



UNIVERSIDAD CENTRAL DE  
VENEZUELA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**Implementación de un sistema de expresión condicional  
para el estudio de los genes *pknA* y *pknB* de  
*Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155.**

**TRABAJO ESPECIAL DE GRADO**

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la Bachiller Vanessa Elisa Vallar Grosso, como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

CARACAS, VENEZUELA

Febrero, 2012

## Resumen

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por una bacteria intracelular y patógena llamada *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), la cual provoca más de 1,7 millones de muertes al año a nivel mundial. Uno de los factores que ha contribuido a que la incidencia de la enfermedad se haya mantenido estable en el tiempo, es la selección de cepas resistentes a los fármacos empleados en el tratamiento, motivo por el cual existe la necesidad urgente de encontrar nuevos blancos terapéuticos. Uno de los candidatos más importantes son las Proteínas Serina/Treonina Quinasas (STPQs), que desempeñan un papel importante en distintos procesos involucrados tanto en la fisiología como en la virulencia de MTB y además, poseen una baja homología con las STPQs de humanos (menos del 30%).

En el genoma de *M. tuberculosis* se han identificado 11 genes que codifican para diferentes STPQs nombradas desde *pknA* hasta *pknL*, de las cuales, *pknA* y *pknB* se han reportado como genes esenciales para la supervivencia de la bacteria. Se tienen evidencias que sugieren que estas dos STPQs (PknA y PknB) participan con los procesos de división y crecimiento celular. Para el estudio de genes esenciales se han desarrollado sistemas de expresión condicional, que permiten controlar de manera selectiva, la expresión de genes de un organismo. En el presente trabajo se propuso como objetivo, implementar mediante la utilización de diversas herramientas de biología molecular, un sistema de expresión condicional, que permite la expresión del gen de interés sólo en ausencia de anhidrotetraciclina (ATc).

Se obtuvieron las cepas MS82 y MS83, electroporando en cepas de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 los plásmidos integrativos pFRA42A y pFRA42B, respectivamente. Al realizar la verificación del sistema sometiendo las cepas a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina, encontramos que la cepa MS83 es más eficiente en la represión del gen *lacZ* que la cepa MS82 a iguales concentraciones de ATc, en las cuales, a una concentración de 50 ng/mL, se observa la represión completa del gen *lacZ* por la diferencia en la orientación del gen *tetR*. Los plásmidos recombinantes suicidas de los genes *pknA* (pVknA37) y *pknB* (pVknB35), se obtuvieron diseñando cebadores que amplificaron por PCR un fragmento equivalente a los 2/3 de cada gen. Se realizaron los dos clonamientos (pFRA50 con el fragmento de *pknA* y pFRA50 con el fragmento de *pknB*) en células competentes de *E. coli*, obteniendo transformantes en ambos casos. Las colonias fueron verificadas por análisis de restricción, PCR y secuenciación.

Se realizaron tres ensayos con diferentes condiciones de electroporación para conseguir la cepa condicional, electroporando la cepa MS83 con los plásmidos recombinantes de cada gen, esto con la finalidad de aumentar la frecuencia de recombinación. Las condiciones utilizadas en el segundo ensayo (5 µg de ADN previamente desnaturalizado con álcali) permitieron obtener más transformantes resistentes a Higromicina, marcador de selección del plásmido recombinante. Todas las colonias obtenidas se sometieron a diferentes concentraciones de ATc (0, 50 y 200 ng/mL) para observar si alguna era la cepa condicional. Hasta el momento, ninguna de las colonias analizadas mostró el fenotipo esperado, sugiriendo que todas han sido producto de eventos de recombinación ilegítima. En este trabajo se lograron obtener los recombinantes que permitirán continuar los procesos de estandarización del sistema.

*A mis padres.*

## **Agradecimientos**

En primer lugar, a mis nonnos, que nos protegen a todos desde el cielo, guiándonos siempre por el mejor camino.

A mis padres bellos, que son el pilar de mi vida y mi ejemplo a seguir, a ustedes les debo TODO lo que soy hoy en día. Muchas gracias por todo el apoyo y la confianza que tienen depositada en mí. Gracias por cada uno de los consejos tanto en las buenos como en los malos momentos, esas palabras de aliento cuando sentía que no podía mas con algún problema y ayudarme a entender que la vida son etapas y que hoy culmina una logrando esta meta, solo ustedes saben lo difícil que en muchas ocasiones resultó. Gracias por demostrarme cada día lo afortunada que soy de tener los mejores padres de este mundo. Espero nunca defraudarlos. Los AMO.

A mi familia: Choya gracias por ser la mejor hermana del mundo. Te quiero mucho; tía Claudia eres la mejor del mundo, te admiro muchísimo; Nonnis te amo.

A mi amigo Roque, gracias por TODO, sin tu ayuda no se que habría sido de esta tesis. Muchas gracias por todo el tiempo dedicado explicándome cosas, esos consejos que siempre fueron tan útiles en todos los aspectos. Esas palabras de apoyo y comprensión que siempre me brindaste. En fin mi Roquito gracias por tu amistad. Te quiero muchísimo.

Profe Glenda, a usted le debo el estar culminando esta etapa de mi vida, muchas gracias por haberme aceptado en su laboratorio y haber invertido todo ese tiempo en enseñarme cuando yo no tenía nada de experiencia en este campo. Le doy las gracias porque aunque en los últimos meses siempre estaba demasiado ocupada siempre sacaba un huequito para mí. Gracias por la paciencia que siempre me tuvo. La quiero mucho.

Profe Guillermina, muchas gracias por el tiempo invertido en mí y esa preocupación que tuvo en todo momento de que todo saliera perfecto. La admiro demasiado.

Al Jefe del laboratorio, Howard Takiff (Mi Doc!!), muchísimas gracias por esa confianza que depositó en mí, espero no haberlo defraudado. Gracias por preocuparse y ayudarme cuando lo necesite. Aprendí muchisisisimo de usted, no tiene idea de cuánto le voy a estar agradecida toda mi vida. Lo quiero mucho mi doc.

Le doy las gracias a mis amigos: Mi gocho (Jesus) por siempre estar ahí y ser un amigo de verdad; Mi Protico, gracias por quererme y aconsejarme en todo momento; Yirsie, gracias por ser como eres y siempre estar pendiente de mí; Ana porque al entrenarme te convertiste en mi amiga, gracias por esos consejos sinceros que me dabas; Denisse gracias por todo el apoyo pero sobre todo por tu amistad; mi negro bello (Ale) gracias por ser mi amigo y por todas esas tardes que pasamos juntos. Te quierooo demasiadoooo; Mariangela, mi bruja gracias por tu amistad que valoro demasiado, por estar en los buenos y malos momentos siempre apoyándome y por supuesto a mi amiga Dani, aunque te fuiste a vivir lejos, te tengo siempre presente, gracias por TODO. Los AMO a todos y siempre agradeceré a Dios por ponerlos en mi camino pero sobre todo que sean mis amigos.

A Luis, te agradezco el apoyo y la ayuda que me diste en todo momento. Gracias por esos momentos maravillosos en donde solamente existíamos nosotros dos. TE AMO.

A mis compañeros de laboratorio a quienes admiro demasiado y me permitieron compartir con ellos momentos inolvidables, que hacían olvidar cualquier inconveniente. Gracias por su confianza, de ustedes aprendí mucho. Son personas maravillosas: Luisito, Lizeth, Luis, Andre, Claudia, Carlos, Wendy, Maizo. Los quierooooo.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC) por ser la casa en donde fue posible la realización de esta tesis.

En fin, le agradezco a la vida, por todas las personas especiales, por mi familia y amigos (disculpen si olvide alguno), los cuales hacen que mi vida sea maravillosa.

## **Índice General.**

<b><u>Resumen</u></b> .....	<b>2</b>
<b><u>Agradecimientos</u></b> .....	<b>4</b>
<b><u>Índice de Figuras</u></b> .....	<b>12</b>
<b><u>Índice de Tablas</u></b> .....	<b>16</b>
<b><u>Abreviaturas</u></b> .....	<b>18</b>
<b><u>1. Introducción</u></b> .....	<b>21</b>
1.1.- Envoltura celular de las micobacterias.....	21
1.2.- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	23
1.2.1.- <i>Mycobacterium tuberculosis</i> (MTB) agente causal de la tuberculosis.....	24
1.2.2.- Tratamiento actual de la tuberculosis.....	26
1.2.3.- Limitaciones del esquema terapéutico actual contra la tuberculosis.....	27
1.2.4.- Búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.....	28
1.2.5 Transducción de señales.....	29
1.2.6.- Proteínas Serina/Treonina Quinasas (STPQs) en <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	32
1.2.7.- Sistemas de expresión condicional.....	34

<b><u>2.- Antecedentes</u></b> .....	<b>37</b>
<b><u>3.- Justificación</u></b> .....	<b>46</b>
<b><u>4.- Objetivos</u></b> .....	<b>48</b>
<b><u>5.- Materiales y Métodos</u></b> .....	<b>49</b>
<b>5.1.- Materiales</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1.1.- Cepas bacterianas y plásmidos</b> .....	<b>49</b>
<b>5.1.2.- Reactivos</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1.3.- Medios y condiciones para el cultivo bacteriano</b> .....	<b>50</b>
<b>5.1.4.- Antibióticos</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1.5.- Enzimas</b> .....	<b>51</b>
<b>5.1.6.- Estuches comerciales</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.- Técnicas básicas de biología molecular empleadas</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc<sup>2</sup>155</b> .....	<b>52</b>
<b>5.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> por el método de lisis alcalina con cloruro de litio</b> .....	<b>53</b>
<b>5.2.3.- Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala (<i>Boiling-miniprep</i>)</b> .....	<b>54</b>



5.2.4.- Electroforesis en geles de agarosa.....	55
5.2.5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	56
5.2.6.- Digestión con enzimas de restricción.....	58
5.2.7.- Reacciones de ligamiento.....	58
5.2.8.- Preparación de células competentes con Cloruro de Calcio (CaCl <sub>2</sub> ).....	59
5.2.9.- Transformación en <i>E. coli</i> XL1-blue mediante choque térmico.....	59
5.2.10.- Preparación de células electrocompetentes de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	60
5.2.11.- Electroporación en <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	60
5.2.12.- Secuenciación.....	61
5.2.13.- Análisis de secuencia y uso de herramientas de bioinformática.....	61
5.2.14.- Ensayo con diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).....	62
5.2.15.- Ensayos de electroporación para la obtención de las cepas condicionales mediante la recombinación homóloga.....	62
5.2.16.- Tratamiento al ADN por desnaturalización con álcali para favorecer el proceso de recombinación homóloga.....	63
6.- <u>Resultados</u> .....	65

6.1.- Aislamiento de ADN genómico de <i>Mycobacterium smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	65
6.2.- Obtención por PCR de los 2/3 de <i>pknA</i> o <i>pknB</i> .....	66
6.3.- Aislamiento de ADN plasmídico de los vectores pFRA42A, pFRA42B y pFRA50.....	69
6.4.- Obtención de la cepa de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 transformada con los vectores pFRA42A y pFRA42B.....	70
6.5.- Evaluación de las cepas MS82 y MS83 a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).....	72
6.6.- Digestión de los productos de PCR de los genes <i>pknA</i> o <i>pknB</i> .....	74
6.7.- Digestión del vector suicida pFRA50.....	77
6.8.- Clonamiento de los productos de PCR de <i>pknA</i> o <i>pknB</i> en el vector suicida pFRA50.....	77
6.9.- Transformación del clonamiento de <i>pknA</i> o <i>pknB</i> en la cepa <i>E. coli</i> XL1-blue.....	78
6.10.- Aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de pFRA50 con el fragmento de <i>pknA</i> y las transformantes de pFRA50 con el fragmento de <i>pknB</i> .....	80
6.11.- Selección de las posibles colonias recombinantes.....	81
6.12.- Verificación de los plásmidos recombinantes.....	84

<b>6.13.- Electroporación de los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35 en la cepa MS83.....</b>	<b>86</b>
<b>6.14.- Evaluación de las transformantes de MS83 con los plásmidos recombinantes a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).....</b>	<b>89</b>
<b><u>7.- Discusión de resultados</u>.....</b>	<b>96</b>
<b><u>8.- Conclusiones</u>.....</b>	<b>108</b>
<b><u>9.- Referencias bibliográficas</u>.....</b>	<b>109</b>

## Índice de Figuras

<b>Figura 1.</b> Representación esquemática de la disposición de los elementos de la envoltura celular de las micobacterias.....	<b>22</b>
<b>Figura 2.</b> Análisis estructural de las STPQs de <i>Mycobacterium tuberculosis</i> .....	<b>32</b>
<b>Figura 3.</b> Mapa esquemático describiendo la localización cromosómica de <i>pknA</i> y <i>pknB</i> .....	<b>37</b>
<b>Figura 4.</b> Representación esquemática de la conformación de los vectores integrativos pFRA42A y pFRA42B.....	<b>42</b>
<b>Figura 5.</b> Representación esquemática de las cepas transformadas con pFRA42A ó pFRA42B en presencia de ATc.....	<b>43</b>
<b>Figura 6.</b> Componentes de pFRA50 y proceso de recombinación homóloga entre el plásmido recombinante y el genoma de <i>M. smegmatis</i> .....	<b>44</b>
<b>Figura 7.</b> Representación del sistema de expresión condicional utilizando dos represores transcripcionales (TetR y Pip) en presencia del inductor anhidrotetraciclina (ATc).....	<b>45</b>
<b>Figura 8.</b> Marcador de peso molecular 1 Kb Ladder de la casa comercial Fermentas Life Sciences.....	<b>56</b>
<b>Figura 9.</b> Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del aislamiento de ADN genómico de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	<b>65</b>

**Figura 10.** Representación esquemática de los productos de PCR para cada juego de cebadores. (A) Representación esquemática del vector pFRA50.....67

**Figura 11.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de las reacciones de PCR para amplificar un fragmento de los genes *pknA* o *pknB* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.....68

**Figura 12.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del aislamiento de ADN plasmídico de los vectores pFRA42A, pFRA42B y pFRA50.....69

**Figura 13.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de la digestión realizada al ADN plasmídico del vector suicida pFRA50 con la enzima *Nsi*.....70

**Figura 14.** Fotografía de las placas obtenidas después de la transformación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con los vectores pFRA42A o pFRA42B.....72

**Figura 15.** Fotografía del ensayo a diferentes concentraciones de ATc (0, 10 o 50 ng/mL) realizado a las cepas MS82 y MS83.....73

**Figura 16.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del control de digestión y ligación del fragmento de *pknB*.....75

**Figura 17.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los controles para verificar digestión y ligamiento de los productos de PCR de los genes *pknA* o *pknB* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.....76

**Figura 18.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de las digestiones realizadas al vector suicida pFRA50.....77

**Figura 19.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los controles del clonamiento de *pknA* en pFRA50 y del clonamiento de *pknB* en pFRA50.....78

**Figura 20.** Fotografías de las placas obtenidas después de la transformaciones de clonamiento del vector pFRA50 con el fragmento de *pknA* y el vector pFRA50 con el fragmento de *pknB* en células competentes de *E. coli* XL1-blue.....80

**Figura 21.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de *pknA* en pFRA50 y de las transformantes de *pknB* en pFRA50.....81

**Figura 22.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% del ensayo de restricción realizado al ADN de las colonias transformantes de *pknA* o *pknB*.....83

**Figura 23.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% del ensayo de restricción realizado al ADN de los plásmidos recombinantes de *pknA* o *pknB*.....84

**Figura 24.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comprobar la obtención de los plásmidos recombinantes de *pknA* y *pknB*.....85

**Figura 25.** Fotografía de las placas obtenidas de los ensayos de electroporación de MS83 con los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35.....**88**

**Figura 26.** Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*.....**91**

**Figura 27.** Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*.....**93**

**Figura 28.** Tercer ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*.....**95**

**Figura 29.** Representación esquemática de la posición de los cebadores a diseñar.....**107**

## Índice de Tablas

<b>Tabla I.</b> Características de los plásmidos del sistema de expresión condicional.....	<b>41</b>
<b>Tabla II.</b> Genotipos de las cepas bacterianas y determinantes de resistencia de los plásmidos utilizados.....	<b>49</b>
<b>Tabla III.</b> Componentes de los medios de cultivo utilizados.....	<b>50</b>
<b>Tabla IV.</b> Concentraciones de antibióticos utilizadas para <i>E. coli</i> XL1-blue y <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	<b>51</b>
<b>Tabla V.</b> Cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.....	<b>57</b>
<b>Tabla VI.</b> Fenotipos obtenidos después de la electroporación de los vectores pFRA42A o pFRA42B en las cepas de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155.....	<b>71</b>
<b>Tabla VII.</b> Apreciación cualitativa de la intensidad del color azul en las cepas MS82 y MS83 al realizarle el ensayo de anhidrotetraciclina (ATc).....	<b>74</b>
<b>Tabla VIII.</b> Resultados de los controles de la transformación de los clonamientos de <i>pknA</i> o <i>pknB</i> en las cepas competentes de <i>E. coli</i> XL1-blue.....	<b>79</b>
<b>Tabla IX.</b> Ensayo de restricción de los plásmidos recombinantes de <i>pknA</i> o <i>pknB</i> .....	<b>82</b>
<b>Tabla X.</b> Fenotipos obtenidos después de la electroporación de los plásmidos recombinantes pVknA37 o pVknB35 en las cepas MS83 para los tres ensayos.....	<b>87</b>



**Tabla XI.** Número de transformantes obtenidas en cada ensayo de electroporación para cada plásmido transformado.....**89**

**Tabla XII.** Colonias escogidas de cada ensayo de electroporación que fueron sometidas a un segundo ensayo de ATc.....**92**

**Tabla XIII.** Colonias escogidas de cada ensayo de electroporación que fueron sometidas a un tercer ensayo de ATc.....**94**

## Abreviaturas

<b>ADN</b>	Ácido desoxiribonucléico
<b>ATc</b>	Anhidrotetraciclina
<b>BCG</b>	Bacilo de Calmette-Guérin
<b>BrEt</b>	Bromuro de Etidio
<b>BSA</b>	Suero de albúmina bovina
<b>CTAB</b>	Bromuro de hexadecil-trimetil amonio
<b>C-terminal</b>	Carboxilo-terminal
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>dNTPs</b>	Desoxiribonucleótidos trifosfato
<b>D.O</b>	Densidad óptica
<b><i>E. coli</i></b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EDTA</b>	Etilen-diamino-tetracetato-disóxido
<b>EMB</b>	Etambutol
<b>Hig</b>	Higromicina
<b>HQ</b>	Histidina Quinasa
<b>INH</b>	Isoniacida

<b>LB</b>	Luria Bertani
<b>MDR-TB</b>	Cepa de <i>M. tuberculosis</i> resistente a múltiples drogas
<b>MTB</b>	<i>Mycobacterium tuberculosis</i>
<b>N-terminal</b>	Amino-terminal
<b>NCBI</b>	National Center for Biotechnology Information
<b>OMS</b>	Organización Mundial de la Salud
<b>PASTA</b>	Dominios de Asociación de las Proteínas Serina/Treonina Quinasas a las Proteínas de unión a la penicilina
<b>pb</b>	Pares de bases
<b>PBP</b>	Proteína de unión a la penicilina
<b>Pip</b>	Represor de Pristinamicina
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>PZA</b>	Pirazinamida
<b>RIF</b>	Rifampicina
<b>RNasa</b>	Ribonucleasa
<b>RR</b>	Reguladora de respuesta
<b>SDS</b>	Dodecilsulfato de sodio
<b>Ser</b>	Serina

<b>STPQs</b>	Proteínas Serina/Treonina Quinasas
<b>Str</b>	Estreptomicina
<b>Str<sup>R</sup></b>	Resistente a Estreptomicina
<b>TAES</b>	Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado
<b>TB</b>	Tuberculosis
<b>TE</b>	Tris-EDTA
<b>Thr</b>	Treonina
<b>Tet</b>	Tetraciclina
<b>teto</b>	Operadores dependientes del represor de TetR
<b>TetR</b>	Represor de Tetraciclina
<b>Tm</b>	Temperatura de desnaturalización
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>VIH</b>	Virus de Inmunodeficiencia Humana
<b>XDR-TB</b>	Cepa de <i>M. tuberculosis</i> extremadamente resistente
<b>X-gal</b>	5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranósido

## **1.- Introducción**

Las micobacterias pertenecen taxonómicamente al género *Mycobacterium*, el único de la Familia *Mycobacteriaceae*, del Orden *Actinomycetales*. Este género incluye varias especies, muchas de las cuales son causantes de enfermedades en humanos. Entre estas, *Mycobacterium tuberculosis* es causante de la tuberculosis que afecta aproximadamente a dos tercios de la población mundial y *Mycobacterium leprae*, que es el agente causal de la lepra (Gangadharan, 1996).

Las principales características que distinguen a los miembros de este género son su velocidad de crecimiento y su compleja envoltura celular. De acuerdo a su tasa de crecimiento, las micobacterias se clasifican en especies de crecimiento rápido, que tienen un tiempo de generación de 2 a 3 horas y forman una colonia de 3 a 4 días, como por ejemplo *M. smegmatis*, *M. aurum* y *M. fortuitum*, mientras que, las de crecimiento lento se duplican cada 10-20 horas y dan lugar a una colonia después de 14-28 días, en este grupo están: *M. tuberculosis*, *M. bovis* y *M. avium* (Gangadharan, 1996).

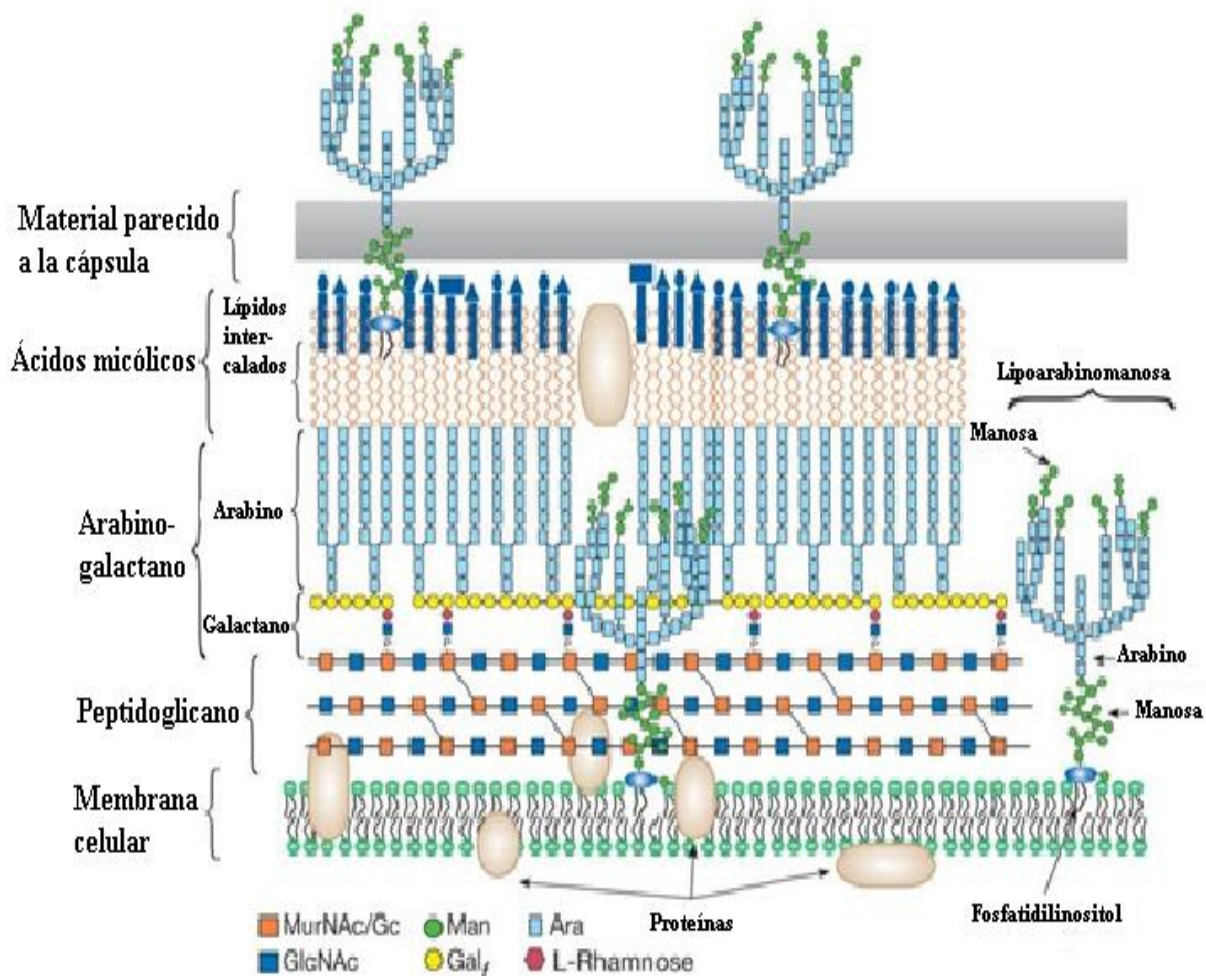
La complejidad de su envoltura celular, las distingue de otras bacterias debido a que le confiere la propiedad de ácido alcohol resistencia, así como la resistencia intrínseca a cambios en el exterior (Brennan y Nikaido, 1995).

### **1.1.- Envoltura celular de las micobacterias.**

Debido a su compleja envoltura celular, las micobacterias son consideradas patógenos problemáticos. Presentan una estructura inusual en su pared celular la cual le confiere baja permeabilidad, haciéndolas naturalmente resistentes a diversos antibióticos o a otros agentes

quimioterapéuticos, a pH alcalino, desecación y a muchos desinfectantes químicos (Brennan y Nikaido, 1995).

La envoltura celular está conformada por tres capas, la más interna está constituida por la membrana plasmática, seguida de la pared celular, que consiste en una red amplia de carbohidratos y lípidos unidos de forma covalente y no covalente; y por último, la capa más externa llamada cápsula, constituida por polisacáridos, proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Figura 1) (Daffé y Drapper, 1998; Puech y col., 2002; Rezwan y col., 2007).



**Figura 1.** Representación esquemática de la disposición de los elementos de la envoltura celular de las micobacterias. Tomado y modificado de <http://egamor.blogspot.com/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html> [Consulta: 2 de Marzo de 2011].

La membrana celular presenta las mismas características descritas por el modelo de mosaico fluido, con la diferencia que los fosfolípidos están altamente glicosilados, una característica común en los actinomicetes (Barry y col., 2007).

La pared celular de las micobacterias se localiza por debajo de la cápsula separada por el espacio periplasmático, y posee un elevado contenido lipídico (50-60%). Está compuesta por el peptidoglicano (formado por moléculas de N- Acetilglucosamina y N-glucorilmurámico con cadenas cortas de alanina) unidos covalentemente a cadenas laterales de polisacáridos esterificados en sus extremos distales con ácidos micólicos, lo que constituye un complejo macromolecular formado por ácidos micólicos-arabinogalactanos-peptidoglicanos (Brennan y Nikaido, 1995; Chatterjee, 1997). Esta capa es el esqueleto de la bacteria que le da forma y rigidez, también le aporta propiedades como: hidrofobicidad, resistencia a la desecación, desinfección química y a la acción de ácidos y álcalis. Además, es la base para su observación bajo el microscopio, pues se utilizan técnicas especiales de coloración para su estudio como la tinción Ziehl Neelsen (Zinsser, 1999).

Por último, en su parte más externa se encuentra la cápsula, la cual está constituida por polisacáridos (principalmente glicanos y arabinomananos), proteínas y una pequeña cantidad de lípidos (Stokes y col., 2004; Rezwan y col., 2007).

### **1.2.- *Mycobacterium tuberculosis*.**

*Mycobacterium tuberculosis* (MTB) es un bacilo delgado, de forma recta o ligeramente curva, cuyo tamaño varía entre 0,2-0,6x 1-10  $\mu\text{m}$  (Forbes y col., 1998). Es estrictamente aeróbico, inmóvil e incapaz de formar esporas o conidias (Rossman y Milton, 1996; Zinsser, 1999).

Es un organismo de crecimiento lento con un tiempo de generación cercano a las 24 horas, bien sea en medios de cultivos o en los tejidos que infecta (Forbes y col., 1998). Es un patógeno intracelular, que sobrevive en estado de latencia durante largo tiempo dentro del citoplasma de los macrófagos (Cole y col., 1998).

### **1.2.1.- *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) agente causal de la tuberculosis.**

Robert Koch en 1882, identificó el patógeno intracelular *M. tuberculosis* como el agente etiológico de la tuberculosis. Ésta es una enfermedad infectocontagiosa muy antigua, que se ha reconocido en los huesos de momias egipcias (Zinsser, 1999) y sigue siendo una de las enfermedades que causa más muertes a nivel mundial, calculando en el 2008, cerca de 1,7 millones de muertes (OMS, 2010).

La tuberculosis (TB) es un verdadero problema de salud mundial, ya que produce alrededor de 8 millones de casos nuevos al año (Pieters, 2001). El número de casos nuevos obedece a diversas causas, en primer lugar se estima que un tercio de la población mundial está infectada y esta población sirve como fuente de casos al reactivarse la enfermedad (Fernando y Britton, 2006). En segundo lugar, la asociación de la enfermedad con poblaciones con bajas condiciones socioeconómicas, colocan a los países en vías de desarrollo como los principales representantes de los casos de tuberculosis. Por último, la infección por VIH es el factor de riesgo más importante para el desarrollo de la tuberculosis (Organización Panamericana de la Salud, 2006).

