, R., E. Dubnau, S. Tyagi, F. M. Kramer, and I. Smith.** (1999). Differential expression of 10 sigma factor genes in *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*; 31:715–724.
- Manganelli, R.; Proveddi, R.; Rodrigue, S.; Beaucher, J.; Gaudreau, L. and Smith, I.** (2004).  $\sigma$  Factors and Global Gene Regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY*; 186, (4) 895–902.
- Manganelli, R.; Voskuil, M.I.; Schoolnik, G.K. and Smith, I.** (2001). The *Mycobacterium tuberculosis* ECF sigma factor  $\sigma^E$ : role in global gene expression and survival in macrophages. *Molecular Microbiology*, 41:423–37.
- Marcinkeviciene, J. A.; Magliozzo, R. S. and Blanchard, J. S.** (1995). Purification and characterixation of the *Mycobacterium smegmatis* catalasa- peroxidase involved in isoniazid activation. *Journal of Biological Chemistry*, 38, 22290-22295.
- Martínez-Bueno, M., Tobes, R., Rey, M., and Ramos, J. L.** (2002). Detection of multiple extracytoplasmic function (ECF) sigma factors in the genome of *Pseudomonas*

*putida* KT2440 and their counterparts in *Pseudomonas aeruginosa* PA01. Environ. Microbiol. **4**:842–855.

**Mc Murry, L., Petrucci, R.E. Jr & Levy, S.B.** (1980) Active efflux of tetracycline encoded by four genetically different tetracycline resistance determinants in *Escherichia coli*. Proc. Natl Acad. Sci. USA **77**, 3974–3977.

**Mc. Adam, R.A.; Quan, S.; Smith, D.A.; Bardarov, S.; Betts, J.C. et. al.** (2002). Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv transposon library reveals insertions in 351 ORFs and mutants with altered virulence. Microbiology; **148**, 2975-2986.

**Miller, J. H.** (1972). Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory.

**Mollenkopf, H. J., P. R. Jungblut, B. Raupach, J. Mattow, S. Lamer, U. Zimny-Arndt, U. E. Schaible, and S. H. Kaufmann.** (1999). A dynamic two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis database: the mycobacterial proteome via Internet. Electrophoresis **20**:2172–2180.

**Mulder, M. A.; Zappe, H. and Steyn, L. M.** (1997). Mycobacterial promoters. Tuberculosis and Lung Diseases; **78**, 211- 223.

**Mulder, N. J., R. Apweiler, T. K. Attwood, A. Bairoch, D. Barrell, A. Bateman, D. Binns, M. Biswas, P. Bradley, P. Bork, P. Bucher, R. R. Copley, E. Courcelle, U. Das, R. Durbin, L. Falquet, W. Fleischmann, S. Griffiths-Jones, D. Haft, N. Harte, N. Hulo, D. Kahn, A. Kanapin, M. Krestyaninova, R. Lopez, I. Letunic, D. Lonsdale, V. Silventoinen, S. E. Orchard, M. Pagni, D. Peyruc, C. P. Ponting, J. D. Selengut, F. Servant, C. J. Sigrist, R. Vaughan, and E. M. Zdobnov.** (2003). The InterPro Data-base, brings increased coverage and new features. Nucleic Acids Res. **31**:315–318.

**Orth, P., Schnappinger, D., Hillen, W., Saenger, W. and Hinrichs, W.** (2000). Structural basis of gene regulation by the tetracycline inducible Tet repressor-operator system. Nat Struct Biol. **7**(3):215-9.



**Parish, T. and Stoker, N.** (2000). Use of a flexible cassette method to generate a double unmarked *Mycobacterium tuberculosis* tlyA plcABC mutant by gene replacement. *Microbiology*, **146**, 1969–1975

**Parish, T., Smith, D.A., Kendall, S., Casali, N., Bancroft, G.J. and Stoker, N.G.** (2003). Deletion of two-component regulatory systems increases the virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Infection and Immunity*; **71**(3): 1134–1140.

**Park, H.-D., K. M. Guinn, M. I. Harrel, R. Liao, M. I. Voskuil, M. Tompa, G. K. Schoolnik, and D. R. Sherman.** (2003). Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular Microbiology*; **48**:833–843.

**Pascopella, L. ; Collins, F.; Martin, J.; Lee, M. H.; Hatfull, G.; Stover, K.; Bloom, B. and Jacobs Jr, W.** (1994). Use of in vivo complementation in *Mycobacterium tuberculosis* to identify a genomic fragment associated with virulence. *Infection and Immunity*; **62** (4), 1313- 1319.

**Pellicic, V., J.-M. Reyrat, and B. Gicquel.** (1996). Generation of unmarked directed mutations in mycobacteria, using sucrose counter-selectable suicide vectors. *Molecular Microbiology*; **20**:919–925.

**Pellicic, V.; Jackson, M.; Reyrat, J.M.; Jacobs, W.R.Jr.; Gicquel, B. & Guilhot, C.** (1997). Efficient allelic exchange and transposon mutagenesis in *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*; **94**, 10955-10960.