La transmisión de esta enfermedad ocurre de persona a persona, cuando un individuo infectado tose o estornuda y estas gotas son inhaladas por una persona sana. En ese momento, la bacteria entra al sistema respiratorio y los bacilos son ingeridos por los



macrófagos alveolares en el pulmón. El proceso anterior induce una respuesta local pro-inflamatoria, que provoca el reclutamiento de monocitos desde la sangre hasta el sitio de la infección (Russel, 2001). Posteriormente, la infección se desarrolla al multiplicarse el bacilo tuberculoso en los pulmones, luego migran hacia los ganglios linfáticos hiliares, los cuales se inflaman y aumentan de tamaño produciendo una adenopatía hilar, el cual recibe el nombre de complejo primario (Bloom, 1994).

La respuesta inmunitaria se establece después de 4 a 6 semanas desde la infección primaria, donde los linfocitos T son la pieza clave y la interacción de éstos con los macrófagos infectados es crucial para poder controlar la infección. La interacción entre el bacilo y las células presentadoras de antígeno ocurre por medio de receptores tipo Toll (Means y col., 1999), es decir, receptores de complemento (CR1, CR3 y CR4) los cuales son muy importantes en la inmunidad innata. A continuación, se activan los macrófagos, induciendo la producción de citoquinas inflamatorias (IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$  y TNF- $\beta$ ) cuyas señales van a ejercer un potente efecto inmunoregulador que media muchas de las manifestaciones clínicas de la tuberculosis como son fiebre y hiperglobulinemia (Bloom, 1994). Estas citoquinas, son producidas con la finalidad de atraer al pulmón otras células del sistema inmune como son: monocitos, linfocitos y células dendríticas. Estas células captan a las micobacterias y migran hacia los ganglios regionales, en donde, presentan antígenos micobacterianos a los linfocitos CD4+ y CD8+ y comienza el proceso de activación de estas células. Una vez activados, migran hacia el sitio de la infección en el pulmón y producen Interferon  $\gamma$  (INF- $\gamma$ ). Y se produce el Granuloma que es una lesión característica de la tuberculosis (Tufariello y col., 2003). Está formado por linfocitos, macrófagos, fibroblastos, células dendríticas y células de estroma pulmonar (Zhart, 2003).

Este es el primer mecanismo del hospedador para controlar al bacilo, limitando su crecimiento y diseminación, ya que, funciona como barrera entre la bacteria y el pulmón, además que constituye un microambiente ideal para la interacción entre los linfocitos y los macrófagos (Tufariello y col., 2003; Chen y Moller, 2007). Dentro del granuloma los bacilos vivos permanecen activos por largos períodos, donde solo una excesiva replicación de los mismos eliminaría la estructura del granuloma, produciendo una necrosis y se reactivaría la enfermedad, lo cual dependerá de la eficiencia del sistema inmune (Tufariello y col., 2003).

Es importante destacar que entre el grupo de personas que llegan a ser infectadas, aproximadamente el 90% aproximadamente no desarrolla la enfermedad, siendo capaces de acabar con la infección completamente o mantenerla a un nivel incapaz de causar manifestaciones clínicas. En este segundo caso, la infección se mantiene latente y es capaz de reactivarse (cerca de un 5% de los casos) y causar la enfermedad (North y Jung, 2004).

### **1.2.2.- Tratamiento actual de la tuberculosis.**

El tratamiento actual contra la TB fue establecido a nivel mundial en el año 1990 y es un programa que lleva por nombre TAES (*Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado*) (Zhang, 2005).

TAES es una terapia anti-tuberculosa que tiene una duración de seis meses y consiste en una fase inicial de tratamiento donde la mayoría de los bacilos son eliminados y los síntomas de la enfermedad desaparecen. Se administran durante cuatro meses, cuatro drogas de primera línea como lo son: Isoniacida (INH), Pirazinamida (PZA), Rifampicina (RIF) y Estreptomina (Str) o Etambutol (EMB). La aplicación de Str o EMB dependerá de la edad del paciente. En la segunda fase, conocida como fase esterilizante, es donde se eliminan las

bacterias persistentes y se previenen las recaídas, se administra INH y RIF durante otros dos meses. Este programa tiene una efectividad del 95%, aproximadamente. Sin embargo, no es tan eficiente cuando el paciente está infectado con una cepa de MTB resistente a múltiples drogas (MDR-TB), donde la tasa de cura es apenas el 50%. En este caso se emplean las drogas de segunda línea; este tratamiento se llama TAES – Plus y se extiende a 24 meses, lo que aumenta los costos y la toxicidad para el paciente (Zhang, 2005).

Las drogas antituberculosas, pueden clasificarse de acuerdo a la prescripción, en drogas de primera línea o de segunda línea. Las drogas de primera línea son aquellas que por ofrecer mayor efectividad en el tratamiento con el menor número de efectos secundarios en comparación con otras, son la primera opción en casi cualquier forma de la enfermedad (Coll, 2003; Zhang, 2005). Se incluyen a la Str, EMB, INH, RIF y PZA. Son las más recomendadas gracias a su actividad bactericida y por su acción esterilizante (Kasper y col., 2005). Las drogas de segunda línea, incluyen medicamentos cuyo rango de efectividad es menor y son aún más tóxicas que las primeras. Las principales son etionamida, protionamida, morfozinamida, cicloserina, kanamicina, capreomicina y ácido para-amino-salicílico, así como las quinolonas ofloxacina, levofloxacina y moxifloxacina (Coll, 2003).

Existen varios problemas para el tratamiento de la TB como, la selección de cepas resistentes a las drogas empleadas en el esquema terapéutico y la escasa disponibilidad de otras drogas efectivas para utilizarse en el tratamiento de la TB.

### **1.2.3.- Limitaciones del esquema terapéutico actual contra la tuberculosis.**

La situación actual de la tuberculosis a nivel mundial (alta mortalidad y morbilidad y un aumento en los casos VIH positivos) refleja que las estrategias utilizadas para su control no

están siendo efectivas, debido a la selección de cepas resistentes que impiden la erradicación de la TB (Chopra y col., 2003). En el caso particular de Venezuela, la OMS estimó una incidencia de 41 casos por cada 100.000 habitantes (OMS, 2010)

La infección con una cepa de *M. tuberculosis* resistente a las drogas comúnmente usadas como INH y RIF, se define como resistencia a múltiples drogas (MDR) (Basu, 2007; Janin, 2007). Adicionalmente, existen las cepas extremadamente resistentes (XDR), que además de ser resistentes a INH y RIF, son resistentes a fluoroquinolonas y, al menos a una de las drogas inyectables como la Kanamicina (Ginsberg y Spigelman, 2007).

La principal causa de la selección de estas cepas de TB es la dificultad de acatamiento al tratamiento, ya sea, con drogas de primera o segunda línea, debido a que para los pacientes es difícil el cumplimiento de un esquema tan largo, llevando al abandono del mismo (Chopra y col., 2003).

La incidencia de la tuberculosis MDR y XDR, representa un problema debido a que no se cuenta con una amplia gama de drogas para un tratamiento efectivo, lo que conlleva a la necesidad de identificar nuevos blancos terapéuticos para la introducción de nuevos fármacos que contribuyan al control de la enfermedad.

#### **1.2.4.- Búsqueda de nuevos blancos terapéuticos.**

Por lo descrito anteriormente, la urgencia de encontrar blancos de nuevas drogas para el control de la TB es cada día mayor. Sin embargo, la búsqueda de nuevos blancos es el paso más difícil para el desarrollo de un nuevo fármaco (Terstappen y Reggiani, 2001). Esto es debido a que el blanco estudiado tiene que cumplir con una serie de aspectos para ser considerado un buen candidato. Los aspectos más importantes que debe cumplir un buen

blanco terapéutico son: 1) No debe existir homología significativa entre el blanco y los factores del hospedador. Esto con la finalidad de evitar la toxicidad de la droga en el humano (Sanseau, 2001); 2) Debe ser de carácter esencial para la supervivencia y crecimiento del patógeno (Wang y col., 2004) y 3) El blanco ideal propuesto debe tener actividad en los diferentes estados metabólicos del patógeno para que la droga pueda actuar en varias etapas de la enfermedad (Chopra y col., 2003). Los estudios iniciales abren paso a una serie de estudios preclínicos y finalmente su aparición en el mercado, todo lo cual puede llevar hasta 10 años (Humer, 2005; Hasan y col., 2006).

En la elección de los posibles blancos para *M. tuberculosis* se determinó que los genes que cumplen estos requerimientos son los involucrados en el estado de persistencia y latencia, en la síntesis de la pared celular, factores de virulencia, factores de transcripción y por último, los genes involucrados en la transducción de señales (Hasan y col., 2006).

#### **1.2.5.- Transducción de señales.**

La adaptación de las células a cambios ambientales ocurre por medio de un mecanismo esencial llamado transducción de señales. La actividad celular está constantemente afectada por muchos factores externos e internos, por lo cual requiere de mecanismos para percibir dichos cambios adecuadamente y generar respuestas apropiadas (Parkinson y Kofoid, 1992). Por lo tanto, la adaptación al medio externo es consecuencia de la transmisión de señales al interior celular, lo cual produce cambios en la fisiología. Estos cambios son primordiales no sólo para la supervivencia de los organismos en un ambiente exterior cambiante, sino también para la organización de acciones durante un proceso biológico (Av Gay y Everett, 2000).

La fosforilación y desfosforilación reversible de proteínas es un mecanismo clave por el cual las señales externas son transmitidas al interior celular. Se ha determinado que causan cambios en la expresión genética tanto en células eucariotas como procariontas (Kang y col., 2005).

El sistema de transducción de señales bacteriano más simple está constituido primordialmente por un sistema regulatorio de dos componentes: 1. Una histidina quinasa (HQ) como molécula detectora de la señal. Esta proteína se encuentra ubicada en la membrana citoplasmática y detecta cambios en los parámetros ambientales; 2. Una proteína citoplasmática conocida como “reguladora de respuesta” (RR), que dirige los cambios en la expresión genética en respuesta a las señales detectadas por la HQ (Parkinson y Kofoid, 1992; Wehenkel y col., 2008).

Generalmente, los sistemas de dos componentes solo representan el 1-2% del genoma de las bacterias. En *Mycobacterium tuberculosis* están descritos once sistemas completos de dos componentes que en su mayoría contribuyen a la virulencia, pero solo *mtrA - mtrB*, fueron reportados como esenciales para el crecimiento (Pérez y col., 2001; Zahrt y Deretic, 2001; Parish y col., 2003; Rickman y col., 2004; Wehenkel y col., 2008).

En eucariotas, la transducción de señales es llevada a cabo a través de cascadas de fosforilación de proteínas en residuos de Serina, Treonina o Tirosina, proceso catalizado por proteínas quinasas (Zhang y col., 1996) y revertido por proteínas fosfatasaes específicas (Av Gay y Everett, 2000).

Se creía que las proteínas Serina, Treonina y Tirosina quinasas se encontraban exclusivamente a las células eucariotas. Sin embargo, no es hasta la década de 1970, cuando

mediante un análisis bioquímico, se identificó en procariotas la fosforilación en estos residuos (Cozzone, 1988). Luego, mediante un estudio molecular, se identificaron proteínas quinasas similares a las eucariotas en la bacteria *Myxococcus xanthus* (Muñoz-Dorado y col., 1991). Desde entonces, se han encontrado varios genes que codifican para estas proteínas quinasas en diversas especies bacterianas, lo que demuestra que la presencia de estas proteínas tipo eucariotas es muy común en bacterias (Han y Zhang, 2001).

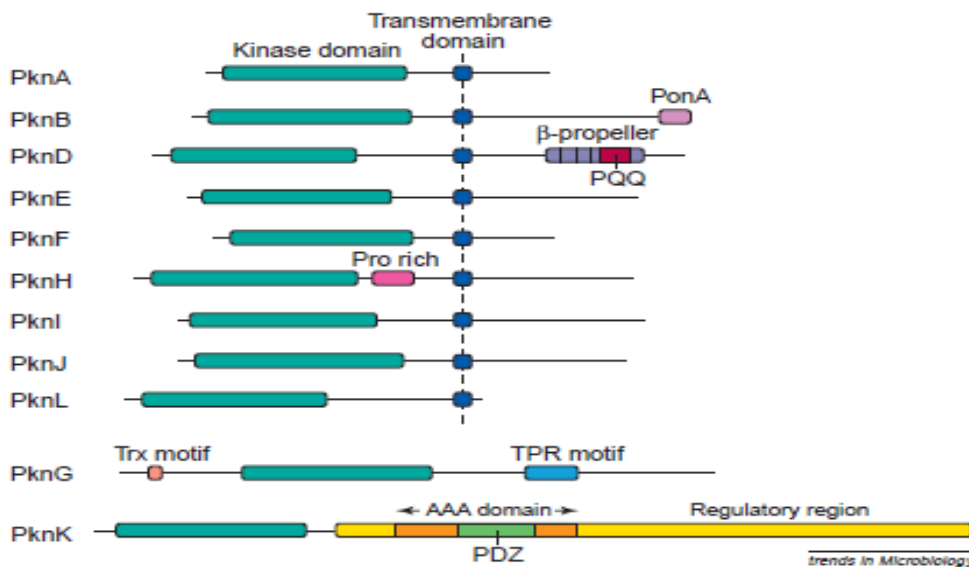
Ciertas razones sustentan la presencia de este sistema en bacterias y una de estas es que la transferencia de grupos fosfatos a residuos de Serina/Treonina/Tirosina es mucho más estable y producen señales de mayor duración que la transferencia en residuos de Histidina y Aspartato que se encuentran en los sistema de dos componentes (Sickmann y Meyer, 2001; Greenstein y col., 2005). En particular, el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* tiene igualdad de genes (once) que codifican para proteínas Serina/Treonina quinasas como para Sistemas de dos componentes (Cole y col., 1998; Fontan y col., 2004), lo que sugiere, que las STPQs representan la principal vía por la que se produce la señalización intracelular en este microorganismo (Cole y col., 1998; Umeyana y col., 2002; Fontan y col., 2004; Av Gay y Deretic, 2005).

Las STPQs regulan varias funciones celulares en las bacterias como: respuesta al estrés, formación de biopelículas, esporulación, regulación de procesos metabólicos y fisiológicos como crecimiento celular, división celular y diferenciación (Madec y col., 2002; Neu y col., 2002; Umeyama y col., 2002; Hussain y col., 2006; Saskova y col., 2006; Kristich y col., 2007; Thakur y col., 2008). Sin embargo, las STPQs también juegan un papel importante en la virulencia de algunas bacterias patógenas como lo son: *Yersinia pseudotuberculosis*,

*Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa* (Galyov y col., 1994; Wang y col., 1998; Rajagopal y col., 2003; Curry y col., 2005; Jin y Pancholi, 2006).

### 1.2.6.- Proteínas Serina/Treonina Quinasas (STPQs) en *Mycobacterium tuberculosis*.

*Mycobacterium tuberculosis* posee 11 genes que codifican para STPQs tipo eucariotas, denominadas *pknA* hasta *pknL* (Figura 2), una fosfo-Ser/Thr fosfatasa (*pstP*) y dos tirosina fosfatasas (PtpA, PtpB) (Cole y col., 1998; Boitel y col., 2003; Fernandez y col., 2004).



**Figura 2.** Análisis estructural de las STPQs de *Mycobacterium tuberculosis*. Tomado de Av Gay y Everett, 2000.

Del análisis estructural se puede mencionar que dos proteínas son solubles (PknG y PknK), mientras que nueve STPQs están ancladas en la membrana (Av Gay y Everett, 2000), debido a que poseen un dominio transmembrana que sirve de unión entre el dominio C-terminal (extracelular), que se cree sirve de detector de la señal y el dominio N-terminal (intracelular), donde reside la actividad de la proteína (Av Gay y Everett, 2000; Young y col., 2003; Wehenkel y col., 2008; Thakur y col., 2008).



Hanks y colaboradores en el año 1988, reportan que la secuencia que identifica el dominio quinasa (N-terminal) de las STPQs es intracelular e incluye 12 motivos conservados que son característica definitoria de las STPQs, pues está presente en todas ellas. Este rasgo fue utilizado como criterio para su anotación durante el proyecto de secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* (Hanks y col., 1988; Av Gay y Everett, 2000).

Wehenkel y colaboradores en el año 2008, realizaron un análisis de secuencia comparativo entre las STPQs de micobacterias con otras bacterias y encontraron por homología que estas pueden ser clasificadas en cuatro grupos: 1. PknA/PknB/PknL; 2. PknJ/PknF/PknI; 3. PknH/PknE/PknD y 4. Las proteínas solubles PknG y PknK, las cuales mostraron mayor similitud con las STPQs eucariotas.

Además, algunas de estas proteínas participan tanto en procesos vitales para la sobrevivencia de la célula como la división celular o la patogenicidad, y muestran una muy baja identidad de secuencia con las enzimas de eucariotas ( $\leq 30\%$ ), lo cual los hace candidatos atractivos para el diseño de drogas (Székely y col., 2008).

*Mycobacterium smegmatis* es un modelo atractivo para estudiar al agente causal de la tuberculosis, ya que es de crecimiento rápido, crece en un medio simple definido que contiene glucosa y sales, y es una bacteria no patógena en comparación con *Mycobacterium tuberculosis*. No obstante, la característica más importante en *Mycobacterium smegmatis* es que se han descrito 18 STPQs de las cuales PknA, PknB, PknF, PknG, PknL y PknK muestran una alta homología con respecto a las STPQs de *Mycobacterium tuberculosis* (Gopalswamy y col., 2008). También en *M. smegmatis* algunas de estas quinastas son esenciales para el crecimiento y la sobrevivencia celular.

Actualmente, se tiene poco conocimiento de cómo los eventos de fosforilación y desfosforilación de las STPQs de *Mycobacterium tuberculosis* intervienen en su virulencia u otros procesos fisiológicos. Adicionalmente, no se conocen todos los sustratos *in vitro* e *in vivo* de las STPQs en esta bacteria (Chopra y col., 2003; Young y col., 2003).

Para caracterizar las funciones de estas enzimas y poder estudiar su papel en la biología de *Mycobacterium tuberculosis*, se han utilizado sistemas de expresión. Sin embargo, debido al carácter esencial de algunos genes que codifican para STPQs (PknA, PknB, PknL y PknG), para su estudio se requieren sistemas de expresión condicional (Av Gay y Everett, 2000).

#### **1.2.7.- Sistemas de expresión condicional.**

Como se mencionó anteriormente, se ha reportado que las STPQs PknA y PknB de *M. tuberculosis* (las de interés para este trabajo) son codificadas por genes esenciales. Entiéndase por estos, aquellos que codifican para funciones indispensables para la sobrevivencia de la bacteria, por lo tanto, su delección o mutación genera una condición de letalidad para la misma.

Por esta razón, se han desarrollado herramientas apropiadas para el estudio de los genes esenciales. Estas consisten en sistemas de expresión condicional que permiten controlar de manera selectiva la expresión de genes de un organismo permitiendo estudiar su función y poder validar blancos de drogas en esa bacteria (DeVito y col., 2002; Mnaimneh y col., 2004).

El desarrollo de sistemas de expresión condicional de genes en micobacterias se ha visto limitada por dos factores principales. La poca disponibilidad de plásmidos propicios para

la transformación tanto en micobacterias de crecimiento rápido como lento, así como su mantenimiento. En segundo lugar, por falta de promotores micobacteriales apropiados. Lo anterior ha llevado a la búsqueda de sistemas de expresión en otras especies que puedan ser utilizados en micobacterias.

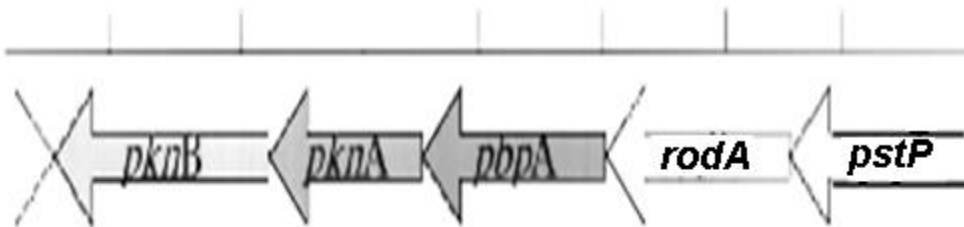
En la actualidad existen varios sistemas de expresión condicional utilizados en micobacterias como son: a) el promotor inducible por acetamida controlado por dos reguladores positivos y uno negativo (Mahenthiralingam y col., 1993; Parish y col., 1997; Parish y Stoker, 1997; Roberts y col., 2003). b) el promotor controlado por uno o dos operadores dependientes del represor TetR, en donde, el gen de interés está bajo el control transcripcional de un promotor que contiene uno o dos operadores de TetR (*tetO*), por lo que, en ausencia de tetraciclina, TetR se une a *tetO* impidiendo la expresión del gen de interés (Blokpoel y col., 2005; Ehrt y col., 2005) y c) el promotor inducible por Pristinamicina, que está basado en un represor sensible a pristinamicina (Pip), capaz de unirse a tres sitios operadores del promotor ubicados en los alrededores del gen *ptr*, que codifica para una proteína asociada a la resistencia a múltiples fármacos en *Streptomyces pristanaespiralis*, sobreponiéndose a la región promotora, por lo tanto, en presencia de Pristinamicina, Pip se libera y se inicia la transcripción (Folcher y col., 2001).

Todos estos sistemas de expresión condicional de genes en micobacterias desarrollados hasta la fecha, todavía presentan varias limitaciones que imponen su uso sólo bajo ciertas condiciones y en una gama relativamente baja de experimentos (Boldrin y col., 2010).

Recientemente, se ha reportado un sistema desarrollado por Boldrin y colaboradores en el año 2010, donde se plantea un sistema de expresión condicional basado en la utilización de dos represores TetR y Pip. Este sistema permite la expresión del gen evaluado sólo en ausencia de anhidrotetraciclina (ATc), un derivado menos tóxico de la tetraciclina. Así, de forma condicional, se puede reprimir la expresión del gen silvestre y evaluar el efecto de la expresión de genes mutantes. Además, el sistema es igualmente útil para el estudio de micobacterias de crecimiento lento o de crecimiento rápido. Debido a sus características, este fue el sistema elegido en este trabajo, para realizar el estudio de los genes esenciales *pknA* y *pknB*.

## 2.- Antecedentes

*Mycobacterium tuberculosis* posee 11 genes que codifican para STPQs de tipo eucariotas, en donde, *pknA* y *pknB* están localizados formando parte de un mismo operón, cuya organización y secuencia se encuentra altamente conservada en actinobacterias (Wehenkel y col., 2008). Este operón está conformado por 5 genes (Figura 3): *pstP*, que codifica para una proteína Serina-Treonina fosfatasa, que desfosforila a PknA y PknB, lo que sugiere que la regulación de los procesos donde participan estas quinasas, ocurre por una cascada de fosforilación/desfosforilación (Chaba y col., 2002); el gen *rodA*, involucrado en el control de la forma y elongación celular; *pbpA*, un gen implicado en la síntesis de peptidoglicano, y las STPQs *pknA* y *pknB* (Av Gay y col., 1999). Este operón se encuentra cerca del origen de replicación cromosomal (Wehenkel y col., 2008).



**Figura 3.** Mapa esquemático describiendo la localización cromosómica de *pknA* y *pknB*. Tomado y modificado de Av Gay y col., 1999.

Kang y colaboradores en el año 2005, encontraron que *pstP* es el primer gen de esta unidad transcripcional y hacia su extremo 5' se encuentra el único sitio de inicio de la transcripción. Debido a su ubicación se sugiere que los genes *pknA* y *pknB* podrían regular procesos relacionados con la división celular y el crecimiento de la micobacteria. De hecho, la transcripción de estos genes incrementa durante la fase exponencial del crecimiento o en infecciones en macrófagos (Wehenkel y col., 2008). Por otra parte, la sobreexpresión de estas

STPQs disminuye el crecimiento y altera la morfología de las micobacterias (Av Gay y col., 1999; Kang y col., 2005; Singh y col., 2006), lo que sugiere, la participación de estas STPQs en la síntesis de la pared celular y el proceso de división celular (Wehenkel y col., 2008).

*pknA* codifica para una proteína de 431 aminoácidos, caracterizada por Chaba y colaboradores en el año 2002. Posee un dominio quinasa, un dominio transmembrana y un dominio extracelular (Av Gay y Everett, 2000). En otras bacterias, PknA pertenece a una familia de proteínas involucradas en el control de la forma celular y la formación del peptidoglicano (Begg y Donachie, 1985; Henriques y col., 1998; Chopra y col., 2003). Chopra y colaboradores en el año 2003, demostraron que al expresar constitutivamente el gen *pknA* en *E. coli*, se observó un incremento en la elongación de las células, lo que sugiere la participación de esta proteína en la regulación de cambios morfológicos relacionados con la división celular. Resultados similares fueron encontrados en *M. smegmatis* y *M. bovis* BCG (Kang y col., 2005; Wehenkel y col., 2008).

Por otra parte, Chaba y colaboradores en el año 2002, clonaron el gen *pknA* y lo expresaron como una proteína de fusión unida a la proteína de unión a maltosa, demostrando que esta STPQ es capaz de autofosforilarse, siendo este un evento intermolecular (Thakur y col., 2008). Adicionalmente, PknA tiene actividad dependiente de manganeso capaz de fosforilar sustratos exógenos como histonas y la proteína básica de mielina.

Se ha demostrado que PknA fosforila e inhibe la actividad GTPasa de FtsZ, una proteína involucrada en la formación del *septum* en bacterias (Thakur y col., 2006). Otras observaciones *in vivo* muestran que PknA fosforila a la condensasa MtFabH, la cual es un sustrato específico de la Beta-cetoacil-Proteína Transportadora de Acilos Sintasa III de *M.*

*tuberculosis*, enzima que participa en la biosíntesis de ácidos grasos (Veyron-Churlet y col, 2009).

PknB es una Ser/Thr proteína quinasa de 626 aminoácidos, caracterizada por Av Gay y colaboradores en el año 1999, compuesta por un dominio quinasa catalítico intracelular, un dominio transmembrana seguido de un dominio extracelular que, consiste en una repetición de cuatro dominios denominados Dominios de Asociación de Ser/Thr proteínas quinasas a las proteínas de unión a la penicilina (PASTA) (Alzari, 2006; Young y col., 2003; Barthe y col., 2010). Yeats y colaboradores en el año 2002, sugieren que los dominios PASTA podrían participar en el reconocimiento de señales específicas que determinen el inicio de la síntesis de peptidoglicano durante el crecimiento celular y la reactivación del estado de latencia. Esta teoría no está comprobada pues la interacción del peptidoglicano con los dominios PASTA no ha sido verificada (Wehenkel y col., 2008).

PknB posee propiedades de autofosforilación en los residuos de serina y treonina (Mieczkowski y col., 2008) y también fosforila otras STPQs como el caso de PknA (Kang y col., 2005; Alzari, 2006). Adicionalmente, reconoce como sustrato a la proteína de unión a la penicilina (PBP) micobacteriana, una proteína que participa en la síntesis del peptidoglicano durante la división y elongación celular. También participa en la expansión de la pared celular, la formación del *septum* y la preservación de la forma celular (Molle y Kremer, 2010). PknB también fosforila a GImU, una enzima que sintetiza un paso importante en la biosíntesis de peptidoglicano (Parikh y col., 2009). Villarino y colaboradores en el año 2005, identificaron que la proteína GarA, un regulador de la acumulación y reciclaje de glicógeno, también es un sustrato de PknB.

Molle y Kremer en el año 2010, encontraron que tanto PknA como PknB fosforilan al regulador transcripcional EmbR. Kang y colaboradores en el año 2005, demostraron que en *M. tuberculosis*, PknA y PknB fosforilan en conjunto a Wag31, un homólogo de la proteína DivIVA que participa en la división celular. Además muestran una fosforilación intermolecular eficiente entre ellas, lo que sugiere la posibilidad que la fosforilación cruzada entre estas proteínas pudiese ocurrir durante la transducción de señales *in vivo*. Además encontraron que estas STPQs fosforilan preferiblemente residuos Treonina que residuos Serina.

Sasseti y colaboradores en el año 2003, demostraron que ambos genes (*pknA* y *pknB*) son esenciales para la supervivencia de *M. tuberculosis* por lo que su delección o mutación genera una condición de letalidad para la misma. Es por este motivo que para el estudio de estos genes esenciales se implementará un sistema de expresión condicional.

### **Sistema de expresión condicional descrito por Boldrin y colaboradores en el año 2010.**

Con el fin de llevar a cabo el presente trabajo se ha seleccionado para el estudio de los genes *pknA* y *pknB*, el sistema de expresión condicional descrito por Boldrin y colaboradores en el año 2010. Este está basado en el uso de dos represores diferentes (TetR y Pip) codificados a nivel cromosómico. A continuación se describe en detalle dicho sistema de expresión condicional.

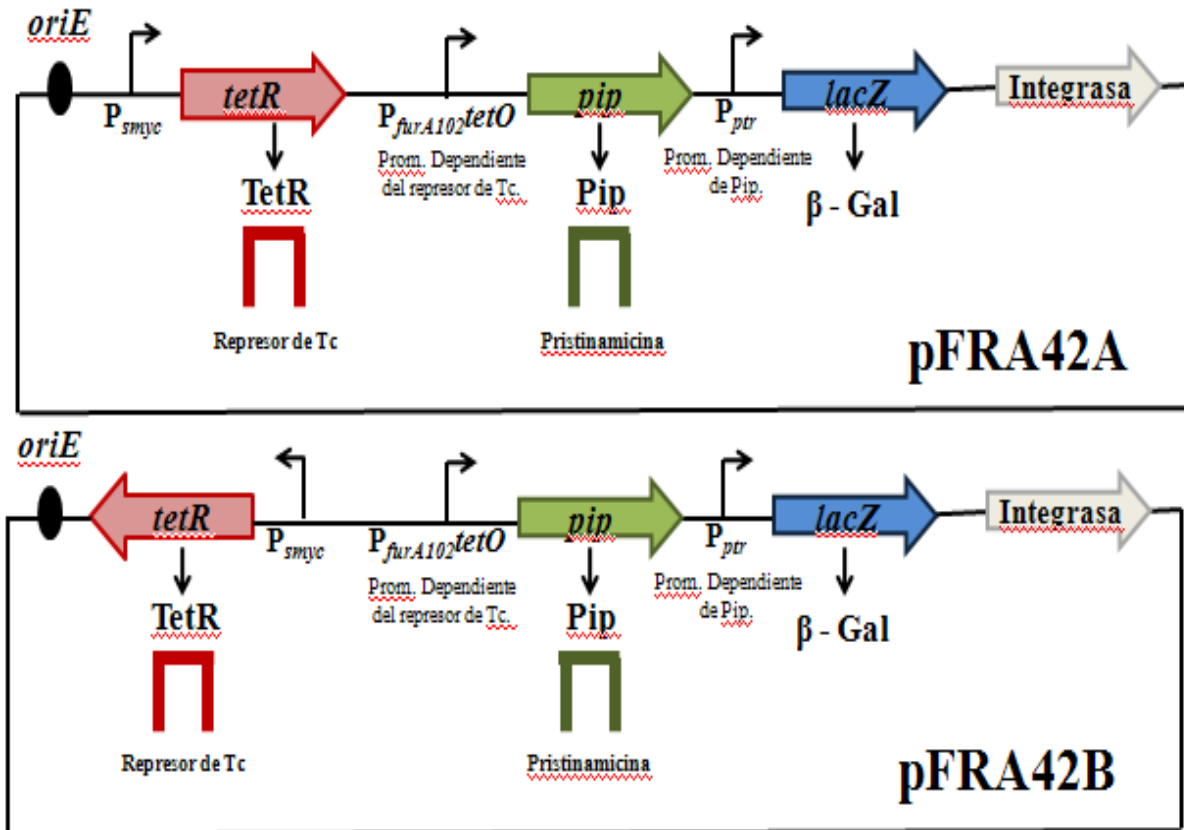
El sistema requiere la integración de dos plásmidos en el genoma de la micobacteria cuyas características se describen en la tabla I. Los plásmidos pFRA42A ó pFRA42B, poseen origen de replicación para *E. coli* pero no para micobacterias, están diferenciados entre sí por la orientación del gen que codifica para TetR (Figura 4). Son vectores integrativos con capacidad de incorporarse al genoma bacteriano en el locus *attB*, sitio de integración único del



micobacteriofago L5. Contienen un derivado del transposón *Tn10* que codifica para TetR, el gen *pip* de *S. coelicolor* que codifica para el represor transcripcional sensible a pristamicina Pip, y por último, el gen reportero *lacZ*. En estos plásmidos, *tetR* se transcribe a partir del promotor constitutivo (*Psmyc*), *pip* a partir de promotor dependiente del represor *tetR* (*P<sub>furA102tetO</sub>*) y el gen *lacZ* a partir de un promotor dependiente de *pip* (*P<sub>ptr</sub>*). Poseen además un gen que codifica para el determinante de resistencia a Estreptomicina (Str) (Tabla I).

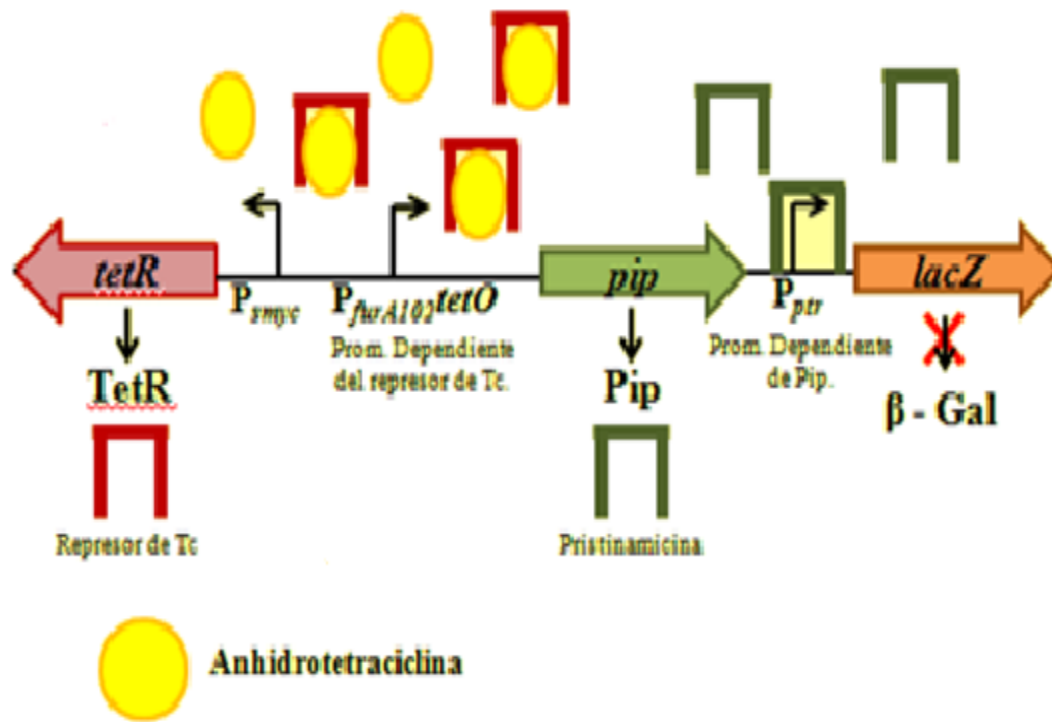
**Tabla I.** Características de los plásmidos del sistema de expresión condicional.

Plásmidos	Características	Determinante de resistencia
<b>pFRA42A-42B</b>	Integrativos, con origen de replicación para <i>E. coli</i> , poseen un derivado del transposón <i>Tn10</i> que codifica el represor transcripcional sensible a tetraciclina <i>tetR</i> , el gen <i>pip</i> que codifica al represor transcripcional sensible a pristamicina Pip y el gen reportero <i>lacZ</i> .	Estreptomicina (Str)
<b>pFRA50</b>	Suicida, posee al promotor dependiente de Pip ( <i>P<sub>ptr</sub></i> ).	Higromicina (Hig)



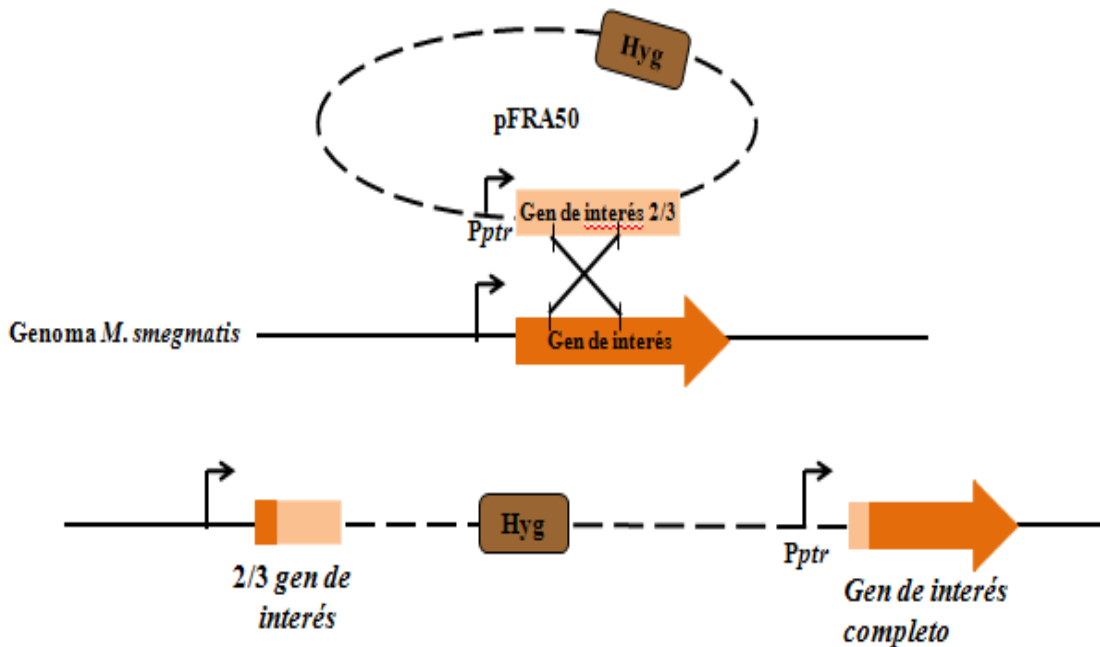
**Figura 4.** Representación esquemática de la conformación de los vectores integrativos pFRA42A y pFRA42B. Tomado y modificado de Boldrin y col., 2010.

Al transformar a *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con pFRA42A ó pFRA42B se obtienen transformantes que expresan el fenotipo Str<sup>R</sup> y *lacZ* en ausencia de anhidrotetraciclina (ATc). Bajo esta condición, el represor de tetraciclina TetR se une al promotor  $P_{furA102tetO}$  reconociendo la secuencia de las dos regiones operadoras, bloqueando la expresión del gen *pip*. Al no sintetizarse Pip, éste no se unirá al promotor  $P_{ptr}$ , por lo tanto, se transcribe el gen *lacZ*, obteniendo colonias azules (Figura 5).



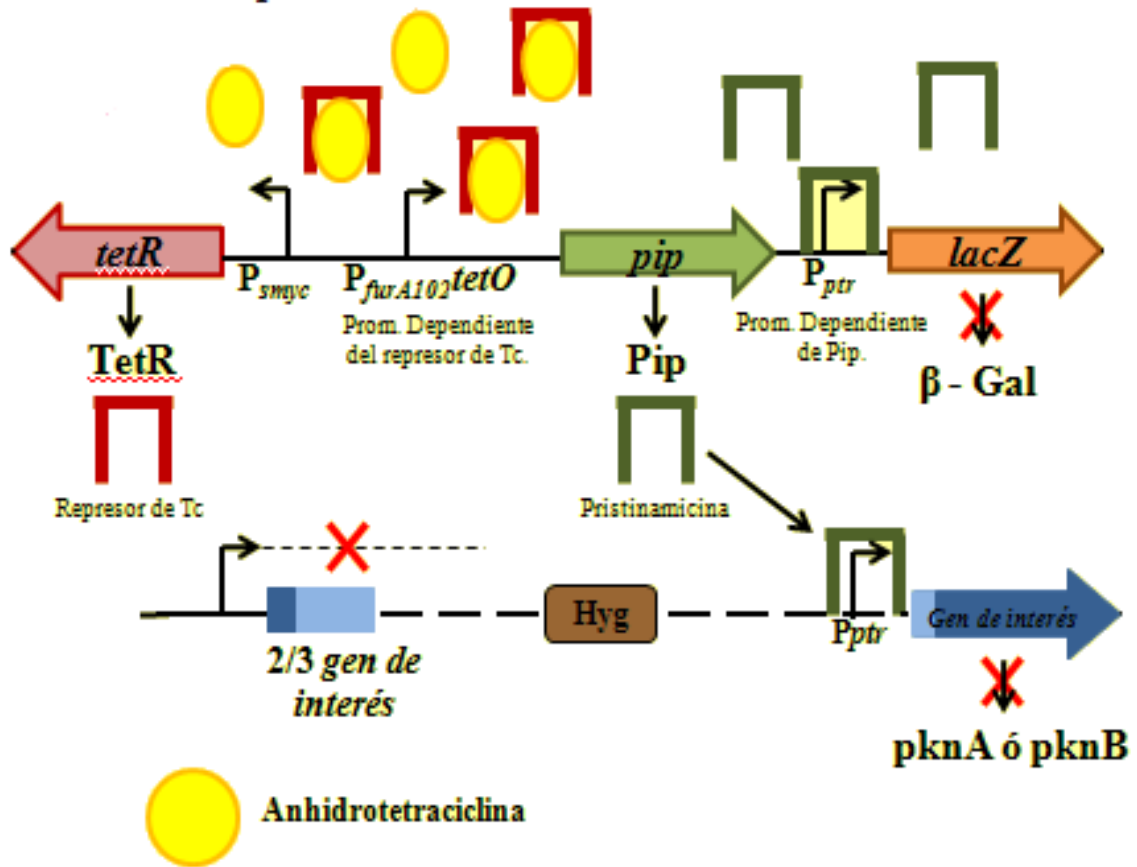
**Figura 5.** Representación esquemática de las cepas transformadas con pFRA42A ó pFRA42B en presencia de ATc. Tomado y modificado de Boldrin y col., 2010.

La segunda parte del sistema es aportada por el plásmido suicida pFRA50, que contiene un casete de resistencia a Higromicina y posee el promotor dependiente de Pip ( $P_{ptr}$ ). En este plásmido se va a clonar una secuencia equivalente a los dos tercios del gen de interés aproximadamente. Dicho sistema se va a integrar al genoma de la micobacteria, previamente transformada con la primera parte del sistema por un proceso de recombinación homóloga sitio específico. La cepa obtenida contiene el gen silvestre bajo el control del promotor dependiente de Pip ( $P_{ptr}$ ) y el fragmento clonado en pFRA50 (2/3 de *pknA* y *pknB*) estaría bajo el control del promotor del gen silvestre. Dicha cepa sería resistente a Higromicina (Figura 6).



**Figura 6.** Representación esquemática de un segmento de pFRA50 y proceso de recombinación homóloga entre el plásmido recombinante y el genoma de *M. smegmatis*. Tomado y modificado de Boldrin y col., 2010.

Por lo tanto, el sistema completo funciona de la siguiente manera: En presencia de Anhidrotetraciclina: el represor de Tetraciclina (TetR) se une a la anhidrotetraciclina presente en el medio. Bajo estas condiciones, el represor Pip se expresa a partir del promotor fuerte  $P_{furA102tetO}$ . Seguidamente, Pip se unirá al promotor dependiente de Pip ( $P_{ptr}$ ) impidiendo la expresión del gen *lacZ* y del gen en estudio (Figura 7), en nuestro caso *pknB* o *pknA*, lo que conlleva a la muerte de la bacteria por ser genes esenciales.



**Figura 7.** Representación del sistema de expresión condicional utilizando dos represores transcripcionales (TetR y Pip) en presencia del inductor anhidrotetraciclina (ATc). Tomado y modificado de Boldrin y col., 2010.

El sistema desarrollado permite el estudio de genes esenciales y sirve tanto para micobacterias de crecimiento rápido como lento y garantiza una represión completa de la expresión del gen de interés.

### **3.- Justificación**

*Mycobacterium tuberculosis* es el agente causal de la tuberculosis (TBC), enfermedad infecciosa que provoca más de 1,7 millones de muertes a nivel mundial. Por esta razón actualmente, se considera un problema de salud pública. A pesar de los esfuerzos realizados por numerosos grupos de investigación en el mundo, la deficiencia de estrategias terapéuticas contra el agente causal de la tuberculosis y la creciente selección de cepas resistentes a múltiples drogas del tratamiento, nos lleva a la necesidad urgente de encontrar nuevos blancos para el desarrollo de drogas que permitan controlar la enfermedad.

En este sentido, uno de los candidatos más importantes son las Proteínas Serina/Treonina Quinasas (STPQs) PknA y PknB de *M. tuberculosis*, las cuales codifican para genes esenciales para el crecimiento de la bacteria. También se tienen evidencias que sugieren que participan en los procesos de división y crecimiento celular. Debido a que son genes esenciales, su estudio es complicado debido a que, se necesitan sistemas de expresión condicional para poder estudiarlos y actualmente, los sistemas existentes desarrollados para micobacterias presentan limitaciones.

Recientemente, Boldrin y colaboradores en el año 2010, desarrollaron un sistema de expresión condicional basado en dos represores transcripcionales TetR y Pip, que garantiza la represión completa del gen de interés en presencia del inductor anhidrotetraciclina (ATc). Dicho sistema se puede aplicar tanto para micobacterias de crecimiento lento como rápido. Este sistema será el implementado en este trabajo para obtener las cepas que expresen condicionalmente a los genes *pknA* ó *pknB*.

La obtención de estas cepas es de suma importancia, ya que se podrían en un futuro realizar los experimentos que nos permitan conocer con más detalle el papel de los genes *pknA* y *pknB* en la biología de *M. tuberculosis*, así como conocer los sustratos e interacciones de ambas proteínas en las rutas de señalización o procesos metabólicos.

Con esta información sería posible diseñar drogas que podrían inhibir sus actividades enzimáticas y con ello, validar la posibilidad de servir como blanco terapéutico.

#### **4.- Objetivos**

##### **GENERAL:**

- 1- Construir dos cepas que expresen condicionalmente los genes *pknA* y *pknB* de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 basados en el sistema reportado por Boldrin y colaboradores en el 2010.

##### **ESPECÍFICOS:**

- ❖ Obtener una cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con los vectores pFRA42A o pFRA42B integrados al genoma y evaluarlas en un ensayo a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).
- ❖ Obtener amplicones con segmentos de los genes *pknA* o *pknB*.
- ❖ Clonar los amplicones en el vector suicida pFRA50 y comprobación de los clones.
- ❖ Obtener una cepa de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 modificada conteniendo los vectores integrados y los genes *pknA* o *pknB* bajo el control de un promotor condicional.



## 5.- Materiales y Métodos

### 5.1.- Materiales.

#### 5.1.1.- Cepas bacterianas y plásmidos.

Las características de las cepas bacterianas y plásmidos utilizados en este trabajo se encuentran descritas en la Tabla II. La cepa de *E. coli* denominada XL1-blue fue utilizada como hospedadora para realizar la construcción, selección, mantenimiento y amplificación de los clones recombinantes. La cepa *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 fue el modelo de estudio para la implementación del sistema de expresión condicional para los genes *pknA* y *pknB*.

**Tabla II.** Genotipos de las cepas bacterianas y determinantes de resistencia de los plásmidos utilizados.

Cepa	Genotipo	Resistencia	Origen
<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	Cepa mutante de <i>M. smegmatis</i> derivada de la cepa silvestre mc <sup>2</sup> 6, caracterizada por su alta eficiencia de transformación	Ninguna	Snapper y col., 1990
<i>E. coli</i> XL1-blue	<i>recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac</i> [F' <i>proAB lacIq</i> ZΔM15 Tn10].	Tetraciclina (Tet)	Bullock y col., 1987
MS82	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 + pFRA42A	Estreptomicina (Str)	Este proyecto
MS83	Derivada de <i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155 + pFRA42B	Estreptomicina (Str)	Este proyecto
Plásmidos	Características	Determinante de resistencia	
pFRA42A-42B	Integrativos, posee más de 10000 pb.	Estreptomicina (Str)	Boldrin y col., 2010
pFRA50	Suicida, posee 4320 pb.	Higromicina (Hig)	Boldrin y col., 2010

### 5.1.2.- Reactivos.

Todas las soluciones fueron adquiridas de las casas comerciales Sigma Chemical Co (USA), Difco, Gibco, Invitrogen, Promega y Qiagen. Cuando fue necesario, las soluciones y medios de cultivo se esterilizaron por filtración o en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

### 5.1.3.- Medios y condiciones para el cultivo bacteriano.

Para el cultivo de *E. coli XL1-blue* se utilizó el medio Luria Bertani- LB (ALPHA biosciences) bien sea líquido o sólido. En el caso de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 se utilizó medio líquido Middlebrook 7H9 (DIFCO) o medio sólido Middlebrook 7H10 (DIFCO) suplementado con glicerol (0,5%) y OAD (10%) (NaCl 0,85%, Albúmina Sérica Bovina 5%, Ácido Oléico 5% y NaOH 0,2N 1%). La composición de los medios se muestra en la tabla III. En ambas bacterias las condiciones de cultivo son las mismas, incubación a 37 °C con agitación.

**Tabla III.** Componentes de los medios de cultivo utilizados.

Medio de cultivo	Componentes
7H9 (medio líquido)	Citrato de sodio, sulfato de amonio, ácido L-glutámico, OAD 10%, fosfato monopotásico, sulfato de zinc, citrato de amonio férrico, piridoxina, biotina, fosfato disódico, sulfato de magnesio, cloruro de calcio, sulfato de cobre, Tween 80 0,05% y pH 6,6 a 25 °C.
7H10 (medio sólido)	Ácido L-glutámico, citrato de sodio, piridoxina, biotina, fosfato disódico, fosfato monopotásico, sulfato de amonio, sulfato de zinc, citrato de amonio férrico, sulfato de magnesio, cloruro de sodio, sulfato de cobre, verde de malaquita, agar, OAD 10%, Tween 80 0,05% y pH 6,6 a 25 °C.
Caldo LB (Luria- Bertani) Medio líquido o sólido	Cloruro de sodio, extracto de levadura, caseína y peptona y para medio sólido, añadir 15 gramos de agar por cada litro de caldo LB.

#### 5.1.4.- Antibióticos.

Para la preparación y preservación de los antibióticos utilizados en este trabajo se siguieron las recomendaciones de las empresas fabricantes. Los antibióticos empleados para suplementar los medios de cultivo fueron: Tetraciclina (SIGMA), Higromicina B (CALBIOCHEM), Estreptomicina (SIGMA) y Anhidrotetraciclina (SIGMA) a diversas concentraciones (Tabla IV).

Cada uno de los antibióticos se esterilizó por filtración y fueron almacenados en alícuotas a -20°C.

**Tabla IV.** Concentraciones de antibióticos utilizadas para *E. coli* XL1-blue y *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

<b>Antibiótico</b>	<b><i>M. smegmatis</i> mc<sup>2</sup>155</b>	<b><i>E. coli</i> XL1-blue</b>
Tetraciclina (20 mg/mL)	_____	20 µg/mL
Higromicina (100 mg/mL)	50 µg/mL	200 µg/mL
Estreptomicina (25 mg/mL)	25 µg/mL	25 µg/mL
Anhidrotetraciclina (20 mg/mL)	0, 10, 50 y 200 ng/mL	_____

#### 5.1.5.- Enzimas.

Se emplearon las endonucleasas de restricción: *XhoI*, *SmaI*, *NsiI*, *KpnI* (New England Biolabs y PROMEGA), T4 ADN ligasa (New England Biolabs), Proteinasa K (SIGMA), Lisozima (SIGMA) y ADN Polimerasa Phusion de Alta fidelidad (Finnzymes). Todas fueron empleadas siguiendo las especificaciones de la respectiva casa comercial.

### **5.1.6.- Estuches comerciales.**

Durante la realización de este trabajo se emplearon los siguientes estuches comerciales QIAquick<sup>®</sup> gel Extraction kit (Qiagen), QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit (Qiagen) y QIAquick<sup>®</sup> Miniprep kit (Qiagen). Todos los estuches comerciales se utilizaron según las indicaciones de su fabricante.

### **5.2.- Técnicas básicas de biología molecular empleadas.**

#### **5.2.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155.**

Se realizó según el protocolo descrito por van Soolingen y colaboradores en el año 1991, como se describe a continuación: Se colocó una colonia aislada de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 en 5 mL de medio de cultivo líquido 7H9 y se incubó a una temperatura 37 °C, con agitación durante tres días. De este cultivo se tomó una alícuota (1/100) para inocular 100 mL de medio 7H9 y se incubó a 37 °C, con agitación hasta que el cultivo alcanzó una DO<sub>(600nm)</sub> de 0,8. Luego, se procedió a centrifugar el cultivo a 3000 g durante 20 minutos. Al sedimento celular se le añadieron 3 mL de buffer TE (Tris-HCl 10mmoles.L<sup>-1</sup>, EDTA 1mmoles.L<sup>-1</sup>) y 300 µL de lisozima (10 mg.mL<sup>-1</sup>).

La mezcla se incubó durante 1h a 37 °C y luego se añadieron 420 µL de SDS (10% p/v) y 36 µL de Proteinasa K (10 mg.mL<sup>-1</sup>), esta mezcla se incubó a 65 °C. Posteriormente, se adicionaron 600 µL de NaCl (5mmoles.L<sup>-1</sup>), y después de mezclar bien, se añadieron 480 µL de Bromuro de Cetiltrimetilamonio (CTAB), la suspensión se mezcló con vortex y se incubó durante 10 minutos a 65 °C.

Se agregó posteriormente un volumen de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó y centrifugó durante 20 minutos a 8000 g. Posteriormente, se tomó la fase acuosa y se transfirió a otro tubo de centrifuga limpio y se le adicionaron 0,6 volúmenes de isopropanol (a temperatura ambiente), se dejó incubando a temperatura ambiente durante 30 minutos. Posteriormente, se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos, y se descartó el sobrenadante.

Luego, se agregó 1 mL de etanol frío (70% v/v), se centrifugó a 10000 g durante 20 minutos, se descartó el sobrenadante y se colocaron los tubos 10 minutos en una centrifuga de vacío. Finalmente se resuspendió el ADN en 50  $\mu$ L de agua ultra pura autoclavada y se almacenó a -20 °C hasta su uso.

### **5.2.2.- Aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* por el método de lisis alcalina con cloruro de litio.**

Se realizó según el protocolo descrito por Sambrook y colaboradores en el año 1989 con las siguientes modificaciones: Se inoculó una colonia aislada de *E. coli* en 5 mL de cultivo líquido Luria Bertani (LB) suplementado con el marcador de resistencia tanto de la cepa como del plásmido y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria de crecimiento, se centrifugó a 4000 g durante 15 minutos, el sedimento se resuspendió en 200  $\mu$ L de solución I (Glucosa 50mmoles.L<sup>-1</sup>, EDTA 10mmoles.L<sup>-1</sup>, Tris-HCl 25 mmoles.L<sup>-1</sup>, pH 8,0). La mezcla se incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente y a continuación se le agregaron 400  $\mu$ L de la solución de lisis II (NaOH 0,2 mmoles.L<sup>-1</sup>, dodecilsulfato de sodio SDS 1% p/v). Posteriormente, se mezcló por inversión y se dejó 5 minutos en hielo.

Tras esto, se añadieron 300  $\mu\text{L}$  de solución III (Acetato de potasio 3  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ , Ácido acético 5  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Se mezcló por inversión y se dejó 5 minutos en hielo. Seguidamente, se centrifugó la mezcla durante 10 minutos a 12000 g, el sobrenadante se transfirió a un nuevo tubo, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de isopropanol frío y se incubó 20 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , pasado este tiempo se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos.

Luego se eliminó el sobrenadante y el sedimento se resuspendió en 200  $\mu\text{L}$  de Buffer TE (Tris-HCl 10 $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ , EDTA 1 $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Seguidamente se agregaron 200  $\mu\text{L}$  de la sal Cloruro de Litio (5 $\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se incubó 5 minutos a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugó a 12000 g durante 10 minutos a temperatura ambiente, se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio y se añadió 1 mL de etanol frío (100% v/v). Se dejó incubando toda la noche a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ . Luego se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos, se eliminó el sobrenadante y se secó el sedimento durante 3 minutos. Finalmente se resuspendió en 50  $\mu\text{L}$  de agua ultra pura y se almacenó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

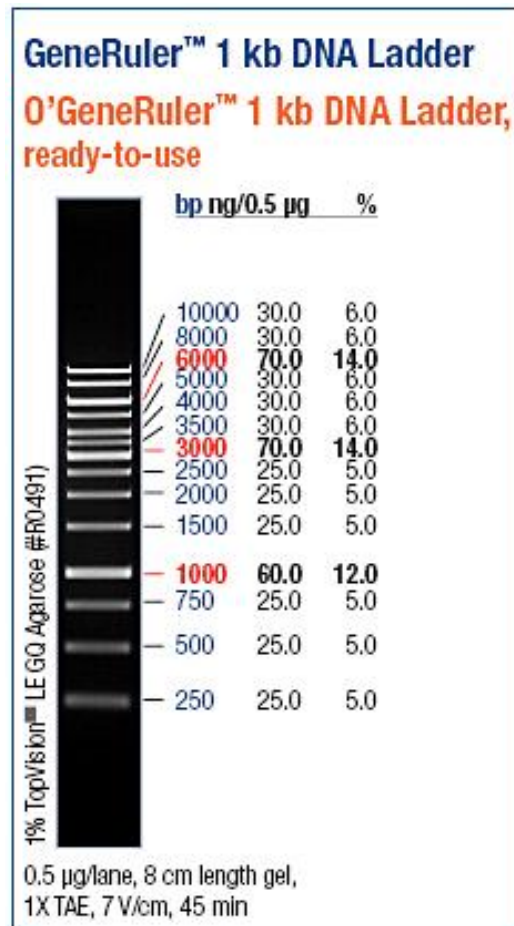
### **5.2.3.- Aislamiento de ADN plasmídico a pequeña escala por ebulición (*Boiling-miniprep*).**

Para obtener ADN plasmídico a pequeña escala de manera rápida para poder analizar los clones y detectar así la presencia del fragmento, se utilizó el protocolo reportado por Holmes y Quigley, 1981. El protocolo se describe a continuación: Se creció una colonia transformante de *E. coli* en 1 mL de medio LB en presencia del antibiótico de selección, durante toda la noche a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en agitación. Posteriormente, se centrifugó a 15000 g durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante, el sedimento se resuspendió en 110  $\mu\text{L}$  de la solución STET (NaCl 0,1  $\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$ ; Tris-HCl 10  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,0; EDTA 1 m  $\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$ , pH 8,0; Tritón

X-100 al 5% p/v) suplementada con lisozima. La mezcla se sometió a ebullición durante 45 segundos, se centrifugó a 15000 g durante 10 minutos y el sedimento correspondiente a los restos de las células hervidas, se retiró con la ayuda de palillos estériles. Posteriormente, al sobrenadante se le añadieron 110  $\mu$ L de isopropanol absoluto, se agitó e incubó durante 5 minutos a temperatura ambiente, luego se centrifugó nuevamente durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante con pipeta. El ADN precipitado se secó al vacío durante 10 minutos y posteriormente se agregaron 20  $\mu$ L de agua bidestilada estéril y se colocó a 65 °C durante 20 minutos.