**Pellicic, V.; Reyrat, J.M. & Gicquel, B.** (1996). Expression of the *Bacillus subtilis* sacB gene confers sucrose sensitivity on Mycobacteria. *Journal of Bacteriology*; **148** (4), 1197- 1199.

**Perez, E., Samper, S., Bordas, Y., Guilhot, C., Gicquel, B. and Martin, C.** (2001). An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Molecular Microbiology*; **41**(1):179-87.

**Pfaff, M. W.** (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*. **29** (9) 00, 2002- 2007.

**Plum, G. and Clark- Curtiss, J. E.** (1994). Induction of *Mycobacterium avium* gene expression following phagocytosis by human macrophages. *Infection and Immunity*, 62: 476-483.

**Poulet, S. & Cole, S. T.** (1995). Repeated DNA sequences in mycobacteria. *Arch Microbiol* 163, 79±86.

**Prakash, P.; Yellaboina, S.; Ranjan, A. and Hasnain, S. E.** (2005). Computational prediction and experimental verification of novel IdeR binding sites in the upstream sequences of *Mycobacterium tuberculosis* open reading frames. *Bioinformatics*, 21 (10), 2161-2166.

**Pym, A. S., Brodin, P., Majlessi, L., Brosch, R., Demangel, C., Williams, A., Griffiths, K. E., Marchal, G., Leclerc, C. & Cole, S. T.** (2003) Recombinant BCG exporting ESAT-6 confers enhanced protection against tuberculosis. *Nat. Med.* 9, 533–539.

**Ramos, J. L.; Martinez-Bueno, M.; Molina-Henares, A. J.; Tera´n, W.; Watanabe, K.; Zhang, X.; Gallegos, M. T.; Brennan, R. and Tobes, R.** (2005). The TetR Family of Transcriptional Repressors. *MICROBIOLOGY AND MOLECULAR BIOLOGY REVIEWS*, 69 (2) 326–356.

**Recchi, Ch.; Sclavi, B.; Rauzier, J.; Gicquel, B. and Reytrat, J. M.** (2003) *Mycobacterium tuberculosis* Rv1395 Is a Class III Transcriptional Regulator of the AraC Family Involved in Cytochrome P450 Regulation. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY* 278 (36), 33763–33773.

**Reytrat, J. M., F.-X. Berthet, and B. Gicquel.** (1995). The urease gene of *Mycobacterium tuberculosis* and its utilization for the demonstration of allelic exchange in *Mycobacterium bovis* BCG. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:8768–8772.

**Reytrat, J. M.; Lopez-Ramirez, G.; Ofredo, C.; Gicquel, B. and Winter, N.** (1996). Urease activity does not contribute dramatically to persistence of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guérin. *Infection and Immunity*; 64(9): 3934–3936.

**Rodriguez, G. M., Voskuil, M. I., Gold, B., Schoolnik, G. K. and I. Smith.** (2002). ideR, An essential gene in *Mycobacterium tuberculosis*: role of IdeR in iron-dependent

gene expression, iron metabolism, and oxidative stress response. *Infection and Immunity*; 70:3371–3381.

**Rousseau, C.; Sirakova, T.; Dubey, V.; Bordat, Y.; Kolattukudy, P.; Gicquel, B. and Jackson, M.** (2003). Virulence attenuation of two Mas-like polyketide synthase mutants of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*, 149, 1837–1847.

**Rubin, E.J., Akerley, B.J., Novik, V.N., Lampe, D.J., Husson, R.N., and Mekalanos, J.J.** (1999) *In vivo* transposition of mariner-based elements in enteric bacteria and mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**: 1645–1650.

**Sambrook, J.; Fritsch, E. F. and Maniatis, T.** (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2<sup>nd</sup> edition Cold Spring Harbor, N. Y.

**Santangelo MP, Goldstein J, Alito A, Gioffre A, Caimi K, Zabal O, Zumarraga M, Romano MI, Cataldi AA, Bigi F.**(2002). Negative transcriptional regulation of the *mce3* operon in *Mycobacterium tuberculosis*. *Microbiology*; 148:2997-3006.

**Sassetti C; Boyd, D and Rubin, E.** (2001). Comprehensive identification of conditionally essential genes in mycobacteria. *Proc Natl Acad Sci USA*.; **98**(22): 12712–12717.

**Sassetti, C. and Rubin, E.** (2003). Genetic requirements for mycobacterial survival during infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100** (22), 12989-12994.

**Sassetti, C.; Boyd, D.H. and Rubin, E.** (2003). Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Molecular Microbiology*; **48** (1), 77- 84.

**Schmitt, M. P., M. Predich, L. Doukhan, I. Smith, and R. K. Holmes.** (1995). Characterization of an iron-dependent regulatory protein (IdeR) of *Mycobacterium tuberculosis* as a functional homolog of the diphtheria toxin repressor (DtxR) from *Corynebacterium diphtheriae*. *Infection and Immunity*; **63**,4284– 4289.

**Shepard** (1957). Growth characteristics in HeLa cells of the rapidly growing acid fast bacteria, *Mycobacterium fortuitum*, *Mycobacterium phlei*, and *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of Bacteriology*; 73(6):722-6.