#### **5.2.4.- Electroforesis en geles de agarosa.**

Para visualizar la integridad y el rendimiento del ADN se prepararon geles de agarosa cuya concentración varió entre 0,8-1,2% (dependiendo del DNA a visualizar) en buffer TBE 1X (Tris-HCl 89 mmol.L<sup>-1</sup>, Ácido bórico 89 mmol.L<sup>-1</sup>, EDTA 2 mmol.L<sup>-1</sup> pH 8,0). Posteriormente, el gel se sumergió en la cámara de electroforesis, conteniendo solución amortiguadora TBE (1X) y se cargaron las muestras de ADN previamente mezcladas con una solución de carga (azul de bromofenol 0,25%, xilencianol 0,25%, glicerol 0,50%) en los pocillos del gel. Se utilizó el Marcador de Peso Molecular 1 Kb ladder de la casa comercial Fermentas Life Sciences (Figura 8). Se aplicó una diferencia de voltaje de 80 Voltios y finalmente se llevó a cabo la observación de los geles empleando una solución de Bromuro de etidio 0,5  $\mu$ g/mL. La visualización se realizó en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) los registros de los geles se realizaron mediante fotografía digital (OLYMPUS Modelo No. C-3020) y procesadas con el programa Doc It versión 2.2.0, para digitalización y análisis de imágenes.



**Figura 8.** Marcador de peso molecular 1 Kb Ladder de la casa comercial Fermentas Life Sciences. Tomado de <http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm031-generuler-1kb> [Consulta: 10 de Septiembre de 2011].

### 5.2.5.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Se utilizó la técnica descrita por Mullis y colaboradores en el año 1986, utilizando como molde el ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con la finalidad de obtener los fragmentos correspondientes a los genes *pknA* y *pknB* de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Los cebadores empleados se describen en la tabla V, fueron diseñados con los programas MacVector y OligoExplorer, utilizando la secuencia de la base de datos GenBank del National Center for Biotechnology Information (NCBI) referenciada para los genes *pknA* y *pknB*



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Para la amplificación de los productos se utilizó la enzima ADN polimerasa Phusion de Alta Fidelidad (Finnzymes).

**Tabla V.** Cebadores empleados en la reacción en cadena de la polimerasa.

Nombre del cebador	Secuencia	Enzima de restricción	Producto	Temperatura de Hibridación	Referencia
pKNFr4	TTTTTT <u>CCCGGG</u> CCTGCCACGTCGGGCACAAG	<i>SmaI</i>	Segmento de <i>pknB</i> (1295 pb)	66 °C	Este trabajo
pKBf2	TTTTTT <u>ATGCAT</u> ACCACGCCTCAGCACCTTTCC	<i>NsiI</i>	Segmento de <i>pknA</i> (1050 pb)	66 °C	Este trabajo
pKAFf1	TTTTTT <u>ATGCAT</u> AGCCCGCGCGTTGG	<i>NsiI</i>	Segmento de <i>pknA</i> (924 pb)	64 °C	Este trabajo
PKAFr3	TTTTTT <u>ATGCAT</u> ACGCCAGCCGCCCA	<i>XhoI</i>	Segmento de <i>pknB</i> (1295 pb)	64 °C	Este trabajo
pknAsmvF	TTTTTT <u>ATGCAT</u> AGCCCGCGCGTTGGAGTCAC	<i>NsiI</i>			
pknAsmvR2	TTTTTT <u>CTCGAG</u> AGCGTCGGTGCCTGGTTGGG	<i>XhoI</i>			
pknBsmvF	TTTTTT <u>ATGCAT</u> ACCACGCCTCAGCACCTTTCC	<i>NsiI</i>			
pknBsmvR1	TTTTTT <u>CTCGAG</u> CCTGCCACGTCGGGCACAAG	<i>XhoI</i>			

Los sitios subrayados representan los sitios de restricción específicas para cada cebador.

Se realizó una mezcla de PCR que contenía un volumen final de 20  $\mu$ L, con los siguientes componentes: ADN molde (20-50 ng), cebadores (0,2  $\mu$ moles.L<sup>-1</sup>), Buffer (1X) Phusion GC, dNTPs 0,2 mmol.L<sup>-1</sup>, DMSO 10% y 0,02 U/ $\mu$ L de ADN polimerasa Phusion de Alta Fidelidad (Finnzymes). Esta reacción se colocó en un termociclador modelo 2720 Thermo Cycler *Applied Biosystems* y el programa incluyó los siguientes pasos:

1. Temperatura inicial de desnaturalización: 98 °C durante 3 minutos.
  2. Temperatura de desnaturalización: 98 °C durante 10 segundos.
  3. Temperatura de hibridación: durante 10 segundos.
  4. Temperatura de extensión: 72 °C durante 1 minuto.
  5. Temperatura de extensión final: 72 °C durante 10 minutos.
- } X 35 ciclos

Se utilizó como control negativo a la reacción de PCR, una mezcla sin ADN genómico para comprobar que los componentes de la mezcla estuvieran libres de contaminantes.

La amplificación de los fragmentos se evaluó en geles de agarosa. Para la obtención de los fragmentos, se procedió a la purificación de los mismos mediante los estuches comerciales QIAquick gel Extraction (Quiagen) y QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit (Qiagen) siguiendo las instrucciones del fabricante.

#### **5.2.6.- Digestión con enzimas de restricción.**

El ADN fue digerido con endonucleasas de restricción de las casas comerciales New England Biolabs y Promega. El volumen de reacción utilizado fue de 20 µL y las cantidades de enzima y de buffer de reacción (1X) se agregaron según las especificaciones de los fabricantes. Las reacciones de digestión fueron dejadas toda la noche a la temperatura reportada como óptima por las casas comerciales.

#### **5.2.7.- Reacciones de ligamiento.**

Para llevar a cabo las reacciones de ligamiento entre el vector y los productos de PCR previamente tratados con las enzimas de restricción correspondientes, se utilizó la enzima T4 ADN ligasa (New England Biolabs) en una proporción molar 3:1 (Inserto: Vector). Se efectuó una mezcla que contenía los siguientes componentes: ADN del inserto y ADN del vector (ambos tratados previamente con las mismas enzimas de restricción), buffer de T4 ADN ligasa (1X) y T4 ADN ligasa. Se incubó esta reacción toda la noche a 16 °C.

Se realizaron dos controles para verificar la digestión y ligamiento del inserto y del vector. El primer control, fue el ligamiento del producto de PCR digerido con cada una de las

enzimas y digerido con ambas, con la finalidad de observar dímeros en las digestiones simples y multímeros en la doble. El segundo control, consistió en tomar alícuotas de 5  $\mu\text{L}$  antes de agregar la T4 ADN ligasa y tomar otros 5  $\mu\text{L}$ , una vez completado el tiempo de la reacción. Este volumen se visualizó en una corrida electroforética con el fin de verificar si el ligamiento fue exitoso, para luego proceder a la transformación con éste.

#### **5.2.8.- Preparación de células competentes con Cloruro de Calcio ( $\text{CaCl}_2$ ).**

Se realizó según el protocolo descrito por Hanahan en el año 1983. Para llevar a cabo la preparación de células competentes, se colocó en 25 mL de medio líquido LB, una alícuota de la cepa de *E. coli* XL1-Blue crecida previamente toda la noche a 37 °C y se cultivó con agitación hasta alcanzar una  $\text{DO}_{(600\text{nm})}$  de 0,5. Esta suspensión se centrifugó a 4000 g a 4 °C durante 10 minutos. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y el sedimento fue resuspendido en 10 mL de Cloruro de Calcio  $\text{CaCl}_2$  frío (50  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ ) y se volvió a centrifugar durante 10 minutos a 4000 g a una temperatura de 4 °C. A continuación, se descartó el sobrenadante y nuevamente se resuspendió el sedimento en 10 mL de  $\text{CaCl}_2$  (50  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Finalmente, la mezcla se incubó en hielo durante 30 minutos y se centrifugó durante 10 minutos a 4000 g en frío. El sedimento se resuspendió en 2 mL de  $\text{CaCl}_2$  frío (50  $\text{mmoles}\cdot\text{L}^{-1}$ ).

#### **5.2.9.- Transformación en *E. coli* XL1-blue mediante choque térmico.**

Se tomaron las células de *E. coli* XL1-blue competentes y se le agregó el ADN de interés. Esta mezcla se colocó en hielo durante 45 minutos. Seguidamente, se le dio un choque térmico a 42 °C durante dos minutos, luego pasado este tiempo, se agregaron 500  $\mu\text{L}$  de medio LB y se incubó una hora a 37 °C. Culminado este tiempo, se sembraron 100  $\mu\text{L}$  de

la mezcla en placas de LB agar suplementadas con los antibióticos adecuados y se realizaron como controles: el plásmido pFRA50 digerido con las dos enzimas de restricción con y sin ligasa, con el fin de verificar si el vector estaba bien digerido con ambas enzimas. No se debería observar el crecimiento de colonias transformantes ya que, la ligasa no pudo unir los extremos incompatibles.

#### **5.2.10.- Preparación de células electrocompetentes de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155.**

Se utilizó el protocolo descrito por Snapper y colaboradores en el año 1990. Para iniciar la técnica de electroporación se inocularon 2 mL de medio líquido 7H9 más OAD con una colonia de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 y se incubaron en agitación a 37 °C durante tres días. Posteriormente, se inocularon 50 mL del medio 7H9/OAD con una dilución 1/100 del pre-inóculo y se incubó a 37 °C con agitación hasta que la DO<sub>(600)</sub> alcanzara valores comprendidos entre 0,8-1 (usualmente entre 16-24 horas). Luego, se incubó una hora y media en hielo, posteriormente se centrifugó a 3000 g durante 10 minutos.

Las bacterias deben ser tratadas previamente para recibir los pulsos eléctricos (células electrocompetentes) por lo que se realizaron tres lavados con glicerol frío 10% v/v, reduciendo en cada lavado el volumen de glicerol. Se empezó con un primer lavado de 25 mL de glicerol, en el segundo 10 mL y en el último 5 mL. Finalmente, se resuspendieron las bacterias en un volumen de 5 mL de glicerol frío 10% v/v.

#### **5.2.11.- Electroporación en *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155.**

Se agregaron aproximadamente 0,1-0,5 µg de DNA libre de sales a 400 µL de células electrocompetentes y la mezcla se incubó 10 minutos en hielo, resuspendiendo muy bien las

células. Posteriormente, la mezcla se colocó en una cubeta de electroporación previamente puesta en hielo. Se insertó la cubeta en la cámara de seguridad del electroporador asegurándose que la cubeta estuviera en contacto con los electrodos de la cámara para posteriormente dar el pulso eléctrico (2,5KV, 1000Ω, 25μF). Seguidamente, las células se incubaron 10 minutos en hielo, luego se transfirió la mezcla a un tubo falcón con 5 mL del medio 7H9/OAD y se incubó durante 3 horas a 37 °C. Seguidamente, se centrifugaron a 3000 g durante 10 minutos transcurrido el tiempo de incubación, retirando 4,5 mL de medio para concentrar las células. Finalmente, se sembró una alícuota de 100 μL del cultivo, en placas de medio 7H10/OAD conteniendo el marcador de resistencia y se incubaron a 37 °C durante tres días.

#### **5.2.12.- Secuenciación.**

La secuenciación de las muestras de ADN (clones recombinantes y productos de PCR) se llevó a cabo en la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses, ubicado en el Centro de Microbiología y Biología Celular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Por requerimientos de esta unidad, el ADN a secuenciar debe estar hidratado solamente con agua bidestilada esterilizada (no se debe utilizarse Tris-EDTA) y debe llegar al laboratorio en condiciones de almacenamiento adecuadas (máximo 4 °C). Las cantidades de ADN que se requieren, dependen del tipo y tamaño del ADN. Se utilizaron los iniciadores que se emplearon para realizar las reacciones de PCR (tabla IV) a una concentración de 5 pmol/μl.

#### **5.2.13.- Análisis de secuencia y uso de herramientas de bioinformática.**

Con la finalidad de evaluar las secuencias obtenidas por secuenciación de las construcciones y productos de PCR, se empleó la base de datos del GenBank, del portal

“National Center for Biotechnology Information” (NCBI), vía internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) utilizando el servicio BLAST (“Basic Local Alignment Search Tool”). También se utilizaron los programas MacVector y el programa “MultAlign”, consultándolo vía Internet (<http://www.multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html>).

Para el diseño de cebadores, se utilizaron los programas MacVector, Oligo Explorer 1.1.2 y NEBcutter V2.0 vía internet (<http://tools.neb.com/NEBcutter2/>).

#### **5.2.14.- Ensayo con diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).**

A fin de evaluar el nivel de represión en la expresión del gen *lacZ* en las cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el plásmido pFRA42A o pFRA42B integrado, se sembraron en medio sólido 7H10/OAD con Estreptomicina, suplementadas con el sustrato cróforo de la  $\beta$ -Galactosidasa (25  $\mu$ g/mL) 5-bromo-4-cloro-3-indolil- $\beta$ -D-galactopiranosido (X-gal) y concentraciones crecientes de Anhidrotetraciclina (0, 10 ó 50 ng/mL). En el caso de la evaluación de las cepas condicionales se sembraron en el medio sólido 7H10/OAD con Estreptomicina (25  $\mu$ g/mL) e Higromicina (50  $\mu$ g/mL), suplementadas con X-gal (25  $\mu$ g/mL) y concentraciones de Anhidrotetraciclina de 0, 50 ó 200 ng/mL, con el fin de poder observar el efecto de la represión en la expresión de los genes de interés.

#### **5.2.15.- Ensayos de electroporación para la obtención de las cepas condicionales mediante la recombinación homóloga.**

La cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el plásmido pFRA42B integrado fue transformada con el vector suicida construido para cada uno de los genes, empleando tres metodologías diferentes. En cada ensayo se modificaron las condiciones descritas en el protocolo de Snapper y col., 1990 (Ver 6.2.9), las cuales se utilizaron en diferentes

experimentos en donde, el objetivo era promover, posterior a la incorporación en el interior celular, la integración de los vectores suicidas por medio de la recombinación homóloga en el cromosoma bacteriano. Las condiciones evaluadas fueron las siguientes:

En el primer ensayo se electroporaron aproximadamente 2 µg de ADN (Boldrin y col., 2010). En el segundo, se trató al ADN con álcali (Hinds y col., 1999) y posteriormente, se electroporaron 5 µg de ADN. En el tercer ensayo, se mantuvo el tratamiento de desnaturalización del ADN con álcali pero se electroporó 1 µg. En los últimos dos ensayos se realizó una modificación en la preparación de las células electrocompetentes, partiendo de un cultivo de 100 mL y no de 50 mL (Parish y col., 1999).

Posteriormente, se siguió con el protocolo de electroporación (Ver 5.2.11). El medio de selección de transformantes fue 7H10 suplementado con Estreptomina (25 µg/mL), Higromicina (50 µg/mL) y el cromóforo X-gal (25 µg/mL) y se incubaron a 37 °C durante 5 días.

Se utilizaron como controles de la electroporación: la cepa MS83 sin el plásmido recombinante y la cepa MS83 transformada con el plásmido recombinante en placas con y sin Higromicina.

#### **5.2.16.- Tratamiento del ADN con álcali para favorecer el proceso de recombinación homóloga.**

Se utilizó el protocolo descrito por Hinds y colaboradores en el año 1999. Para iniciar el tratamiento, se tomó la cantidad de ADN a transformar (1-5 µg) y se agregaron 20 µL de la solución NaOH-EDTA (NaOH 0,2 moles.L<sup>-1</sup>, EDTA 0,2 mmoles.L<sup>-1</sup>), luego se incubó durante 30 minutos a 37 °C. Pasado este tiempo, se procedió a precipitar el ADN agregando 2 mL de

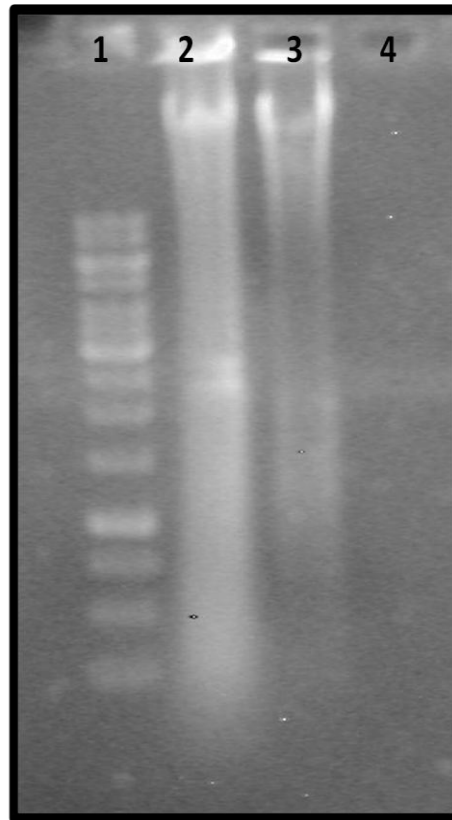
acetato de sodio ( $3 \text{ moles.L}^{-1}$ , pH 4,8) y  $80 \mu\text{L}$  de etanol (100% v/v) y se incubó durante 20 minutos a  $-70^\circ\text{C}$ . Luego, se centrifugó a  $13200 \text{ g}$  durante 15 minutos y se descartó el sobrenadante. El sedimento se lavó dos veces con  $600 \mu\text{L}$  de etanol (70% v/v) centrifugando luego de cada lavado a  $15000 \text{ g}$  durante 10 minutos. Posteriormente, el sedimento se secó al vacío durante 10 minutos y se resuspendió en  $5 \mu\text{L}$  de agua ultra pura, dejándolo en hielo durante 2 horas antes de la electroporación.



## 6.- Resultados

### 6.1.- Aislamiento de ADN genómico de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

El ADN genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 fue aislado (Ver 5.2.1) y visualizado en un gel de agarosa al 0,7% (Figura 9), observándose que se encontraba a una concentración adecuada para utilizarlo como molde en la amplificación de los fragmentos de los genes *pknA* o *pknB* por PCR.



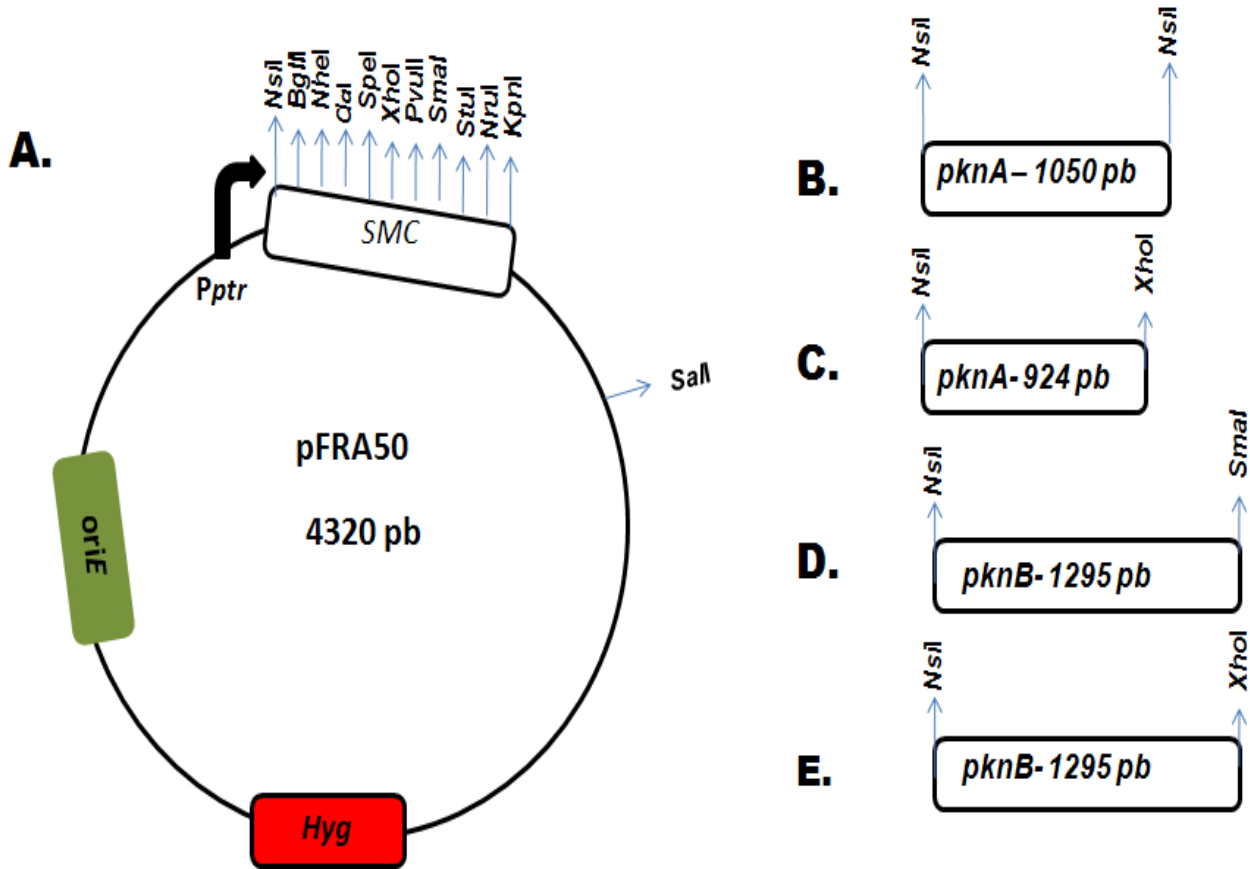
**Figura 9.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del aislamiento de ADN genómico de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: ADN genómico diluido 1/10; Carril 3: ADN genómico diluido 1/100; Carril 4: ADN genómico diluido 1/1000.

## 6.2.- Obtención por PCR de los 2/3 de *pknA* o *pknB*.

Para la amplificación de los 2/3 del gen *pknA* se utilizaron los cebadores pKAFf1-pKAFr3 y pknAsmvF-pknAsmvR2 (Tabla V) los cuales generan un fragmento de 1050 pb y 924 pb respectivamente. Por otra parte, para obtener el fragmento del gen *pknB* se utilizaron los cebadores pKBFf2-pKNFr4 y pknBsmvF-pknBsmvR1 (Tabla V) los cuales amplifican un fragmento de 1295 pb en ambos casos.

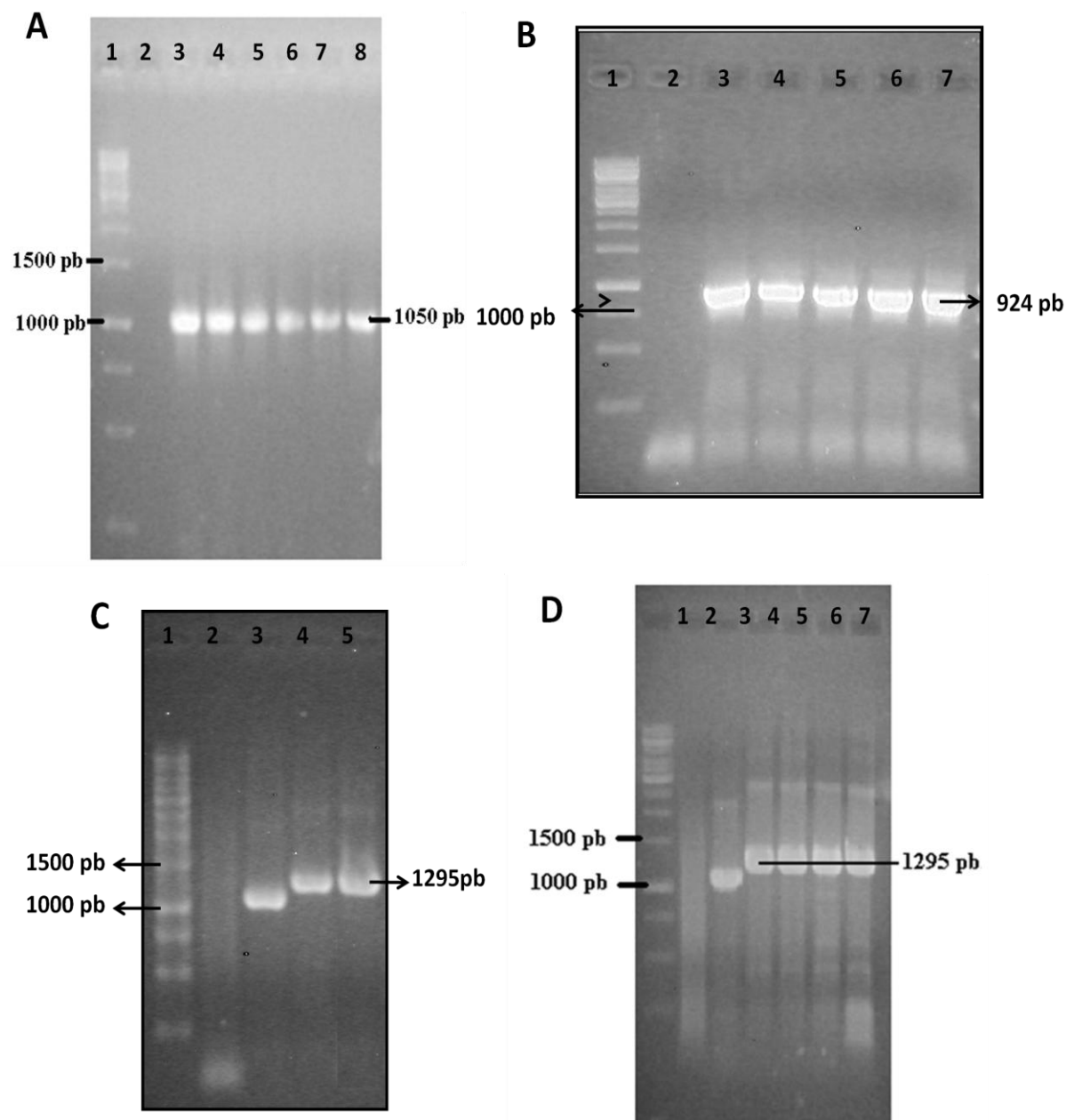
Todos los juegos de cebadores fueron diseñados con el programa Oligo Explorer, calculando una longitud del producto de PCR de aproximadamente 2/3 de la secuencia original de cada gen y colocando sitios de restricción para realizar el clonamiento. Estos sitios fueron escogidos a partir del análisis de restricción empleando el programa NEBcutter V2.0 para ambos genes. Los resultados indicaron que esos sitios de reconocimiento para enzimas de restricción no se encuentran en la secuencia de los genes *pknA* o *pknB* pero sí se encuentran en el sitio de múltiple clonamiento del vector (Figura 10).

Se utilizó la enzima de restricción *Nsi*I en el sitio 5' del cebador de modo que al momento del clonamiento del vector y el producto de PCR, éstos quedarán en fase, ya que, esta enzima corta en el ATG de la secuencia de los genes.



**Figura 10.** Representación esquemática de los productos de PCR para cada juego de cebadores. (A) Representación esquemática del vector pFRA50. (B) Representación esquemática del fragmento de *pknA* generado por los cebadores pKAFf1-pKAFr3. (C) Representación esquemática del fragmento de *pknA* generado por los cebadores pknAsmvF-pknAsmvR2. (D) Representación esquemática del fragmento de *pknB* generado por los cebadores pKBFf2-pKNFr4. (E) Representación esquemática del fragmento de *pknA* generado por los cebadores pknBsmvF-pknBsmvR1.

Los productos de PCR se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Figura 11) en donde se observó la amplificación del fragmento del tamaño esperado para el gen *pknA* con los cebadores pKAFf1-pKAFr3 (Figura 11.A) y los cebadores pknAsmvF-pknAsmvR2 (Figura 11.B). También se puede apreciar la amplificación del fragmento esperado para el gen *pknB* empleando los cebadores pKBFf2-pKNFr4 (Figura 11.C) y los cebadores pknBsmvF-pknBsmvR1 (Figura 11.D). Los controles dieron los resultados esperados, ya que, no se observa ninguna amplificación, indicando que los componentes utilizados en las reacciones de PCR estaban libres de contaminantes.

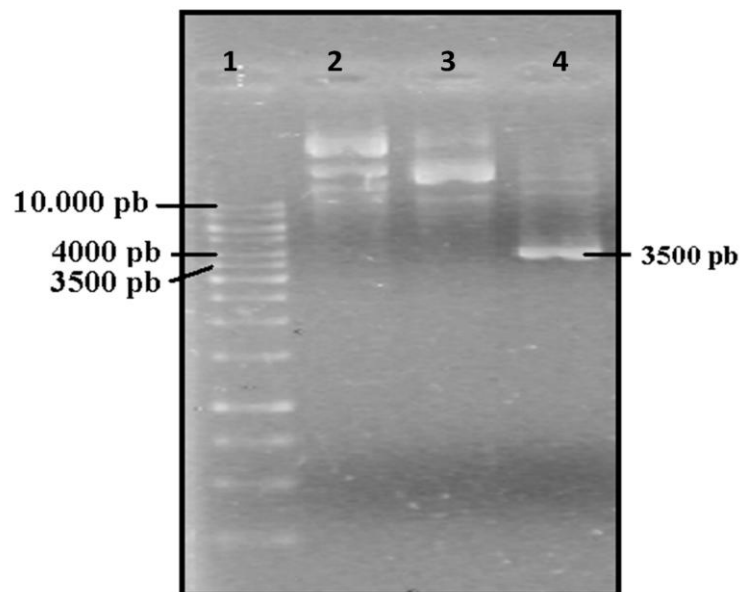


**Figura 11.** Registro fotográfico de las electroforesis en geles de agarosa al 1% de las reacciones de PCR para amplificar un fragmento de los genes *pknA* o *pknB* de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155. (A) Amplificación de los 2/3 del gen *pknA* con los cebadores pKAF1-pKAF3. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Control negativo; Carriles 3,4,5,6,7,8: *pknA* 2/3. (B) Amplificación de los 2/3 del gen *pknA* con los cebadores pknAsmvF-pknAsmvR2. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Control negativo; Carriles 3,4,5,6,7: *pknA* 2/3. (C) Amplificación de los 2/3 del gen *pknB* con los cebadores pKNF2-pKNF1. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Control negativo; Carril 3: Control positivo (cebadores que amplificaban a esa temperatura de hibridación); Carriles 4 y 5: *pknB* 2/3. (D) Amplificación de los 2/3 del gen *pknB* con los cebadores pknBsmvF-pknBsmvR1. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Control negativo; Carril 3: Control positivo (cebadores que amplificaban a esa temperatura de hibridación); Carriles 4,5,6,7: *pknB* 2/3.

Los amplificadores obtenidos fueron purificados de geles empleando los estuches comerciales QIAquick<sup>®</sup> gel Extraction kit (Qiagen) y QIAquick<sup>®</sup> PCR Purification kit (Qiagen). Posteriormente fueron llevados a la Unidad de Estudios Genéticos y Forenses para ser secuenciados. Finalmente, se realizó el análisis de las secuencias empleando el programa MacVector y MultAlign, y se pudo determinar la homología correspondiente con la secuencia original de estos genes.

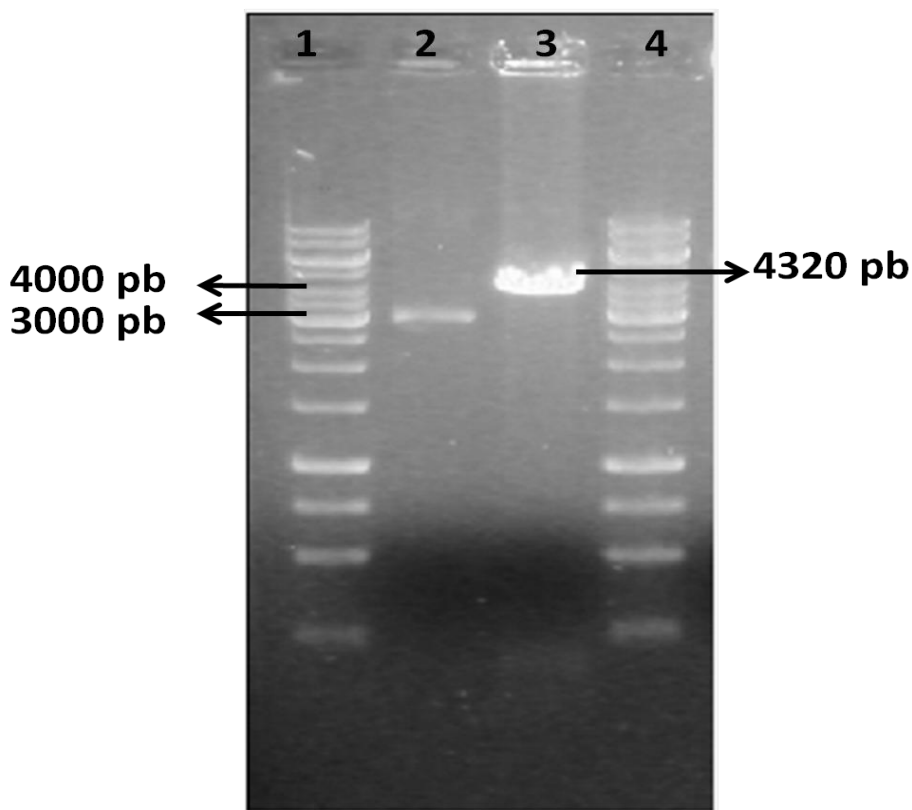
### 6.3.- Aislamiento de ADN plasmídico de los vectores pFRA42A, pFRA42B y pFRA50.

Se realizó el aislamiento de ADN plasmídico de los vectores pFRA42A, pFRA42B y pFRA50 empleando el método de lisis alcalina con cloruro de litio (Ver 5.2.2). Para ver el rendimiento y la calidad del ADN plasmídico se visualizó en un gel de agarosa al 0,7% (Figura 12), mostrando que se encuentran a una concentración adecuada para su posterior utilización.



**Figura 12.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,7% del aislamiento de ADN plasmídico de los vectores pFRA42A, pFRA42B y pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: ADN plasmídico de pFRA42A; Carril 3: ADN plasmídico de pFRA42B; Carril 4: ADN plasmídico de pFRA50.

A continuación, se procedió a digerir el vector pFRA50 con la enzima *NsiI* que se encuentra en el sitio de múltiple clonamiento de este vector. La digestión se visualizó en un gel de agarosa 0,8% (Figura 13) y se observa que efectivamente se aisló el vector pFRA50 el cual contiene 4320 pb.



**Figura 13.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de la digestión realizada al ADN plasmídico del vector suicida pFRA50 con la enzima *NsiI*. Carril 1 y 4: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: ADN del vector suicida pFRA50 aislado; Carril 3: ADN del vector suicida pFRA50 digerido con la enzima *NsiI*.

#### **6.4.- Obtención de la cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada con los vectores pFRA42A y pFRA42B.**

Para obtener la primera parte del sistema de expresión condicional desarrollado por Boldrin y colaboradores en el año 2010, se transformó *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con los vectores pFRA42A y pFRA42B (Ver 5.2.11). Las transformantes seleccionadas tendrían integrado el

vector pFRA42A o pFRA42B en el locus *attB* del micobacteriófago L5 en el genoma de la bacteria.

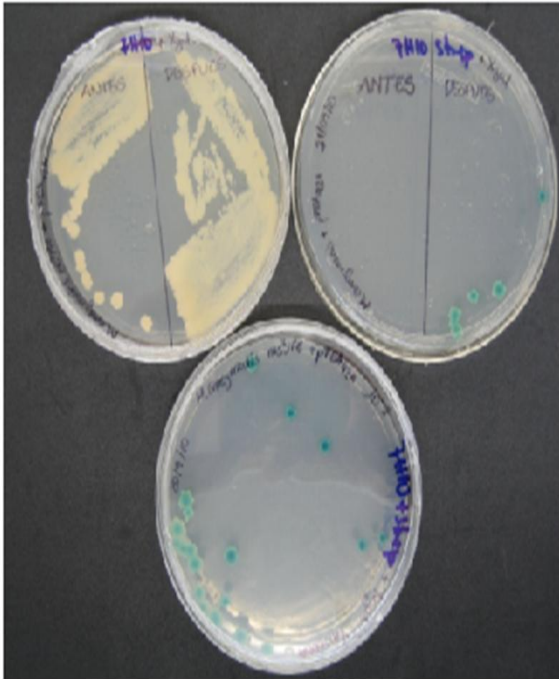
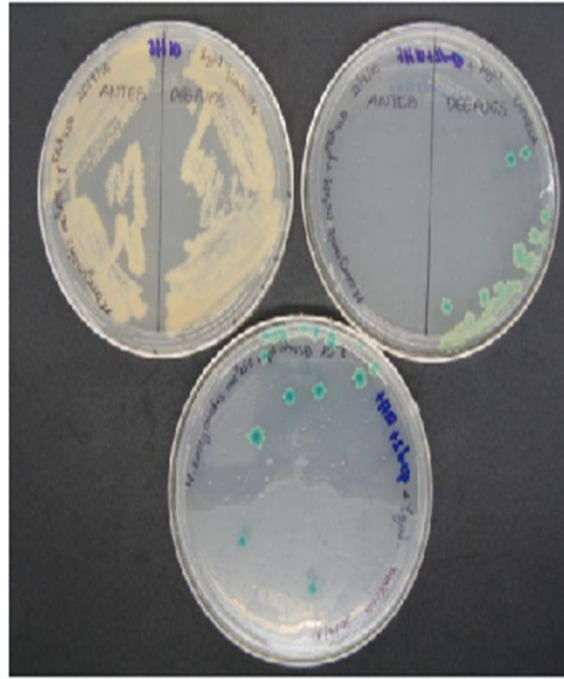
Para la selección de las transformantes se emplearon placas con medio sólido 7H10 suplementado con Estreptomicina (25 µg/mL) y el cromóforo X-gal (40 µg/mL). Como controles de la electroporación se utilizaron: *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 sin transformar y transformada con el vector pFRA42A o pFRA42B y se sembraron en placas de 7H10 con y sin Estreptomicina, con el fin de verificar la sensibilidad a Str y la viabilidad luego del choque eléctrico. Los controles dieron los fenotipos esperados (Tabla VI).

**Tabla VI.** Fenotipos obtenidos después de la electroporación de los vectores pFRA42A o pFRA42B en las cepas de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155.

Medio de cultivo	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	
	<i>M. smegmatis</i> mc <sup>2</sup> 155	con el vector pFRA42A
7H10 + X-gal	+	+
7H10 + Estreptomicina + X-gal	-	+

Leyenda: + presencia de crecimiento; - ausencia de crecimiento.

Las colonias que crecieron en este medio selectivo fueron azules (Figura 14).

**A*****M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 + pFRA42A****B*****M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 + pFRA42B**

**Figura 14.** Registro fotográfico de las placas obtenidas después de la transformación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con los vectores pFRA42A o pFRA42B. (A) Transformación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el vector pFRA42A. (B) Transformación de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el vector pFRA42B.

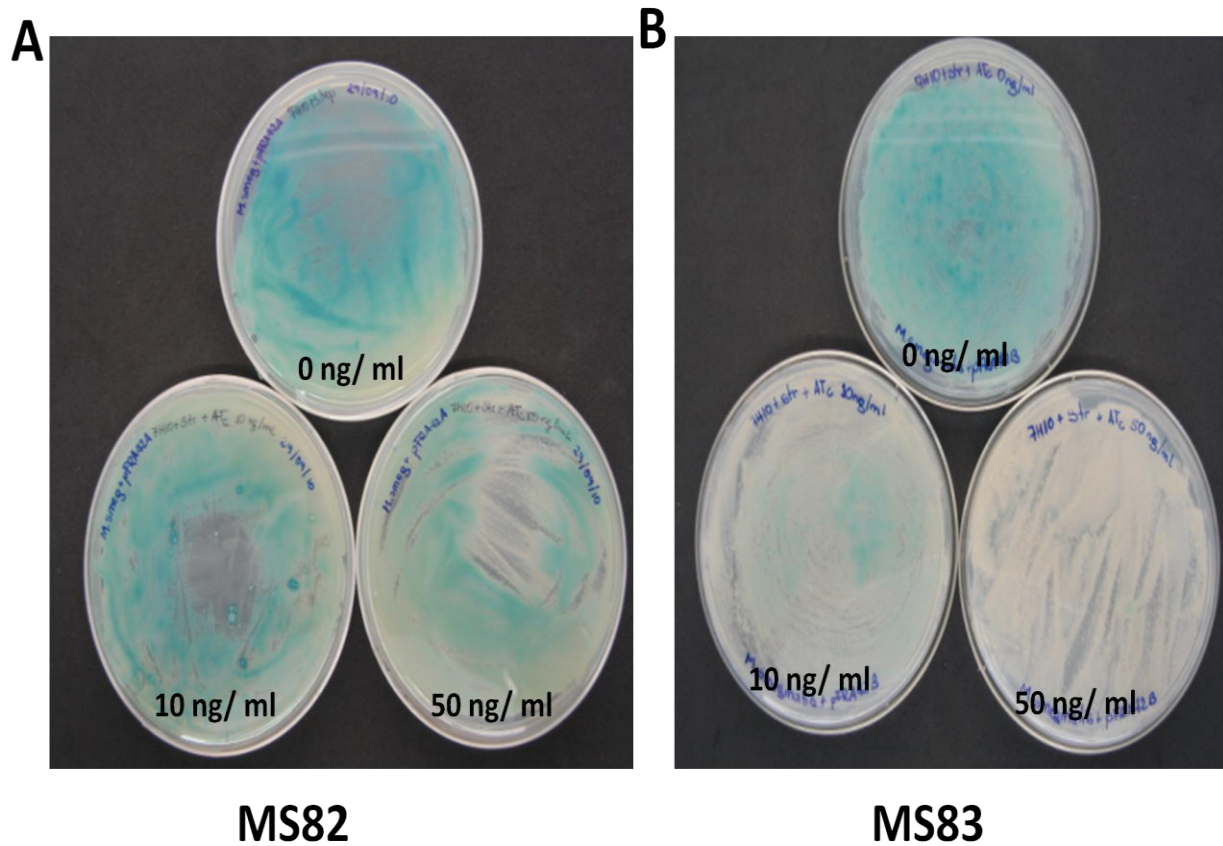
La cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 transformada con el vector pFRA42A se nombró MS82, mientras que la transformada con el vector pFRA42B recibió el nombre de MS83.

### **6.5.- Evaluación de las cepas MS82 y MS83 a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).**

Con la finalidad de evaluar la primera parte del sistema, se realizó el ensayo de ATc de la siguiente manera (Boldrin y col., 2010): se tomó una colonia transformante al azar de las cepas MS82 y MS83, se puso a crecer en medio líquido 7H9 suplementado con Estreptomina (25 µg/mL), posteriormente una alícuota de éste cultivo se sembró en placas



de medio sólido 7H10 suplementadas con Estreptomicina (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), X-gal (25  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) y concentraciones crecientes de ATc (0, 10 o 50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) (Figura 15).



**Figura 15.** Fotografía del ensayo a diferentes concentraciones de ATc (0, 10 o 50  $\text{ng}/\text{mL}$ ) realizado a las cepas MS82 y MS83. (A) Ensayo de ATc realizado a la cepa MS82. (B) Ensayo de ATc realizado a la cepa MS83.

Se obtuvieron los resultados esperados, a medida que aumenta la concentración del inductor ATc la represión del gen *lacZ* es mayor, observándose cualitativamente una disminución en la intensidad del color azul hasta obtener colonias blancas (Tabla VII).

**Tabla VII.** Apreciación cualitativa de la intensidad del color azul en las cepas MS82 y MS83 al realizarle el ensayo de anhidrotetraciclina (ATc).

Concentración de ATc	Cepa MS82	Cepa MS83
0 ng/mL	+++++	+++++
10 ng/mL	++++	++
50 ng/mL	+++	-

Leyenda: +++++ Azul muy intenso; ++++ Azul intenso; +++ Azul claro; ++ Azul muy claro; - Blancas

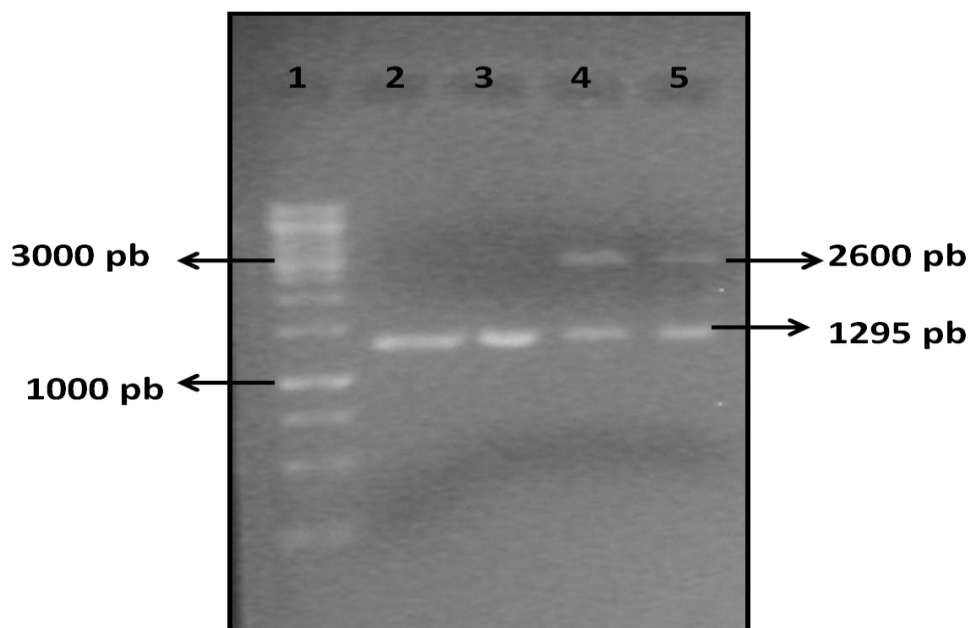
La eficiencia del sistema en la inactivación del gen *lacZ* fue mayor en la cepa MS83 ya que, a una concentración de 50 ng/mL, todas las colonias fueron blancas mientras que en la cepa MS82, todavía se observaron células de color azul. Debido a los resultados obtenidos, para los experimentos restantes se utilizará la cepa MS83.

#### 6.6.- Digestión de los productos de PCR de los genes *pknA* o *pknB*.

Una vez obtenidos los fragmentos por la técnica de PCR con los cebadores pKAFf2-pKAFr4 para *pknA* (Figura 11.A) y pKNFf1-pKNFr2 para *pknB* (Figura 11.C), se procedió a digerir con las enzimas de restricción adecuadas. En el caso de *pknA*, se digirió con la enzima *NsiI* mientras que para *pknB*, se digirió con las enzimas *NsiI* y *SmaI*. Esta última digestión se realizó de forma secuencial debido a la incompatibilidad de temperaturas y de buffers entre las enzimas.

Se realizaron las pruebas de ligamiento para los productos de PCR, es decir, se realizó el ligamiento del producto de PCR digerido con cada una de las enzimas y digerido con ambas, con la finalidad de observar dímeros en las digestiones con una sola enzima de restricción y multímeros en la digestión con ambas enzimas de restricción. Los controles se

visualizaron en un gel de agarosa al 1% (Figura 16) y se observó que la enzima *Nsi*I no estaba cortando al fragmento de *pknB*, ya que no observaba la formación de dímeros.



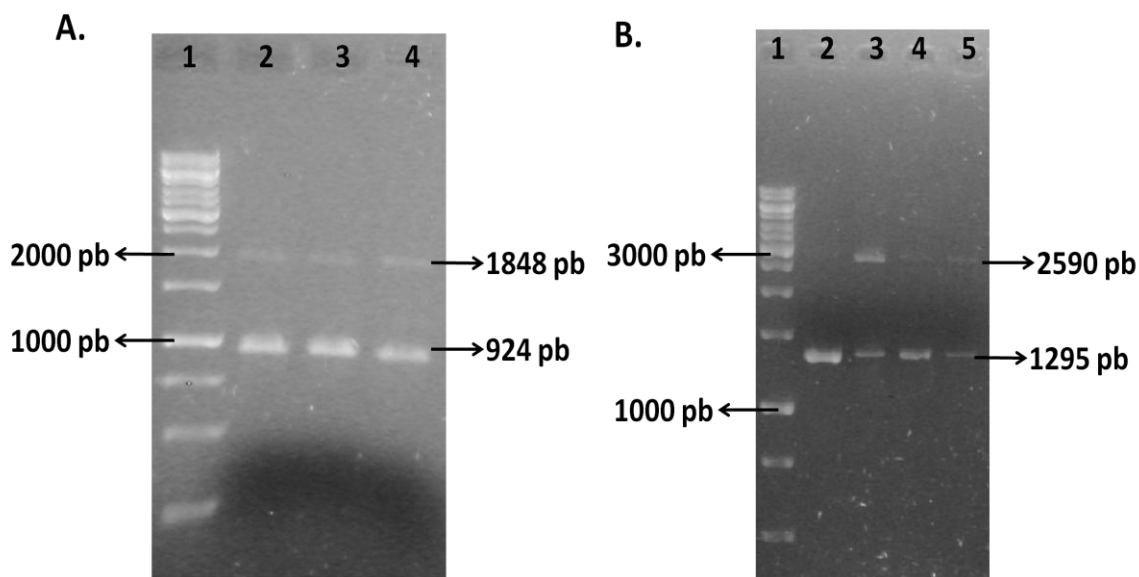
**Figura 16.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% del control de digestión y ligación del fragmento de *pknB*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb ADN Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Fragmento de *pknB* aislado; Carril 3: Fragmento de *pknB* digerido con *Nsi*I y ligado; Carril 4: Fragmento de *pknB* digerido con *Sma*I y ligado; Carril 5: Fragmento de *pknB* digerido con ambas enzimas y ligado.

Debido a la imposibilidad de obtener digestiones del producto de PCR de *pknB* con la enzima *Nsi*I, a pesar de variar en distintos aspectos las condiciones de digestión; se pensó que ese producto de PCR tenía un problema con dicho sitio de restricción. Por ese motivo, se diseñó un nuevo juego de cebadores tanto para el gen *pknA* como para *pknB*, utilizando dos sitios de restricción para un clonamiento dirigido. Las enzimas de restricción seleccionadas requieren las mismas condiciones de digestión.

También se diseñaron cebadores para el gen *pknA* ya que, a pesar de que la enzima funcionaba correctamente, el clonamiento no era dirigido y por lo tanto, hay que verificar la dirección de clonamiento.

Una vez diseñados los cebadores *pknAsmvF-pknAsmvR2* (Tabla V), los cuales amplifican un fragmento del gen *pknA* que contiene 924 pb, y los cebadores *pknBsmvF-pknBsmvR1* (Tabla V) para la amplificación del gen *pknB* (1295 pb), se procedió a realizar una PCR. Los productos se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Figura 11.B; 1.D), observando que el tamaño de los fragmentos era el esperado para ambos casos.

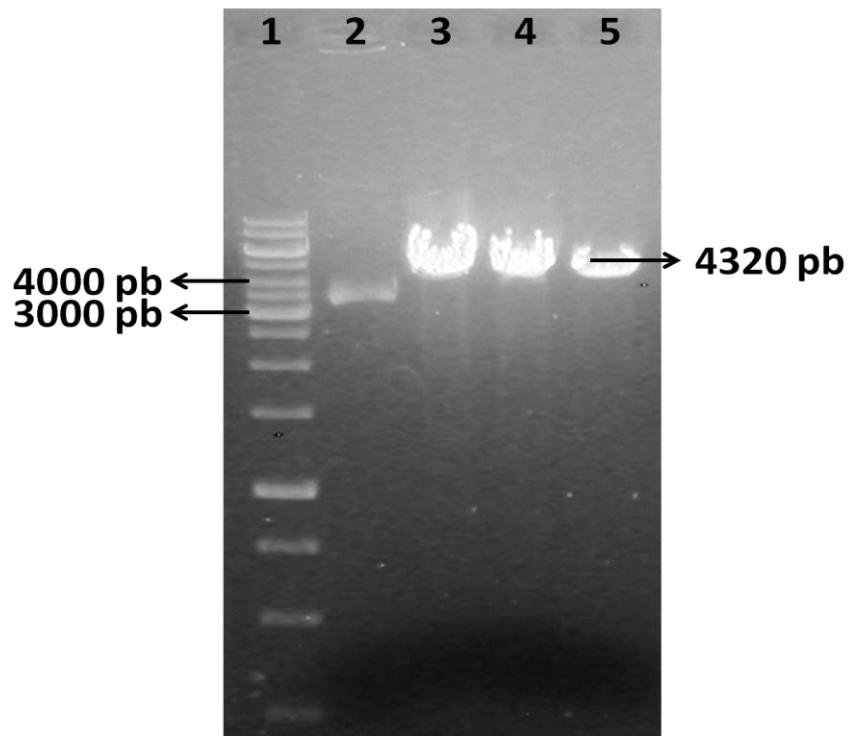
Seguidamente, los productos de PCR de *pknA* y *pknB* fueron digeridos con las enzimas *NsiI* y *XhoI*, realizando los controles para verificar la digestión y ligamiento de éstos productos. Los resultados obtenidos son que ambas enzimas funcionan correctamente para ambos productos de PCR ya que, se puede observar la formación de dímeros al digerir el producto de PCR con una solo enzima de restricción y posteriormente realizar el ligamiento (Figura 17).



**Figura 17.** Registro fotográfico de las electroforesis en gel de agarosa al 1% de los controles para verificar digestión y ligamiento de los productos de PCR de los genes *pknA* y *pknB* de *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155*. (A) Controles de digestión y ligamiento de los 2/3 del gen *pknA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: producto de *pknA* digerido con la enzima *NsiI* y ligado; Carril 3: producto de *pknA* digerido con la enzima *XhoI* y ligado; Carril 4: producto de *pknA* digerido con la enzima *NsiI/XhoI* y ligado (B) Controles de digestión y ligamiento de los 2/3 del gen *pknB*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: producto de *pknB*; Carril 3: producto de *pknB* digerido con la enzima *NsiI* y ligado; Carril 4: producto de *pknB* digerido con la enzima *XhoI* y ligado; Carril 5: producto de *pknB* digerido con la enzima *NsiI/XhoI* y ligado.

### 6.7.- Digestión del vector suicida pFRA50.

Se digirió el ADN del vector pFRA50 con las enzimas *Nsi* I y *Xho* I, las reacciones se visualizaron en un gel de agarosa al 0,8% (Figura 18). Los resultados indican que las enzimas cortaron al vector de forma adecuada, pues se observa de forma lineal y con el tamaño esperado (4320 pb).

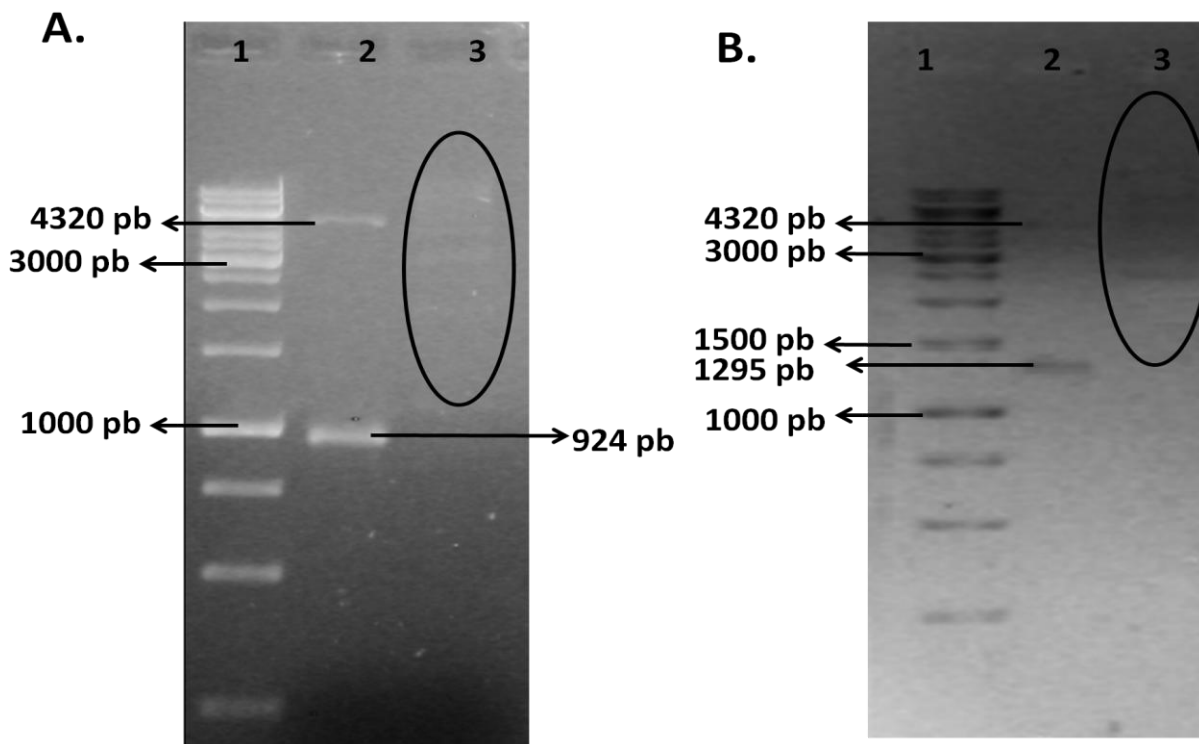


**Figura 18.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% de las digestiones realizadas al vector suicida pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: ADN de pFRA50; Carril 3: ADN de pFRA50 digerido con *Nsi* I; Carril 4: ADN de pFRA50 digerido con *Xho* I; Carril 5: ADN de pFRA50 digerido con *Nsi* I/*Xho* I.