- Shimono, N.; Morici, L.; Casali, N.; Cantrell, S.; Sidders, B.; Ehrt, S and Riley, L. W.** (2003). Hypervirulent mutant of *Mycobacterium tuberculosis* resulting from disruption of the *mce1* operon. *PNAS*; **100** (26) 15918–15923
- Smith, I.** (2003). *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS* 16 (3), 463–496
- Sreevatsan, S. et al.** (1997). Restricted structural gene polymorphism in the *Mycobacterium tuberculosis* complex indicates evolutionarily recent global dissemination. *Proc. Natl Acad. Sci.; USA* **94**, 9869– 9874
- Stead, W. W., Eisenach, K. D., Cave, M. D., Beggs, M. L., Templeton, G. L., Thoen, C. O. & Bates, J. H.** (1995) *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* **151**, 1267–1268.
- Talaat, A.M.; Hunter, P. and Johnston, S.A.** (2000). Genome- directed primers for selective labeling of bacterial transcripts for DNA microarrays. *Nat. Biotechnol.* 18: 679- 682.
- Tekaia F, Gordon SV, Garnier T, Brosch R, Barrell BG, Cole ST.** (1999). Analysis of the proteome of *Mycobacterium tuberculosis* in silico. *Tuberculosis Lung Dis.* 1999;79(6):329-42.
- Timm, J.; Lim, E. M. And Gicquel, B.** (1994). *Escherichia Coli*- mycobacteria shuttle vectors for operon and gene fusion to *lacZ*: the pJEM series. *Journal of Bacteriology*; 176, 6749- 6753.
- Triccas JA, Parish T, Britton WJ, Gicquel B.** (1998). An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett.* 15;167(2):151-6.
- Ulmasov B, Capone J, Folk W.** Regulated expression of plant tRNA genes by the prokaryotic tet and lac repressors. *Plant Mol Biol.* 1997 Nov;35(4):417-24.
- van Soolingen, D.; Hermans, P. W. M.; de Haas, P. E. W.; Soll, D. R. and van Embden, J. D. A.** (1991). Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-

dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *Journal of Clinical Microbiology*; 29, 2578- 2586.

**Wiker HG, Michell SL, Hewinson RG, Spierings E, Nagai S, Harboe M.** (1999) Cloning, expression and significance of MPT53 for identification of secreted proteins of *Mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog.*; 26(4):207-19.

**Wiker HG, Spierings E, Kolkman MA, Ottenhoff TH, Harboe M.** (1999). The mammalian cell entry operon 1 (*mce1*) of *mycobacterium leprae* and *mycobacterium tuberculosis*. *Microb Pathog.*; 27(3):173-7.

**World Health Organization Global Tuberculosis Programme.** (2002). Fact Sheet No. 13: Tuberculosis. Geneva: World Health Organization.

**Yamaguchi, A., Udagawa, T. & Sawai, T.** (1990) Transport of divalent cations with tetracycline as mediated by the transposon Tn10-encoded tetracycline resistance protein. *J. Biol. Chem.*; 265, 4809–4813.

**Yellaboina, S.; Seshadri, J.; Kumar, M. S. and Ranjan, A.** (2004). PredictRegulon: a web server for the prediction of the regulatory protein binding sites and operons in prokaryote genomes. *Nucleic Acids Research*; **32**, 318-320.

**Yoshimura M, Asai K, Sadaie Y, Yoshikawa H.** (2004). Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology*;150(Pt 3):591-9.

**Yoshimura, M., K. Asai, Y. Sadaie, and H. Yoshikawa.** (2004). Interaction of *Bacillus subtilis* extracytoplasmic function (ECF) sigma factors with the N-terminal regions of their potential anti-sigma factors. *Microbiology*; **150**: 591–599.

**Yuan, Y., D. D. Crane, and C. E. Barry III.** (1996). Stationary phase associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial alpha-crystallin homolog. *J. Bacteriol.* **178**:4484–4492.

**Yuan, Y., D. D. Crane, R. M. Simpson, Y. Zhu, M. J. Hickey, D. R. Sherman, and C. E. Barry III.** (1998). The 16-kDa  $\alpha$ -crystallin (Acr) protein of *Mycobacterium*

*tuberculosis* is required for growth in macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **95**:9578–9583.

**Zahrt, T. C. and Deretic, V.** (2000). An Essential Two-Component Signal Transduction System in *Mycobacterium tuberculosis*. J Bacteriol. 182(13): 3832–3838.

**Zahrt, T. C., and V. Deretic.** (2001). *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 98:12706–12711.

**Zhang Y, Heym B, Allen B, Young D, Cole S.** (1992). The catalase-peroxidase gene and isoniazid resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Nature 358(6387):591-3.

**Zumárraga, M.; Bigi, F.; Alito, A.; Romano, M.I. & Cataldi, A.** (1999). A 12, 7 kb fragment of the *Mycobacterium tuberculosis* genome is not present in *Mycobacterium bovis*. Microbiology; **145**, 893- 897.