### 6.8.- Clonamiento de los productos de PCR de *pknA* o *pknB* en el vector suicida pFRA50.

Una vez digeridos el vector pFRA50 y los productos de PCR con las mismas enzimas de restricción correspondientes, se procedió a realizar el clonamiento del vector PFRA50 con

el fragmento de *pknA* y el vector pFRA50 con el fragmento de *pknB*. Los controles de cada reacción de clonamiento dieron los resultados esperados al visualizarlos en un gel de agarosa al 1% (Figura 19), ya que, se observa que el volumen inicial que se colocó tanto de vector como de inserto antes de agregar la T4 ADN ligasa, desaparece al añadir ésta enzima observando en cambio, bandas de un tamaño mayor al del vector.



**Figura 19.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 1% de los controles del clonamiento de *pknA* en pFRA50 y de *pknB* en pFRA50. (A) Controles del clonamiento de *pknA* en pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: control antes de agregar la T4 ADN ligasa; Carril 3: control después de agregar la T4 ADN ligasa (B) Controles del clonamiento de *pknB* en pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: control antes de agregar la T4 ADN ligasa; Carril 3: control después de agregar la T4 ADN ligasa.

### 6.9.- Transformación del clonamiento de *pknA* o *pknB* en la cepa *E. coli* XL1-blue.

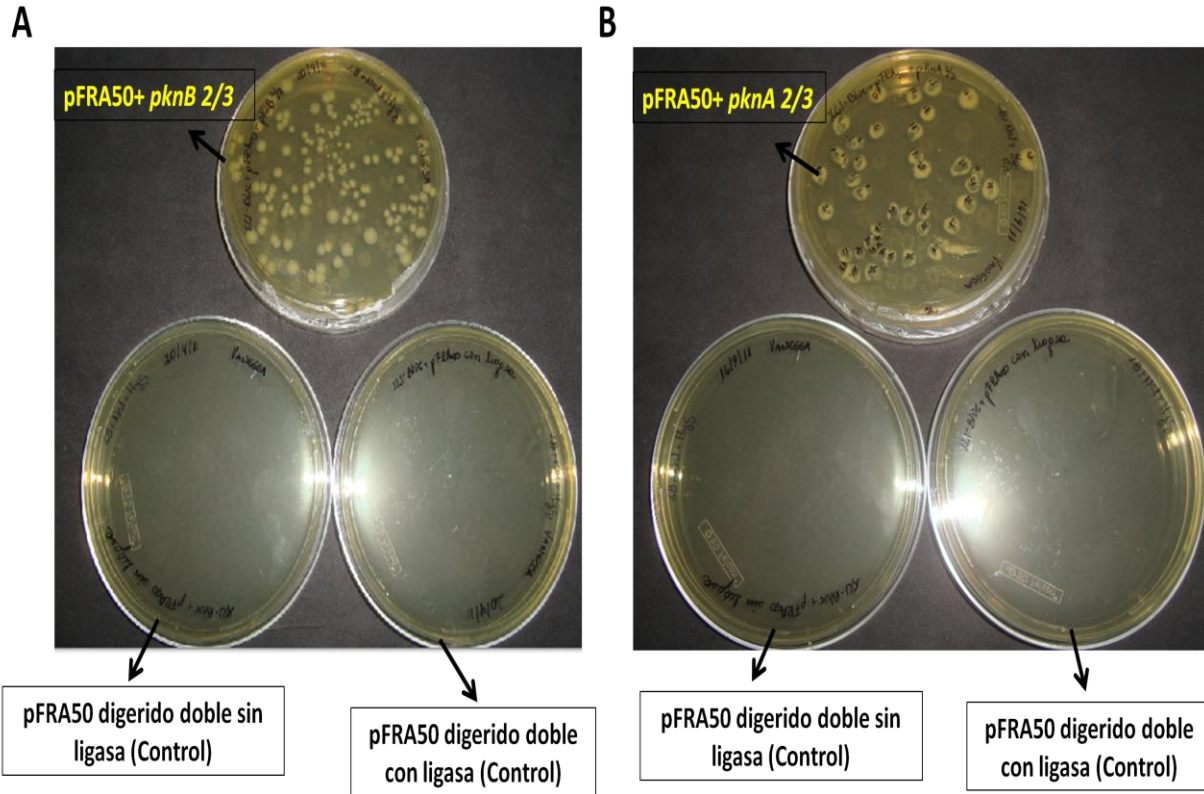
Para obtener el plásmido recombinante de la segunda parte del sistema, se realizó una transformación en células competentes de la cepa *E. coli* XL1-blue de las reacciones de ligamiento de *pknA* o *pknB* por choque térmico (Ver 5.2.9).

La selección de las transformantes se realizó en placas con medio sólido LB suplementado con Tetraciclina (25 µg/mL) e Higromicina (150 µg/mL) y se realizaron los controles de la transformación correspondientes. En la tabla VIII se pueden observar los resultados obtenidos de cada transformación.

**Tabla VIII.** Resultados de los controles de la transformación de las reacciones de ligamiento de *pknA* y *pknB* en las células competentes de *E. coli* XL1-blue.

Transformación en las células de <i>E. coli</i> XL1-blue	Control del vector pFRA50 digerido con dos enzimas de restricción sin ligasa	Control del vector pFRA50 digerido con dos enzimas de restricción con ligasa
Clonamiento de <i>pknA</i> con el vector pFRA50	0 colonias	0 colonias
Clonamiento de <i>pknB</i> con el vector pFRA50	0 colonias	0 colonias

De cada transformación se obtuvieron 46 colonias en el caso del clonamiento de *pknA* y 51 colonias del clonamiento de *pknB* (Figura 20).

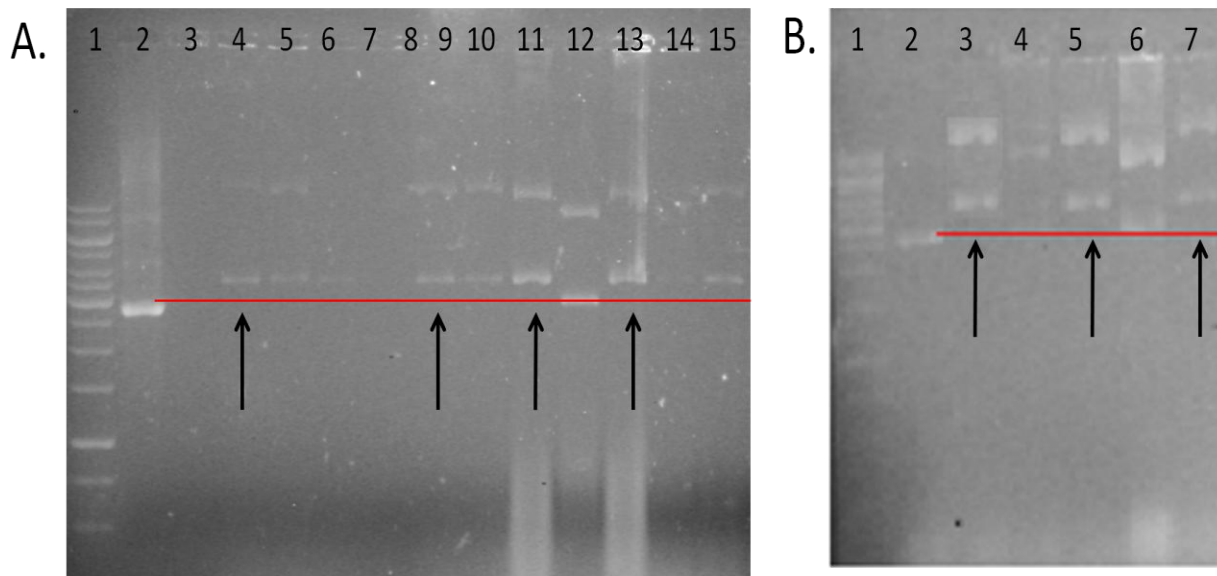


**Figura 20.** Fotografías de las placas obtenidas después de la transformaciones de clonamiento del vector pFRA50 con el fragmento de *pknA* y el vector pFRA50 con el fragmento de *pknB* en células competentes de *E. coli* XL1-blue. (A) Transformación del clonamiento del vector pFRA50 con el fragmento de *pknB* y sus respectivos controles en células competentes de *E. coli* XL1-blue. (B) Transformación del clonamiento del vector pFRA50 con el fragmento de *pknA* y sus respectivos controles en células competentes de *E. coli* XL1-blue.

### 6.10.- Aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de pFRA50 con el fragmento de *pknA* y las transformantes de pFRA50 con el fragmento de *pknB*.

Las colonias transformantes fueron crecidas en medio líquido LB para aislar el ADN plasmídico recombinante por ebullición (Ver 6.2.3). Éste ADN se visualizó en un gel de agarosa 0,8% (Figura 21) con el fin de observar la concentración aproximada del mismo y si había alguna diferencia en el patrón de migración de ADN control (pFRA50) y el ADN de las transformantes. De las colonias cuyos patrones de migración resultaron diferentes al del control (Flechas negras), se seleccionaron 4 (30, 35, 37 y 39) para el caso de *pknA* y 3 (31, 33, 35) en el caso de *pknB*.





Leyenda: ↑ colonias seleccionadas que mostraron diferencia con el patrón de migración del control.

**Figura 21.** Registro fotográfico de la electroforesis en gel de agarosa al 0,8% del aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de *pknA* en pFRA50 y de las transformantes de *pknB* en pFRA50. (A) Aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de *pknA* en pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciencs); Carril 2: ADN de pFRA50 (control); Carril 4: ADN de la colonia 30; Carril 9: ADN de la colonia 35; Carril 11: ADN de la colonia 37; Carril 13: ADN de la colonia 39. (B) Aislamiento de ADN plasmídico de las transformantes de *pknB* en pFRA50. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciencs); Carril 2: ADN de pFRA50 (control); Carril 3: ADN de la colonia 31; Carril 5: ADN de la colonia 33; Carril 7: ADN de la colonia 35.

### 6.11.- Selección de las posibles colonias recombinantes.

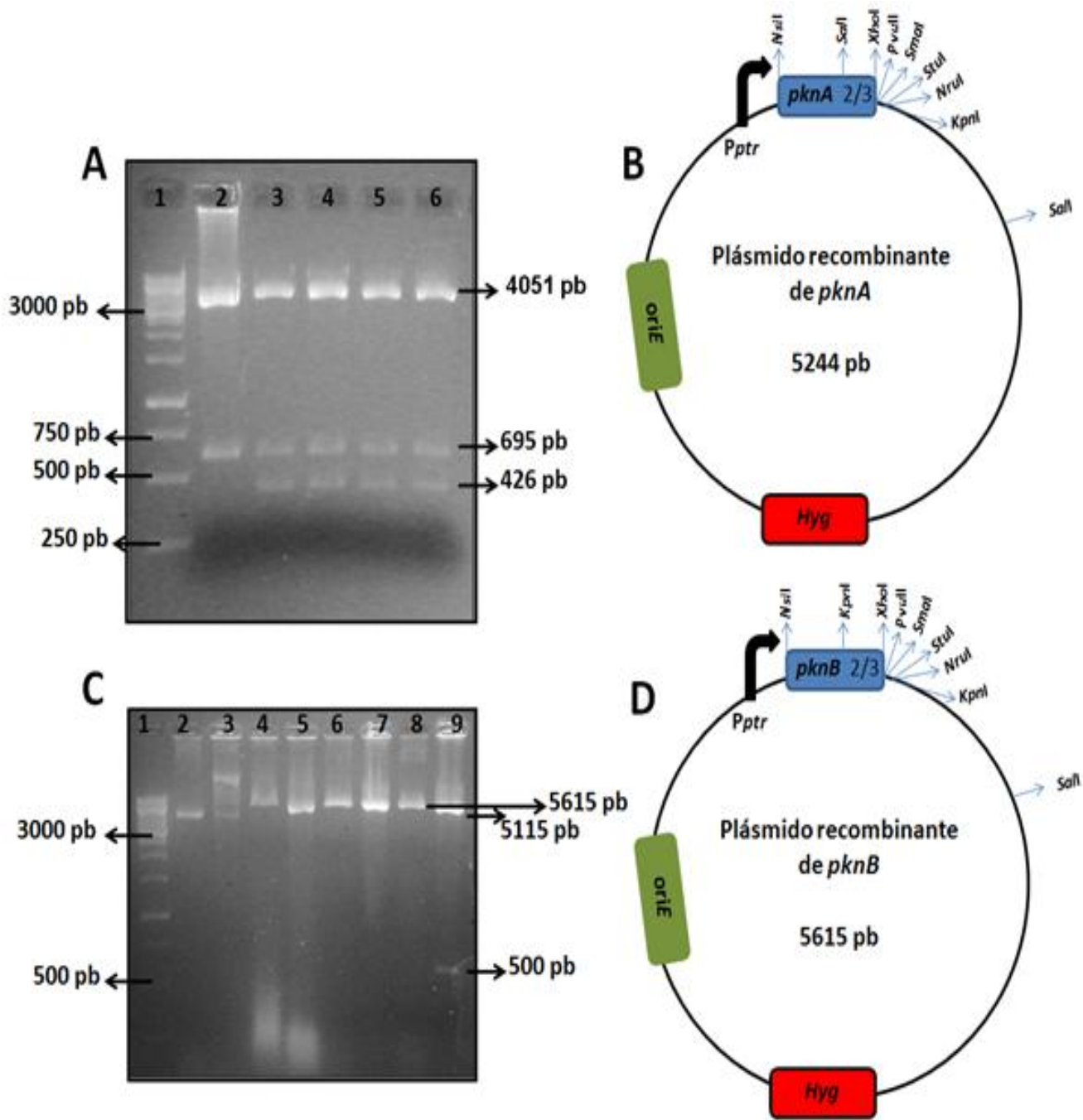
El ADN plasmídico presuntamente recombinante fue digerido con las enzimas de restricción *XhoI/SalI*, para el caso de las transformantes de *pknA*; y las enzimas *SmaI* y *KpnI*, para las transformantes de *pknB*. Las digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Figura 22).

El plásmido recombinante que contiene los 2/3 del gen *pknA* digerido con las enzimas de restricción *XhoI/SalI* debe producir tres fragmentos de 426, 695 y 4051 pb al digerirlo con las enzimas (Tabla IX), mientras que para el caso del plásmido recombinante de *pknB*, la

enzima *Sma*I lineariza al plásmido indicando el tamaño molecular. Al digerir con la enzima *Kpn*I deberían observarse dos fragmentos, uno de 500 pb y otro de 5115 pb (Tabla IX).

**Tabla IX.** Ensayo de restricción de los plásmidos recombinantes de *pknA* o *pknB*.

Plásmido	Enzima utilizada	Número de sitios de restricción	Fragmentos generados
Plásmido recombinante de <i>pknA</i>	<i>Xho</i> I/ <i>Sa</i> I	1 sitio para <i>Xho</i> I 2 sitios para <i>Sa</i> I	3 fragmentos (426, 695 y 4051 pb)
Plásmido recombinante de <i>pknB</i>	<i>Sma</i> I <i>Kpn</i> I	1 sitio 2 sitios	1 fragmento (5615 pb) 2 fragmentos (500 y 5115 pb)

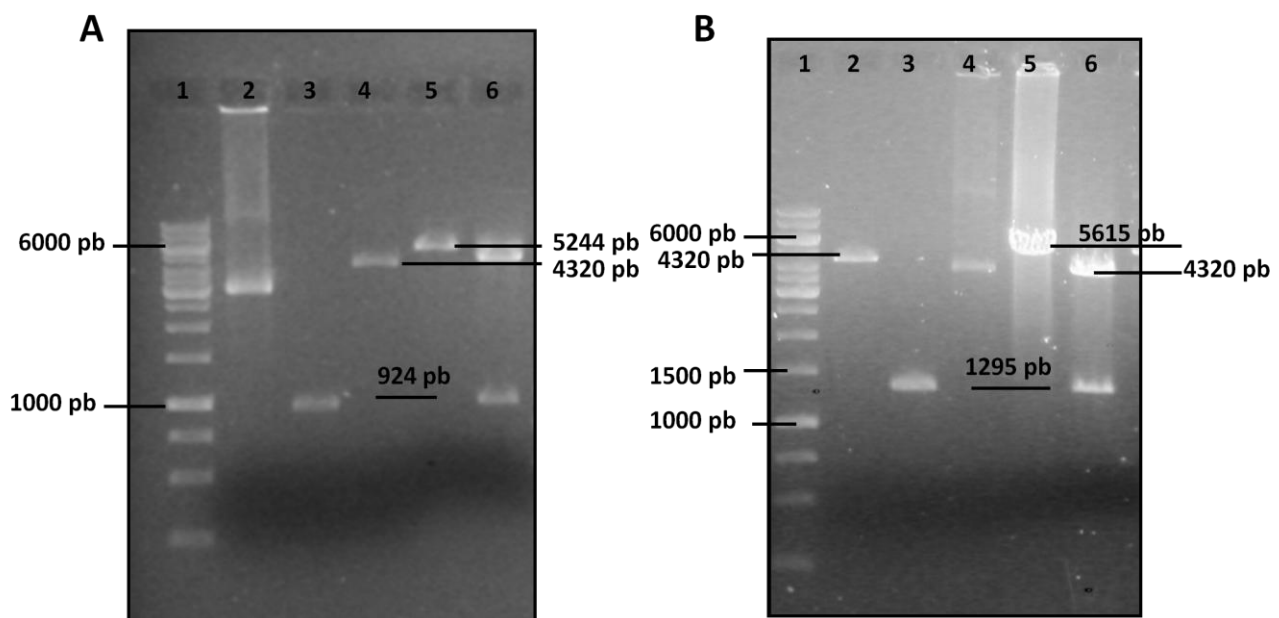


**Figura 22.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% del ensayo de restricción realizado al ADN de las colonias transformantes de *pknA* o *pknB*. (A) Ensayo de restricción a las transformantes del clonamiento de *pknA*. Carril 1: Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: pFRA50 digerido con *XhoI/SalI* (Control); Carril 3: Colonia 19 digerida con *XhoI/SalI*; Carril 4: Colonia 26 digerida con *XhoI/SalI*; Carril 5: Colonia 37 digerida con *XhoI/SalI*; Carril 6: Colonia 39 digerida con *XhoI/SalI*. (B) Representación esquemática del plásmido recombinante de *pknA*. (C) Ensayo de restricción a las transformantes del clonamiento de *pknB*. Carril 1: Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: pFRA50 digerido con *SmaI*; Carril 3: pFRA50 digerido con *KpnI*; Carril 4: Colonia 30 digerido con *SmaI*; Carril 5: Colonia 30 digerido con *KpnI*; Carril 6: Colonia 33 digerido con *SmaI*; Carril 7: Colonia 33 digerido con *KpnI*; Carril 8: Colonia 35 digerido con *SmaI*; Carril 9: Colonia 35 digerido con *KpnI*. (D) Representación esquemática del plásmido recombinante de *pknB*.

Como se observa en la figura 22.A las cuatro colonias escogidas tienen el plásmido recombinante que contiene los 2/3 del gen *pknA*, por lo tanto, se escogió a la colonia 37 para las pruebas de verificación siguientes. En el caso de *pknB*, sólo la colonia 35 mostró el patrón de bandas esperado (Figura 22.C).

### 6.12.- Verificación de los plásmidos recombinantes.

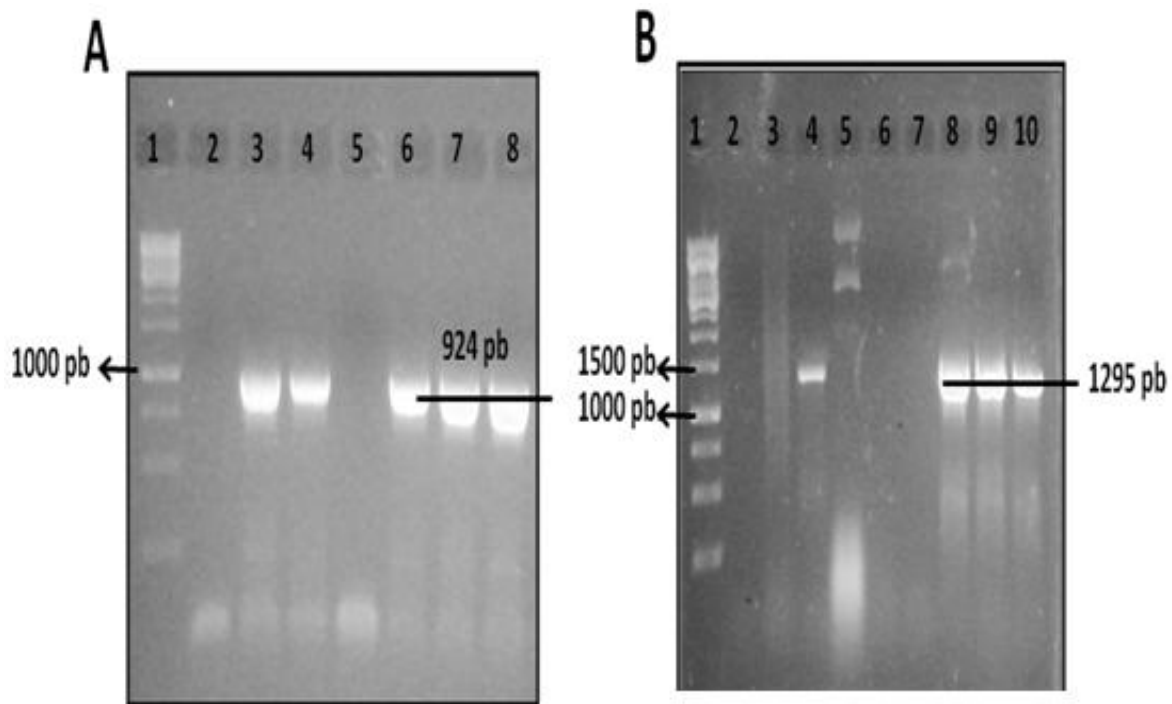
Para corroborar que el fragmento clonado en el plásmido pFRA50 sea el fragmento de interés, se aisló nuevamente el ADN plasmídico de las colonias escogidas (Ver 5.2.2) y se les realizó una digestión con las enzimas de restricción utilizadas para realizar el clonamiento (*NsiI/XhoI*). Las digestiones se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Figura 23).



**Figura 23.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% del ensayo de restricción realizado al ADN de los plásmidos recombinantes de *pknA* o *pknB*. (A) Ensayo de restricción realizado al plásmido recombinante de *pknA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). Carril 2: Carril 2: pFRA50 aislado; Carril 3: *pknA* 2/3 purificado; Carril 4: pFRA50 digerido con *XhoI*; Carril 5: Plásmido recombinante de *pknA* digerido con *XhoI*; Carril 6: Plásmido recombinante de *pknA* digerido con *NsiI/XhoI*. (B) Ensayo de restricción realizado al plásmido recombinante de *pknB*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). Carril 2: pFRA50 digerido con *SmaI*; Carril 3: *pknB* 2/3 purificado; Carril 4: Plásmido recombinante de *pknB* aislado; Carril 5: Plásmido recombinante de *pknB* digerido con *SmaI*; Carril 6: Plásmido recombinante de *pknB* digerido con *NsiI/XhoI*.

Como se puede observar en la figura 23, ambos plásmidos portaban un fragmento equivalente al clonado originalmente, por lo tanto, sólo queda verificar la obtención de ambos plásmidos recombinantes por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y por secuenciación.

Para la realización de la PCR, se utilizó como templado el ADN plasmídico recombinante, los cebadores y las condiciones fueron las mismas a las utilizadas para la amplificación del fragmento de los 2/3 de cada gen, estas reacciones se visualizaron en geles de agarosa al 1% (Figura 24).



**Figura 24.** Registro fotográfico de la electroforesis en geles de agarosa al 1% de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para comprobar la obtención de los plásmidos recombinantes de *pknA* y *pknB*. (A) PCR para comprobar la obtención del plásmido recombinante de *pknA*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences); Carril 2: Control negativo; Carril 3: *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155* diluido 1/10; Carril 4: *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155* diluido 1/100; Carril 5: pFRA50 diluido 1/50; Carril 6: Plásmido recombinante de *pknA* diluido 1/50; Carril 7: Plásmido recombinante de *pknA* diluido 1/20; Carril 8: Plásmido recombinante de *pknA* diluido 1/10. (B) PCR para comprobar la obtención del plásmido recombinante de *pknB*. Carril 1: Marcador de Peso Molecular 1 Kb DNA Ladder (Fermentas Life Sciences). Carril 2: Control negativo; Carril 3: *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155* diluido 1/10; Carril 4: *M. smegmatis mc<sup>2</sup>155* 1/100; Carril 5: pFRA50 sin diluir; Carril 6: pFRA50 diluido 1/50; Carril 7: pFRA50 diluido 1/20; Carril 8: Plásmido recombinante de *pknB* sin diluir; Carril 9: Plásmido recombinante de *pknB* diluido 1/50; Carril 10: Plásmido recombinante de *pknB* diluido 1/20.

En la figura 24, se observó que ambas reacciones amplificaron el fragmento equivalente a los dos tercios del gen de interés, por lo que se lograron obtener los plásmidos recombinantes de *pknA* y de *pknB*. Los amplificadores de estas reacciones de PCR fueron purificados del gel empleando el estuche comercial QIAquick<sup>®</sup> gel Extraction kit (Qiagen) y fueron secuenciados. Una vez analizadas las secuencias, se corroboró la inserción correcta del fragmento y se observó la homología de secuencias entre los fragmentos provenientes de los plásmidos recombinantes y la secuencia original de los genes.

A partir de este momento, fueron nombrados pVknA37 para el plásmido recombinante del gen *pknA* y pVknB35 para el plásmido recombinante del gen *pknB*.

### **6.13.- Electroporación de los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35 en la cepa MS83.**

Una vez que se han obtenido las dos partes del sistema, es necesaria la transformación de los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35 en la cepa MS83 para obtener el sistema completo. El plásmido por ser suicida se integraría por un evento de recombinación homóloga al cromosoma bacteriano y la cepa sería resistente a Higromicina.

Se realizó un primer ensayo de electroporación con las condiciones utilizadas por Boldrin y colaboradores en el año 2010 para construir el sistema, es decir, se añadieron 2 µg de ADN de cada uno de los plásmidos recombinantes, pero se obtuvieron muy pocas transformantes.

Como la frecuencia de recombinación homóloga suele ser sumamente baja en micobacterias, se decidió emplear condiciones que favorecieran dicho proceso como son: partir de un cultivo con mayor volumen, realizar un previo tratamiento previo al ADN a

transformar y utilizar una concentración elevada de ADN (1-10 µg). Se realizaron otros dos ensayos de electroporación para cada gen utilizando esas condiciones.

Se realizó un segundo ensayo, donde se utilizó una alta concentración de ADN (5 µg) el cual antes de transformar, fue desnaturalizado con álcali (Hinds y col., 1999). En el tercer ensayo, se utilizó 1 µg de ADN desnaturalizado con álcali, dicha cantidad fue la que utilizó Hinds y colaboradores en el año 1999 para llevar a cabo sus ensayos de recombinación. La preparación de las células electrocompetentes se realizó partiendo de un cultivo de 100 mL (Parish y col., 1999) para estos dos ensayos.

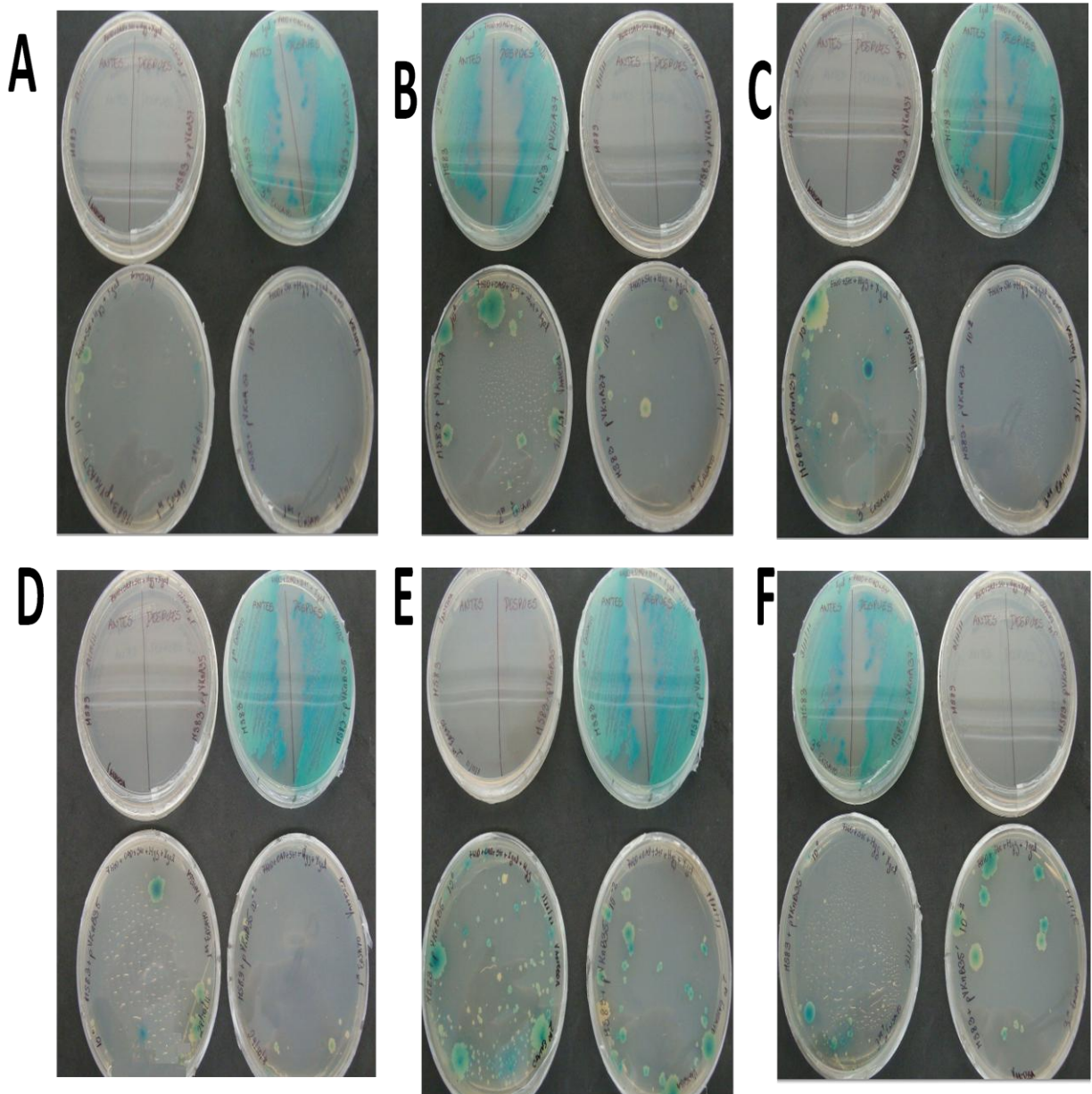
La selección de las transformantes se realizó en placas con medio sólido 7H10 suplementado con Estreptomicina (25 µg/mL), Higromicina (50 µg/mL) y el cromóforo X-gal (40 µg/mL). Como controles de la electroporación para cada ensayo se utilizaron: MS83 sin transformar y transformada con los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35 y se sembraron en placas de 7H10 con y sin Higromicina, con el fin de verificar la sensibilidad a Hig y la viabilidad luego del choque eléctrico. Los fenotipos fueron los esperados (Tabla X).

**Tabla X.** Fenotipos obtenidos después de la electroporación de los plásmidos recombinantes pVknA37 o pVknB35 en las cepas MS83 para los tres ensayos.

<b>Medio de cultivo</b>	<b>MS83</b>	<b>MS83 con el plásmido recombinante pVknA37</b>	<b>MS83 con el plásmido recombinante pVknB35</b>
<b>7H10 con Estreptomicina</b>	<b>+</b>	<b>+</b>	<b>+</b>
<b>7H10 con Estreptomicina e Higromicina</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>+</b>

Leyenda: **+** presencia de crecimiento; **-** ausencia de crecimiento.

Las colonias que crecieron (Figura 25) fueron de color azul, indicándonos que la primera parte del sistema está funcionando correctamente, y resistentes a Higromicina (Casete de resistencia de pVknA37 o pVknB35).



**Figura 25.** Fotografía de las placas obtenidas de los ensayos de electroporación de MS83 con los plásmidos recombinantes pVknA37 y pVknB35. (A) Primer ensayo de electroporación de MS83 con pVknA37. (B) Segundo ensayo de electroporación de MS83 con pVknA37. (C) Tercer ensayo de electroporación de MS83 con pVknA37. (D) Primer ensayo de electroporación de MS83 con pVknB35. (E) Segundo ensayo de electroporación de MS83 con pVknB35. (F) Tercer ensayo de electroporación de MS83 con pVknB35.



De los ensayos de electroporación realizados para cada gen, se obtuvieron más transformantes en el segundo ensayo de electroporación (Tabla XI), indicando que, efectivamente, esas condiciones si aumentan la tasa de recombinación.

**Tabla XI.** Número de transformantes obtenidas en cada ensayo de electroporación para cada plásmido transformado.

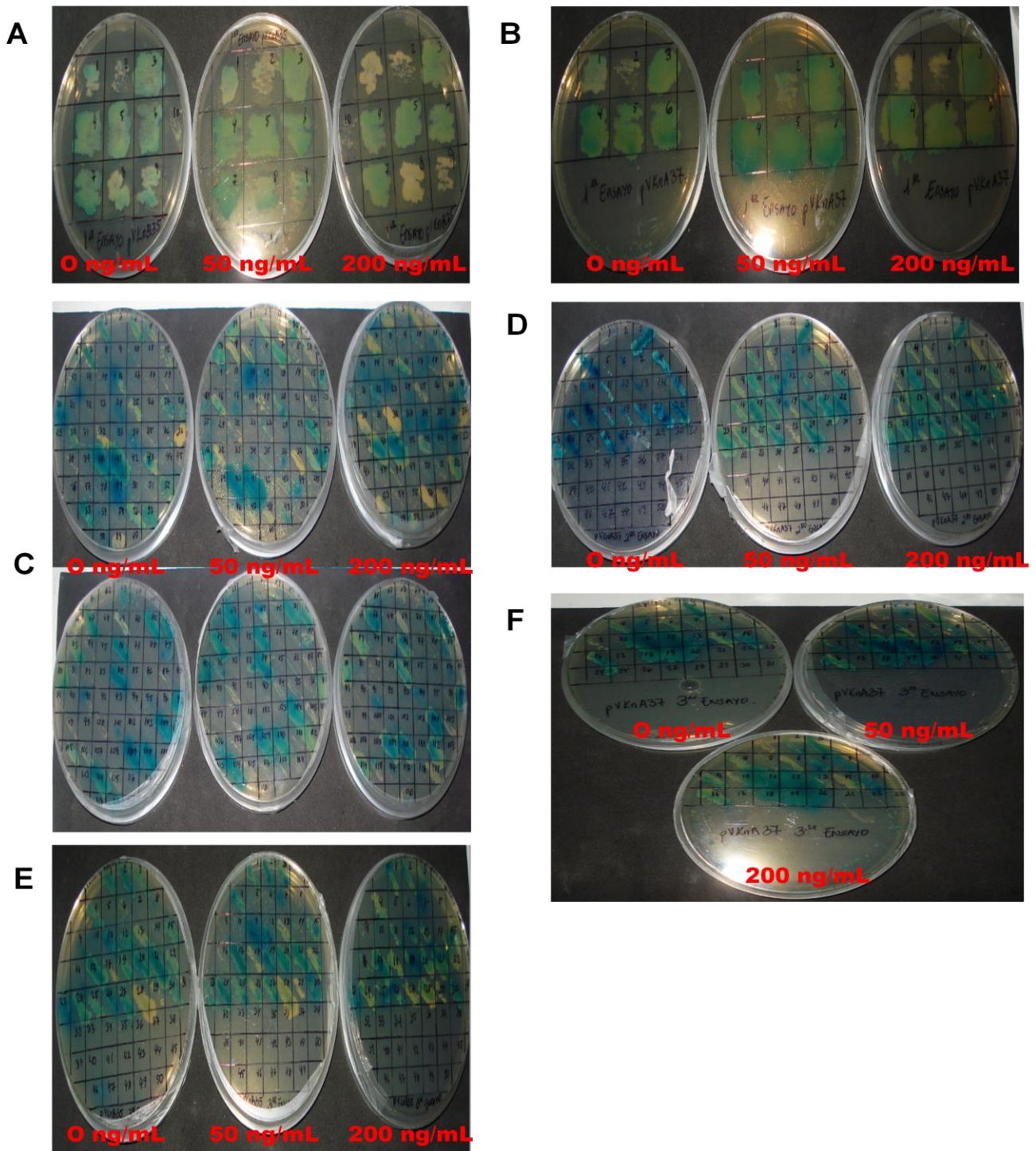
<b>Plásmido transformado</b>	<b>Primer ensayo de electroporación</b>	<b>Segundo ensayo de electroporación</b>	<b>Tercer ensayo de electroporación</b>
<b>pVknA37</b>	6 colonias	27 colonias	16 colonias
<b>pVknB35</b>	10 colonias	127 colonias	30 colonias

En total se obtuvieron 55 transformantes para el gen *pknA* y 167 para el gen *pknB*. Las transformantes fueron crecidas en medio líquido 7H9 suplementado con Estreptomicina e Higromicina, para poder realizar el ensayo con diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina.

#### **6.14.- Evaluación de las transformantes de MS83 con los plásmidos recombinantes a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc).**

El ensayo a diferentes concentraciones de ATc permite evaluar el sistema completo y garantizar que la recombinación homóloga ocurrió correctamente, observando si se obtuvo la cepa condicional para cada gen. En dicho ensayo, debería observarse una disminución en la coloración azul de las colonias y en el tamaño de las mismas a medida que aumenta la concentración de ATc.

Las colonias transformantes crecidas en medio líquido, fueron sembradas en placas de medio sólido 7H10 suplementadas con Estreptomicina, Higromicina, X-gal y diferentes concentraciones de ATc (0, 50 y 200 ng/mL). Se incubaron a 37 °C durante 4 días (Figura 26).



**Figura 26.** Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*. (A) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del primer ensayo de electroporación para *pknB*. (B) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del primer ensayo de electroporación para *pknA*. (C) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del segundo ensayo de electroporación para *pknB*. (D) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del segundo ensayo de electroporación para *pknA*. (E) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del tercer ensayo de electroporación para *pknB*. (F) Primer ensayo de ATc realizado a las colonias obtenidas del tercer ensayo de electroporación para *pknA*.

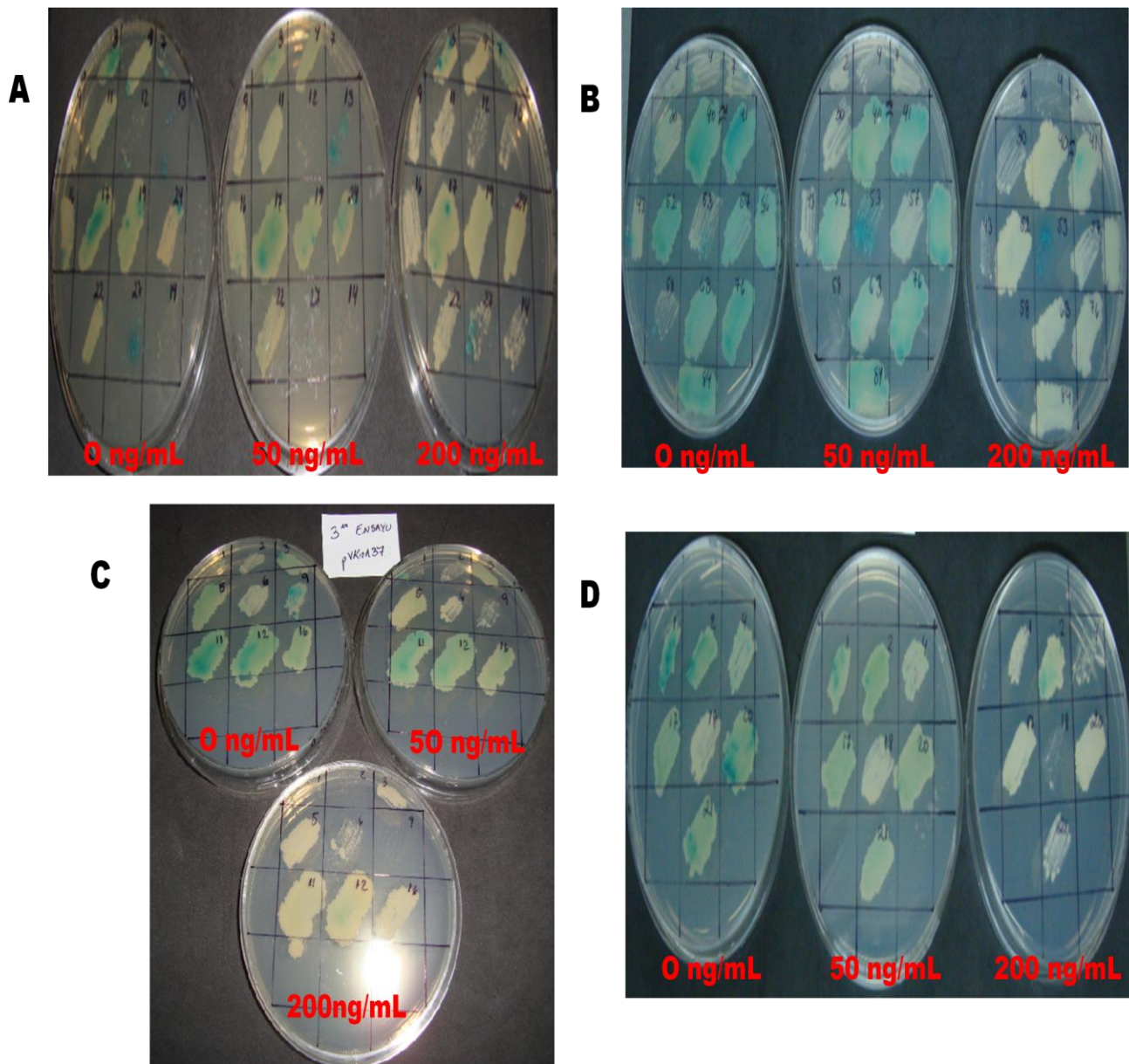
Con este ensayo, se pudo observar que algunas colonias de los diferentes ensayos de electroporación no crecieron en ninguna de las concentraciones de anhidrotetraciclina y que en algunas de ellas, no había una disminución en la coloración azul a medida que aumenta la concentración del inductor ATc, por lo tanto, la primera parte del sistema no estaba funcionando correctamente en estas colonias.

Debido a los resultados obtenidos, se decidió tomar colonias donde se observó la correcta represión del gen *lacZ* en presencia de ATc y parecía haber disminuido el crecimiento de las mismas. En el caso del primer ensayo no se escogió ninguna colonia ya que, se observó un crecimiento uniforme de las colonias en todas las concentraciones de ATc.

Las colonias escogidas (Tabla XII) fueron sometidas nuevamente al ensayo con diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina, partiendo del segundo repique en medio líquido (Figura 27). Estas colonias fueron crecidas nuevamente en medio líquido para obtener así varios subcultivos.

**Tabla XII.** Colonias escogidas de cada ensayo de electroporación que fueron sometidas a un segundo ensayo de ATc.

<b>Plásmido transformado</b>	<b>Primer ensayo de electroporación</b>	<b>Segundo ensayo de electroporación</b>	<b>Tercer ensayo de electroporación</b>
<b>pVknA37</b>	Ninguna	14 colonias (3,4,7,9,11,12,13,14, 16,17,19,22,24 y 27)	9 colonias (1,2,3,5,6,9,11,12,16)
<b>pVknB35</b>	Ninguna	20 colonias (2,4,7,30,40,41,43,52,53,56,57,58 ,63,76,84,97,112,114,119 y 120)	7 colonias (1,2,4,17,18,20,21)



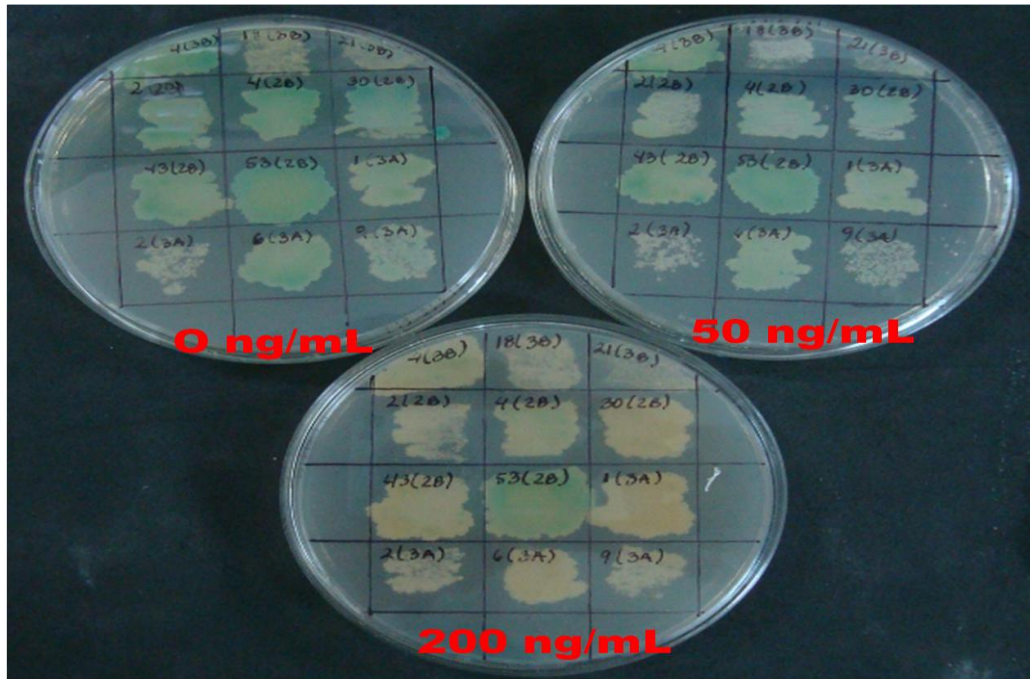
**Figura 27.** Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*. (A) Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas del segundo ensayo de electroporación para *pknA*. (B) Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas del segundo ensayo de electroporación para *pknB*. (C) Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas del tercer ensayo de electroporación para *pknA*. (D) Segundo ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas del tercer ensayo de electroporación para *pknB*.

En la figura 27, se muestra que solamente 12 colonias de las sometidas al segundo ensayo de ATc entre los dos genes, parecían mostrar una posible disminución en su crecimiento (aunque muy pequeña), lo cual puede ser producto de haber inoculado menos

células o porque efectivamente contienen el sistema completo y correcto. Por lo tanto, se sometieron estas 12 colonias (Tabla XIII) nuevamente a un tercer ensayo de ATc (Figura 28). Partiendo del último subcultivo en fase estacionaria ( $DO_{600nm}$  de 2,0), se colocó la misma cantidad de inóculo (2  $\mu$ L) en cada concentración de ATc.

**Tabla XIII.** Colonias escogidas de cada ensayo de electroporación que fueron sometidas a un tercer ensayo de ATc.

<b>Plásmido transformado</b>	<b>Segundo ensayo de electroporación</b>	<b>Tercer ensayo de electroporación</b>
<b>pVknA37</b>	Ninguna	4 colonias (1,2,6,9)
<b>pVknB35</b>	5 colonias (2,4,30,43,53)	3 colonias (4,18,21)



**Figura 28.** Tercer ensayo de ATc realizado a las colonias escogidas de cada ensayo de electroporación para *pknA* o *pknB*.

Se observó que ninguna de las colonias mostró una diferencia en el crecimiento al someterlas a diferentes concentraciones de ATc.

## **7.- Discusión de resultados**

La tuberculosis (TB) es una enfermedad causada por una bacteria patógena intracelular, *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), la cual provoca más de 1,7 millones de muertes al año a nivel mundial. Las estrategias utilizadas para controlar esta enfermedad no están siendo efectivas debido a la selección de cepas resistentes a los fármacos administrados durante el tratamiento, principalmente en las zonas donde la incidencia de la tuberculosis es alta (Chopra, 2003). Por esta razón existe la necesidad urgente de encontrar nuevos blancos terapéuticos, que permitan diseñar drogas que controlen la enfermedad (Ginsberg y col., 2007).

En este sentido, un candidato fuerte como blanco terapéutico son las Proteínas Serina/Treonina Quinasas (STPQs), que juegan un papel importante en distintos procesos fisiológicos y de virulencia de MTB a través de la transducción de señales. Otra característica importante es que poseen una baja identidad de secuencia con las enzimas de eucariotas (menos del 30%) (Székely y col., 2008). El genoma de *Mycobacterium tuberculosis* tiene once genes que codifican para STPQs, denominadas desde *pknA* hasta *pknL*. De ellos, los genes *pknA* y *pknB* pertenecen a un mismo operón, cuya organización y secuencia se encuentra altamente conservada en actinobacterias y se ubica cerca del origen de replicación cromosomal (Wehenkel y col., 2008). El operón está conformado por 5 genes cuya función está relacionada con la división y crecimiento celular (Av Gay y col., 1999). La transcripción de los genes *pknA* y *pknB* incrementa durante la fase exponencial del crecimiento, mientras que la sobreexpresión de estas STPQs disminuye el crecimiento y altera la morfología de las micobacterias (Kang y col., 2005). Lo anterior sugiere, la participación de estas proteínas en la



síntesis de la pared celular y el proceso de división celular (Singh y col., 2006; Wehenkel y col., 2008)

Sasseti y colaboradores en el año 2003, demostraron que los genes que codifican para las STPQs PknA y PknB son esenciales para la supervivencia de esta bacteria. Por todas las evidencias antes descritas, estos genes son considerados unos excelentes blancos terapéuticos. Es por este motivo que, diversos grupos de investigación están buscando de más información de estas STPQs, ya que se conoce poco acerca de los eventos de fosforilación y desfosforilación de estas proteínas y sólo algunos de los sustratos de las mismas (Young y col., 2003). Todo lo descrito anteriormente ha sido impulsado por el deseo de diseñar drogas que inhiban la proteína y así impedir el desarrollo del proceso patogénico de esta bacteria en el hospedador infectado.

El estudio de estos genes se ve dificultado por el carácter esencial de los mismos, ya que, su delección o mutación genera una condición de letalidad para la bacteria. Para su estudio se tienen que implementar sistemas de expresión condicional que nos permitan controlar de manera selectiva la expresión de genes esenciales del organismo (DeVito y col., 2002; Mnaimneh y col., 2004). En este sentido, debido a la importancia del estudio de los genes *pknA* y *pknB*, en este trabajo se planteó la construcción de una cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 que exprese condicionalmente al gen *pknA* y otra cepa que exprese condicionalmente al gen *pknB*, implementando el sistema de expresión condicional desarrollado por Boldrin y colaboradores en el año 2010.

Las cepas fueron construidas empleando como modelo de estudio *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 ya que, las STPQs PknA y PknB muestran una alta homología con respecto a las

STPQs de *Mycobacterium tuberculosis* (Gopaldaswamy y col., 2008). Además, *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 es una bacteria no patógena, es de crecimiento rápido y ha adquirido un fenotipo de eficiencia de transformación de plásmidos (Snapper y col., 1990).

Los sistemas de expresión condicional desarrollados hasta la fecha, presentaban ciertas limitaciones como: dependencia de temperatura, no funcionan para micobacterias de crecimiento lento, no pueden realizarse experimentos *in vivo*, no reprimen eficientemente la transcripción y, para el estudio de genes esenciales, es sumamente importante que no haya una expresión basal. El sistema implementado utiliza dos represores cromosomales (TetR y Pip) que garantizarían la represión total de los genes en estudio, permitiendo reprimir al gen paulatinamente observando el efecto, la expresión basal es sumamente baja, el sistema puede ser utilizado tanto en micobacterias de crecimiento rápido como de crecimiento lento y puede ser utilizado en experimentos *in vivo* (Boldrin y col., 2010). Este sistema funciona agregando concentraciones subinhibitorias mínimas de anhidrotetraciclina (ATc), que actúa en este sistema como el inductor. La ATc es un derivado menos tóxico de la tetraciclina y a bajas concentraciones no es letal para la bacteria.

Boldrin y colaboradores en el año 2010, demostraron su sistema a través de la construcción de una mutante condicional de *Mycobacterium smegmatis* mc<sup>2</sup>155 para *ftsZ*, el cual es un gen esencial involucrado en la división celular (Ehrt y col., 2005); y una mutante condicional de *M. tuberculosis* H37Rv para el operón *fadD32*, involucrado en la biosíntesis de ácidos micólicos, previamente demostrados que eran esenciales para la micobacteria (Portevin y col., 2005; Forti y col., 2009). Al someter estas cepas a concentraciones de anhidrotetraciclina de 50 ng/mL no hubo crecimiento confirmando la represión completa de estos genes. Con estos experimentos demostraron que el sistema funciona tanto para

micobacterias de crecimiento rápido como de crecimiento lento y que es totalmente funcional para estudiar genes esenciales.

La implementación de este sistema se divide en dos partes: la primera, requiere la obtención de una cepa de *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con el plásmido pFRA42A y pFRA42B integrado al genoma. La segunda, requiere la construcción de un plásmido recombinante derivado de pFRA50 en el cual se clone un fragmento equivalente a los 2/3 del gen de interés. Al transformar el plásmido recombinante en la cepa obtenida en la primera parte, que por un único evento de recombinación homóloga, ese favorece la integración del plásmido en el cromosoma quedando el gen de interés bajo el control del promotor dependiente de Pip.

Al obtener la primera parte del sistema, a nivel cromosómico se tiene lo siguiente: en presencia del inductor ATc, el gen *tetR* se transcribe a partir de un promotor constitutivo produciendo al represor de tetraciclina (TetR), el cual se une a la anhidrotetraciclina (derivado de la tetraciclina pero menos tóxico) permitiendo que el gen *pip* se exprese a partir del promotor fuerte  $P_{furA102tetO}$  produciendo al represor Pip, que se unirá al promotor dependiente de Pip ( $P_{ptr}$ ) reprimiendo la expresión del gen *lacZ*. En este caso, el gen reportero *lacZ* nos sirve como un control interno ya que, este gen codifica la enzima  $\beta$ -galactosidasa, la cual cataliza la ruptura del X-gal, que al ser hidrolizado, produce un compuesto (indoxil) que en contacto con el aire se transforma en índigo insoluble, con coloración azul intenso. Por lo tanto, la intensidad del color azul será proporcional a la cantidad de enzima que se esté expresando.

La primera parte del sistema aplicado al caso considerado en este trabajo, se logró obteniendo las cepas MS82 (*M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con pFRA42A integrado) y MS83 (*M.*

*smegmatis* mc<sup>2</sup>155 con pFRA42B integrado). A dichas cepas se les realizó un ensayo a diferentes concentraciones de anhidrotetraciclina (ATc), y el resultado fue que a medida que aumentaba la concentración de anhidrotetraciclina, la represión del gen *lacZ* era mayor, observando una disminución en la coloración azul de las colonias hasta la concentración máxima de 50 ng/mL de ATc donde, se observó la represión completa del gen *lacZ* (control interno), ya que las colonias eran totalmente blancas. Durante la realización de este ensayo, se observó que la cepa MS83 era más eficiente que MS82 en la represión del gen *lacZ* cuando se sometía a la presencia de ATc. Una posible explicación es la diferencia en la orientación del gen *tetR* (Figura 4). Los autores del sistema proponen que al encontrarse en el vector pFRA42A el gen *tetR* en el mismo sentido del gen *pip*, la transcripción de TetR pudiese estar interfiriendo con la transcripción de Pip. Por este motivo la cepa MS83 fue utilizada en el resto de los experimentos.

En la segunda parte del sistema, se obtuvieron los plásmidos recombinantes de *pknA* (pVknA37) y el de *pknB* (pVknB35) por medio del clonamiento dirigido de las 2/3 de los genes en el vector pFRA50. Este valor de pares de bases es el recomendado por Boldrin y colaboradores, como la cantidad mínima requerida para que haya un evento de recombinación homóloga con el gen silvestre. El clonamiento de dichos genes en el vector respectivo, se verificó por análisis de restricción, PCR y secuenciación.

Es importante mencionar, que este punto es crítico para la obtención de la cepa condicional, ya que, si el fragmento no está en la dirección correcta o no tiene la secuencia deseada, el proceso de recombinación no ocurrirá.

Una vez lograda la obtención de las dos partes del sistema, se procede a la obtención de las cepas condicionales, transformando la cepa MS83 con el plásmido recombinante obtenido en la segunda parte. Como éste es un plásmido suicida (sin origen de replicación para micobacterias) se integra en el genoma de la bacteria por un proceso de recombinación homóloga.

Este proceso se define como el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas de ADN que poseen regiones de secuencia idéntica (Court y col., 2002). La recombinación ha sido ampliamente estudiada en bacterias como *E. coli* (Kowalczykowski y col., 1994) por su versatilidad para ser cultivada en el laboratorio y lograr modificar su genoma con relativa facilidad (Santoyo, 2008). Por su parte, la secuenciación del genoma de *M. tuberculosis* ha llevado a la identificación de los genes de recombinación homóloga los cuales incluye *recA*, *recBCD*, *recF*, *ruvA*, *ruvB* y *ruvC*, indicando que el mecanismo de recombinación esta conservado en las micobacterias (Muttucumaru y Parish, 2004).

Por lo tanto también en micobacterias, el complejo RecBCD es el que inicia la recombinación, requiriendo la ruptura bicatenaria en una de las hebras de cada molécula de ADN a recombinar (Kowalczykowi y col., 1994). A continuación, RecBCD en el sitio de esta ruptura, genera regiones monocatenarias, y una vez creadas, la enzima RecA, intercambia las cadenas. Después de unirse al ADN monocatenario, la RecA encuentra regiones de homología secuencial en las moléculas de ADN y genera parejas de apareamiento nuevas entre estas regiones conocidas como el intermediario de Holliday (Holliday, 1990; Watson y col., 2006; Nishinaka y col., 2007). Posteriormente, las proteínas RuvA y RuvB impulsan la migración de las ramas de ADN y la proteína RuvC se encarga de resolver las uniones de Holliday (Rafferty y col., 1996; Sharples y col., 1999; Watson y col., 2006). Al final de este

proceso de intercambio de información, una ADN ligasa sella las cadenas y termina el evento de recombinación homóloga.

Para la obtención del sistema completo, se realizó un primer ensayo de electroporación siguiendo las condiciones que utilizaron Boldrin y colaboradores en el año 2010 para desarrollar el sistema, es decir, se electroporaron 2 µg de ADN del plásmido recombinante. Se obtuvieron muy pocas colonias tanto para *pknA* como para *pknB*. Uno de los obstáculos que se presentan al tratar de obtener la cepa condicional, es la baja frecuencia de recombinación homóloga ( $10^{-4}$  ó  $10^{-5}$ ) que ocurre en las micobacterias. Esto trae como consecuencia que se requiera el análisis de un número significativo de transformantes para identificar la que se busca y además, en muchos casos, la frecuencia de recombinaciones ilegítimas es muy alta (Parish y col., 1999). Uno de los motivos por los cuales hay bajos niveles de recombinación homóloga en micobacterias tiene que ver con la naturaleza de la proteína RecA (Baulard y col., 1996), ya que su función depende de la longitud de homología, por lo general, mayor a 1 Kb (Muttucumaru y Parish, 2004). Aunque esta característica no es un requisito absoluto, pero se ha encontrado que secuencias de homología mayores a esa longitud, logran un aumento en la eficiencia de la recombinación (Parish y col., 1999; Santoyo, 2008).

En este sentido, la longitud de los fragmentos clonados en el vector pFRA50 está cercana a este límite de homología (924 pb para *pknA* y 1295 pb para *pknB*), motivo por el cual se decidió buscar metodologías alternativas que permitieran aumentar la tasa de recombinación.

En el año 1999, Hinds y colaboradores realizaron ensayos de recombinación para optimizar las condiciones que favorecieran los eventos de recombinación homóloga. Los

autores evaluaron diferentes tratamientos que desnaturalizaran el ADN antes de ser electroporado. Estos tratamientos incluían álcali, calentamiento e irradiación con luz ultravioleta (UV). Ellos reportaron que el tratamiento por desnaturalización con álcali es más exitoso, ya que, mostró un incremento en el número de recombinantes obtenidas. Estos resultados se deben a que el complejo RecBCD encargado de iniciar la recombinación, recorre el ADN bicatenario desenrollando las hebras de cada molécula con la ayuda de las subunidades RecB y RecD, que tienen actividad helicasa. Pero con frecuencia, la actividad de éste complejo destruye el ADN, motivo por el cual no se puede dar el proceso de recombinación (Watson y col., 2006). Por lo tanto, al transformar el ADN desnaturalizado (ADN simple cadena), evitaríamos el problema anterior y el complejo RecBCD se encargaría de colocar la proteína RecA sobre los extremos del ADN simple cadena. También se ha reportado que una modificación al protocolo estándar de transformación de Snapper y col., 1990, como variar el voltaje y la resistencia del pulso eléctrico no es significativo. Otro grupo de investigación (Kessel y Hatfull, 2006) reporta que deben utilizarse grandes cantidades de ADN (1 a 10  $\mu\text{g}$ ) para aumentar la frecuencia de este evento.

Por lo tanto, se realizaron otros dos ensayos de electroporación para lograr obtener la cepa condicional utilizando estas condiciones. El segundo ensayo, se realizó haciéndole un tratamiento con álcali al ADN (5  $\mu\text{g}$ ) antes de electroporar, mientras que para el tercer ensayo, se volvió a realizar el tratamiento previo pero a 1  $\mu\text{g}$  de ADN. Esta es la cantidad utilizada por Hinds y colaboradores en el año 1999, para realizar sus ensayos de electroporación. Otra modificación que se realizó en todos los ensayos fue partir de un volumen de 100 mL para realizar las células electrocompetentes (Parish y col., 1999). Parish y colaboradores en el año 1999, reportan que para este tipo de experimentos, un mayor número de células

electrocompetentes permite recuperar una mayor cantidad de células luego de los lavados con glicerol frío (10 % v/v), incrementándose la probabilidad de éxito de la electroporación.

La selección de estas transformantes se realizó en placas con medio sólido 7H10 suplementadas con Higromicina, que es el marcador de selección que contiene el plásmido recombinante pVknA37 o pVknB35. En dichas placas se esperaba el crecimiento de aquellas colonias en las cuales ocurrió un evento de recombinación entre el plásmido y los genes de interés. De los tres ensayos de electroporación realizados se obtuvieron 49 transformantes para el gen *pknA* (6 en el primer ensayo, 27 en el segundo y 16 en el tercero) y 160 para el gen *pknB* (10 en el primero, 120 en el segundo y 30 en el tercero). Esta diferencia entre ambas construcciones puede deberse como se mencionó anteriormente, a que el gen *pknA* tiene una longitud de homología por debajo del límite mínimo reportado para el proceso de recombinación, por lo que se observa una menor frecuencia de recombinación que la observada para la construcción del gen *pknB*.

De las condiciones utilizadas en este trabajo para aumentar la frecuencia de recombinación, se obtuvieron los mejores resultados para el segundo ensayo, siguiendo con las condiciones evaluadas en el tercero. Por lo tanto, combinar un pre-tratamiento de desnaturalización con álcali y grandes cantidades de ADN antes de electroporar, es una manera efectiva para lograr una mejor frecuencia de recombinación en micobacterias.

Las transformantes obtenidas fueron analizadas con el fin de comprobar si contenían el sistema completo y correcto, es decir, podían controlar de manera selectiva la expresión del gen esencial. Para ello, se realizó el ensayo con ATc creciéndolas en medio de cultivo sólido a diferentes concentraciones del inductor (0, 50 y 200 ng/ml). Se escogió agregar la



concentración de 200 ng/ml, para garantizar la represión completa del gen esencial, en caso de tener la cepa condicional. El resultado esperado para este ensayo sería que, por ser un gen esencial para el crecimiento de la bacteria, al ir aumentando la concentración de ATc deberían verse colonias más pequeñas en las cuales la coloración azul haya disminuido, hasta una concentración máxima de ATc, en la cual se observe una represión completa del gen esencial y que por lo tanto, no haya crecimiento. A nivel cromosómico los eventos moleculares que generan este comportamiento son los siguientes: en presencia de ATc, se expresa *tetR* produciendo al represor de tetraciclina (TetR), al cual se le une el inductor anhidrotetraciclina. Por lo tanto, el gen *pip* se expresa a partir del promotor fuerte  $P_{furA102tetO}$  produciendo Pip, el cual, a su vez reconoce al promotor dependiente de Pip ( $P_{ptr}$ ), reprimiendo negativamente al gen *lacZ* y al gen de interés. Por lo tanto, a medida que va aumentando la concentración de ATc la represión de ambos genes (*lacZ* y el gen de interés) es mayor.

Al realizar el ensayo a diferentes concentraciones de ATc, muchas de las colonias no crecieron en presencia de Higromicina al sembrarlas por segunda vez, posiblemente debido a que eran colonias satélites de la electroporación. En otras no se observó la represión esperada del gen *lacZ* en presencia del inductor. Una posible explicación a esto, es que al realizarse el proceso de recombinación, el casete de Higromicina se pudo integrar por recombinación ilegítima en algún promotor del plásmido pFRA42B ya integrado, modificando así la secuencia y en consecuencia el funcionamiento del sistema.

Las colonias en las cuales se observaba una posible disminución del tamaño, se sometieron nuevamente a un segundo ensayo con diferentes concentraciones de ATc. Sin embargo, sólo unas pocas siguieron mostrando una ligera disminución en el tamaño a 200 ng/mL de ATc. Pero, Boldrin y colaboradores reportan que a una concentración de 50 ng/mL,

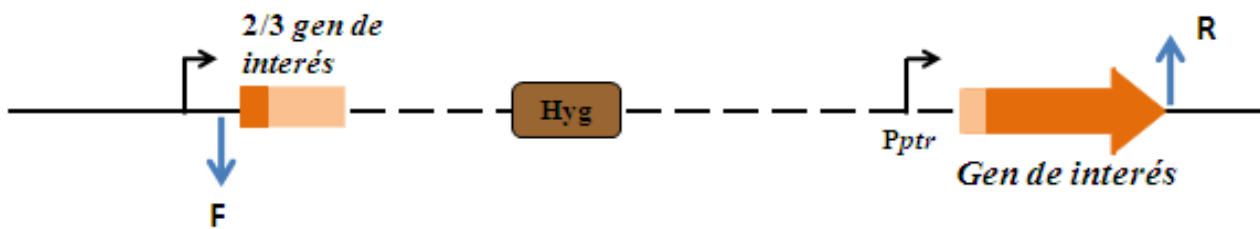
ocurre una represión importante del gen de interés. Por lo tanto, para confirmar el fenotipo de expresión condicional en dichas cepas, se repitió el ensayo de ATc, con un inóculo de 2  $\mu$ L partiendo de un cultivo en fase estacionaria de  $10^{10}$  cel/mL. Ninguna de las colonias mostró una disminución en su tamaño, por lo que se puede pensar que en todas las transformantes lo que se dió fue un evento de recombinación ilegítima, integrándose el casete de Higromicina solamente o posiblemente el plásmido en otro sitio que no era el deseado. Como se mencionó anteriormente, la recombinación ilegítima es un proceso que se da con alta frecuencia en micobacterias, y ocurre entre hebras de ADN que poseen regiones de homología muy cortas (4-20 pb). Es posible que este tipo de recombinación sea el resultado de un eficiente sistema de reparación del ADN para preservar la integridad del genoma (Muttucumaru y Parish, 2004).

El ensayo a diferentes concentraciones de ATc es un buen método para determinar si se obtuvo la cepa condicional. Sin embargo, tiene como limitante que no se dispone de un control positivo, es decir, una cepa condicional ya creada. Boldrin y colaboradores reportan una cepa condicional para el gen *ftsZ* en *M. smegmatis* mc<sup>2</sup>155, la cual podría servir como control positivo, indicando como se debería observar la disminución en el tamaño de las colonias.

Otro método para corroborar si se tiene la cepa condicional es la realización de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando el ADN genómico de cada colonia transformante. Para ello es necesario diseñar unos cebadores que hibriden un poco antes del extremo 5'-3' del gen de interés y otro cebador ibride al final del gen (Figura 29). De esta forma, de tener la cepa condicional, en el resultado de la PCR debería ser un fragmento con un peso aproximado a la longitud del plásmido recombinante y el gen completo. Este producto

de PCR sería muy grande por lo que, la amplificación puede ser bastante complicada. En caso contrario, se observaría un fragmento con el peso del gen completo solamente.

Debido a que ninguna de las colonias obtenidas mostró el fenotipo esperado en placas con diferentes concentraciones de ATc, no se realizó el análisis por PCR. Sin embargo, para corroborar la no obtención de la cepa se tiene considerado realizar dicha prueba.



Leyenda: F donde hibridaría el cebador delantero; R donde hibridaría el cebador reverso.

**Figura 29.** Representación esquemática de la posición de los cebadores a diseñar.

Con el presente trabajo se construyeron los elementos necesarios para generar una cepa que exprese condicionalmente los genes *pknA* o *pknB*, requiriendo estandarizar la electroporación para obtener dicha cepa. Aunque aún no ha sido posible conseguir las dos cepas condicionales, se seguirán realizando experimentos para obtenerlas, debido a que el estudio de estos genes es de vital importancia en la actualidad para su evaluación como posibles blancos terapéuticos. Dichos estudios además suministrarían más información de la interacción de ambas proteínas. Para la proteína PknB se reportó que su dominio extracelular actuaba como un sensor para que, la bacteria comience el proceso de división celular. Por lo que, se podría estudiar cuál de sus dominios PASTA es el que recibe dicha señal. Para PknA, encontrar sustratos *in vivo* y estudiar interacciones con otras proteínas, para conocer acerca de los eventos de fosforilación y desfosforilación de la misma. Con ambas proteínas, conocer bien sus funciones para diseñar las drogas que las puedan inhibir.

## **8.- Conclusiones**

- Se obtuvieron las cepas MS82 y MS83, siendo ésta última más eficiente en la represión del gen *lacZ* que la cepa MS82, cuando son sometidas a la misma concentración de anhidrotetraciclina (ATc).
- La construcción de los plásmidos recombinantes para los genes *pknA* (pVknA37) y *pknB* (pVknB35) fue verificada por análisis de restricción, PCR y secuenciación, dando como resultado el éxito de su obtención.
- Las condiciones utilizadas para el segundo ensayo de electroporación (Tratamiento desnaturante con álcali al ADN en grandes cantidades), aumentaron la tasa de recombinación, obteniéndose más transformantes.
- Todas las transformantes obtenidas de los ensayos de electroporación de los plásmidos recombinantes en la cepa MS83, fueron producto de recombinaciones ilegítimas, en las cuales ocurrió la integración del casete de Higromicina del plásmido.
- Se requieren ensayos adicionales para estandarizar la metodología, entre ellos la utilización de un control positivo de represión con una cepa ya construida.

## 9.- Referencias bibliográficas

Alzari, P.M. 2006. The Ser/Thr protein kinase PknB is essential for sustaining mycobacterial growth. *J. Bacteriol.* **188**: 7778-7784.

Av Gay, Y., Deretic, V. 2005. Two-component system, Protein kinases, and Signal Transduction in *Mycobacterium tuberculosis*. *Tuberculosis and the tubercle bacillus.* **8**: 358-368

Av Gay, Y., Everett, M. 2000. The eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases of *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends. Microbiol.* **8 (5)**: 238-244.

Av Gay, Y., Jamil, S., Drews, S.J. 1999. Expression and characterization of the *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine protein kinase PknB. *Infect. Immun.* **67 (11)**: 5676-5682.

Barry, C.E., Crick, D.C., McNeil, M.R. 2007. Targeting the formation of the cell wall core of *M. tuberculosis*. *Infect. Disord. Drug. Targets.* **7 (2)**: 182-202.

Barthe, P., Mukamolova, G.V., Roumestand, C., Cohen-Gonsaud, M. 2010. The Structure of PknB Extracellular PASTA Domain from *Mycobacterium tuberculosis* Suggests a Ligand-Dependent Kinase Activation. *Structure.* **18 (5)**: 606-615.

Basu, S. 2007. XDR Tuberculosis Requires Emphasis On Primary Transmission. *Lancet. Infect. Dis.* **7 (7)**: 442.

Begg, K.J., Donachie, W.D. 1985. Cell shape and division in *Escherichia coli*: experiments with shape and division mutants. *J. Bacteriol.* **163 (2)**: 615-622.

Brennan, P.J., Nikaido, H. 1995. The envelope of micobacteria. *Annu. Rev. Biochem.* **64**: 29-63.

Blokpoel, M.C., Murphy, H.N., O'toole, R., Wiles, S., Runn, E.S., Stewart, G.R., Young, D.B. y colaboradores. 2005. Tetracycline-inducible gene regulation in micobacteria. *Nucleic. Acids. Res.* **33**: e22

Bloom, B. 1994. Tuberculosis. Pathogenesis, protection and control. ASM press, Primera edición, Washington, E.E.U.U

Boitel, B., Ortiz-Lombardia, M., Duran, R., Pompeo, F., Cole, S.T., Cervenansky, C., Alzari, P.M. 2003. PknB kinase activity is regulated by phosphorylation in two Thr residues and desphosphorylation by PstP, the cognate phospho-Ser/Thr phosphatase, in *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **49**: 1493-1508.

Boldrin, F., Manganeli, R., Casonato, S., Dainese, E., Sala, C., Dhar, N., Palú, G. y colaboradores. 2010. Development of a repressible mycobacterial promoter system based on two transcriptional repressors. *Nucleic. Acids. Res.* **38 (12)**: 1-11.

Bullock, W.O., Fernandez, J.M., Short, J.M. 1987. XL1-Blue: A high efficiency plasmid transforming *recA Escherichia coli* strain with beta-galactosidase selection. *Biotechniques.* **5 (4)**: 376-379.

Chaba, R., Raje, M., Chakraborti, P.K. 2002. Evidence that a eukaryotic-type serine/threonine protein kinase from *Mycobacterium tuberculosis* regulates morphological changes associated with cell division. *Eur. J. Biochem.* **269 (4)**: 1078-1085.

- Chatterjee, D. 1997. The mycobacterial cell wall: structure, biosynthesis and sites of drug action. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **1 (4)**: 579-588.
- Chen, E.S., Moller, D.R. 2007. Expression profiling in granulomatous lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **4 (1)**: 101-107.
- Chopra, P, Meena, L.S., Singh, Y. 2003. New drug targets for *Mycobacterium tuberculosis*. *Indian. J. Med. Res.* **117**: 1-9.
- Chopra, P., Singh, B., Singh, R., Vohra, R., Koul, A., Meena, L.S., Koduri, H. y colaboradores. 2003. Phosphoprotein phosphatase of *Mycobacterium tuberculosis* desphosphorylates serine/threonine kinases PknA and PknB. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311 (1)**: 112-120.
- Cole, S.T., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S.V. y colaboradores. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature.* **393 (6685)**: 537-544.
- Coll, P. 2003. Fármacos con actividad frente a *Mycobacterium tuberculosis*. *Enferm. Infecc. Microbiol. Clin.* **21 (6)**: 299-308.
- Court, D.L., Sawitzke, J.A., Thomason, L.C. 2002. Genetic Engineering Using Homologous Recombination. *Annu. Rev. Genet.* **36**: 361-388
- Cozzone, A.J. 1988. Protein phosphorylation in prokaryotes. *Annu. Rev. Microbiol.* **42**: 97-125.
- Curry, J.M., Whalan, D., Hunt, D., Gohil, K., Strom, M., Rickman, L., Colston, M.J. y colaboradores. 2005. An ABC transporter containing a forkhead-associated domain interacts

with a serine/threonine protein kinase and is required for growth of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Infect. Immun.* **73**: 4471-4477.

Daffé, M., Drapper, P. 1998. The envelope layers of mycobacteria with reference to their pathogenicity. *Adv. Microb. Physiol.* **39**: 131-203.

DeVito, J.A., Mills, J.A., Liu, V.G., Agarwal, A., Sizemore, C.F., Yao, Z., Stoughton, D.M. y colaboradores. 2002. An array of target-specific screening strains for antibacterial discovery. *Nat. Biotechnol.* **20**: 478-483.

Ehrt, S., Guo, X.V., Hickey, C.M., Ryou, M., Monteleone, M., Riley, L.W., Schanappinger, D. 2005. Controlling gene expression in micobacteria with anhydrotetracycline and Tet repressor. *Nucleic. Acids. Res.* **33**: e21.

Fernandez, P., Saint-Joanis, B., Barilone, N., Jackson, M., Giequel, B., Cole, S.T., Fontan, P., Shaun, W., Issar, S. 2004. Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*: Stress control and virulencia. *Curr. Sci.* **86 (1)**: 122-134.

Fernando, S.L., Britton, W.J. 2006. Genetic susceptibility to mycobacterial disease in humans. *Immunol. Cell. Biol.* **84 (2)**: 125-137.

Flynn, J.L., Chan, J. 2001. Tuberculosis: latency and reactivation. *Infect. Immun.* **69 (7)**: 4195-4201.

Folcher, M., Morris, R., Dale, G., Salah-Bey-Hocini, K., Viollier, P., Thompson, C. 2001. A Transcriptional Regulator of a Pristinamycin Resistance Gene in *Streptomyces coelicolor*. *J. Biol. Chem.* **276 (2)**: 1479-1485.



Fontan, P., Walters, S., Smith, I. 2004. Cellular signaling pathways and transcriptional regulation in *Mycobacterium tuberculosis*: Stress control and virulence. *Current Science*. **86 (1)**: 122-134.

Forbes, B., Sahm, D., Weissfeld, A. 1998. Diagnostic Microbiology. Editorial Mosby Inc, Décima Edición, USA.

Forti, F., Crosta, A., Ghisotti, D. 2009. Pristinamycin-inducible gene regulation in micobacteria. *J. Biotechnol.* **140**: 270-277.

Galyov, E.E., Hakansson, S., Wolf-Watz, H. 1994. Characterization of the operón encoding the YpkA Ser/Thr protein kinase and the YopJ protein of *Yersenia pseudotuberculosis*. *Journal of bacteriology*. **176**: 4543-4548.

Gangadharan, P.R. 1996. Microbiology of non tuberculosis micobacteria. *Semin. Respir. Infect.* **11**: 231-243.

Ginsberg, A.M., Spigelman, M. 2007. Challenges in Tuberculosis drug research and development. *Nat. Med.* **13 (3)**: 290-294.

Gopaldaswamy, R., Narayanan, S., Jacobs, W.R., Av Gay, Y. 2008. Mycobacterium smegmatis biofilm formation and sliding motility are affected by the serine/threonine protein kinase PknF. *FEMS Microbiol Lett.* **278**: 121-127.

Greenstein, A.E., Grundner, C., Echols, N, Gay, .LM., Lombana, T.N., Miecskowski, C.A., Pullen, K.E., Sung, P.Y., Alber, T. 2005. Structure/function studies of Ser/Thr and Tyr protein phosphrylation in Mycobacterium tuberculosis. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.* **9 (3-4)**: 167-181.

- Han, G., Zhang, C.C. 2001. On the origin of Ser/Thr kinases in a prokaryote. *FEMS. Microbiol. Lett.* **200 (1)**: 79-84.
- Hanahan, G. 1983. Studies of the transformation in *Escherichia coli* with plasmid. *J. Mol. Biol.* **166**: 557-580.
- Hanks, S.K., Quinn, A.M., Hunter, T. 1988. The protein kinase family: conserved features and deduced phylogeny of the catalytic domains. *Science.* **241**: 42-52.
- Hasan, S., Daugelat, S., Rao, P.S., Schreiber, M. 2006. Prioritizing Genomic Drug Targets in Pathogens: Application to *Mycobacterium tuberculosis*. *Plos. Comput. Biol.* **2 (6)**: 539-550.
- Henriques, A.O., Glaser, P., Piggot, P.J., Moran, C.P. Jr. 1998. Control of cell shape and elongation by the rodA gene in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **28 (2)**: 235-247.
- Hinds, J., Mahenthalingam, E., Kempell, K., Duncan, K., Stokes, R., Parish, T., Stoker, N. 1999. Enhanced gene replacement in micobacteria. *Microbiology.* **145**: 519-527.
- Holliday, R. 1990. The history of the DNA heteroduplex. *Bioessays.* **12**: 133-142.
- Holmes, D.S., Quigley, M. 1981. A rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Bioche.* **114**: 183-190.
- Humer, F.B. 2005. Innovation the pharmaceutical industry – Future prospect. *Roche.*
- Hussain, H., Branny, P., Allan, E. 2006. A eukaryotic-type serine/threonine protein kinase is required for biofilm formation, genetic competence, and acid resistance in *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **188**: 1628-1632.

Janin, Y. 2007. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorganic. Med. Chem.* **15 (7)**: 2479-2513.

Jin, H., Pancholi, V. 2006. Identification and biochemical characterization of a eukaryotic-type serine/threonine kinase and its cognate phosphatase in *Streptococcus pyogenes*: their biological functions and substrate identification. *J. Mol. Biol.* **357**: 1351-1372.

Kang, C.M., Abbott, D.W., Park, S.T., Dascher, C.C., Cantley, L.C., Husson, R.N. 2005. The *Mycobacterium tuberculosis* serine/threonine kinases PknA and PknB: substrate identification and regulation of cell shape. *Genes. Dev.* **19 (14)**: 1692-1704.

Kasper, D.L., Braunwald, E., Fauci, A.S., Hauser, S.L., Longo, D.L., Jameson, J.L., Janin, Y.L. 2005. Antituberculosis drugs: Ten years of research. *Bioorg. Med. Chem.* **15 (7)**: 2479-2513.

Kessel, J.C., Hatfull, G.F. 2006. Recombineering in *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Methods.* **4**: 147-152.

Kowalczykowski, S.C., Dixon, D.A., Eggleston, A.K., Lauder, S.D., Rehrauer, W.M. Biochemistry of homologous recombination in *Escherichia coli*. *Microbiol. Mol. Biol. R.* **58 (3)**: 401-465.

Kristich, C.J., Wells, C.L., Dunny, G.M. 2007. A eukaryotic-type Ser/Thr kinase in *Enterococcus faecalis* mediates antimicrobial resistance and intestinal persistence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **104**: 3508-3513.

Loscalzo, J. 2005. Harrison's Principles of Internal Medicine. Editorial McGraw-Hill, Décima Sexta Edición, New York, USA. Sanseau, P. 2001. Impact of human genome sequencing for in silico target discovery. *Drug. Discov. Today.* **6 (6)**: 316-323.

- Madec, E.A., Laszkiewicz, A., Iwanicki, A., Obuchowski, M., Seror, S. 2002. Characterization of a membrane-linked Ser/Thr protein kinase in *Bacillus subtilis*, implicated in development processes. *Mol. Microbiol.* **46**: 571-586.
- Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E.O., Colston, J. 1993. Cloning and sequencing of the gene which encodes the highly inducible acetamidase of *Mycobacterium smegmatis*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 575-583.
- Manganelli, R., Provvedi, R., Rodrigue, S., Beaucher, J., Gaudreau, L., Smith I. 2004.  $\sigma$  factors and global gene regulation in *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Bacteriol.* **186**: 895-902.
- Means, T.K., Wang, S., Lien, E., Yoshimura, A., Golenbock, D., Fenton, M. 1999. Human toll-like receptors mediate cellular activation by *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Immunol.* **163**: 3920-3927
- Mieczkowski, C., Lavarone, A.T., Alber, T. 2008. Auto-activation mechanism of the *Mycobacterium tuberculosis* PknB receptor Ser/Thr kinase. *EMBO J.* **27(23)**: 3186-3197.
- Mnaimneh, S., Davierwala, A.P., Haynes, J., Moffat, J., Peng, W.T., Zhang, W., Yang, X. y colaboradores. 2004. Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles. *Cell.* **118**: 31-44.
- Molle, V., Kremer, L. 2010. Division and cell envelope regulation by Ser/Thr phosphorylation: *Mycobacterium* shows the way. *Mol. Microbiol.* **75 (5)**: 1064-1077.

Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G., Erlich, H. 1986. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*. **51**: 263-273.

Muñoz-Dorado, J., Inouye, S., Inouye, M. 1991. A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *M. Xanthus*, a gram-negative bacterium. *Cell*. **67** (5): 995-1006.

Muttucumaru, D.G., Parish, T. 2004. The Molecular Biology of Recombination in *Mycobacteria*: What Do We Know and How Can We Use It?. *Curr. Issues Mol. Biol.* **6**: 145-158.

Neu, J.M., MacMillan, S.V., Nodwell, J.R., Wright, G.D. 2002. StoPK-1, a serine/threonine protein kinase from the glycopeptides antibiotic producer *Streptomyces toyocaensis* NRRL 15009, affects oxidative stress response. *Mol. Microbiol.* **44**: 1353-1366.

Nishinaka, T., Doi, Y., Hara, R., Yashima, E. 2007. Elastic Behavior of RecA-DNA Helical Filaments. *J. Mol. Biol.* **370**: 837-845.

North, R.J., Jung, Y.J. 2004. Immunity to tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol.* **22**: 599-623.

Organización Mundial de la Salud. 2010. Incidencia estimada de Tuberculosis a nivel mundial para el año 2006. [En línea]. [Citado el 8 de Julio de 2011]. Disponible en: [http://www.who.int/tb/publications/global\\_report/2008/chapter\\_1/en/index3.html](http://www.who.int/tb/publications/global_report/2008/chapter_1/en/index3.html).

Organización Panamericana de la Salud. 2006. Plan Regional de Tuberculosis 2006-2015. [En línea]. [Citado el 6 de Marzo de 2011]. Disponible en: <http://www.paho.org/Spanish/AD/DPC/CD/tb-reg-plan-2006-15.pdf>

- Parikh, A., Verma, S.K., Khan, S., Prakash, B., Nandicoori, V.K. 2009. PknB-mediated phosphorylation of a novel substrate, N-acetylglucosamine-1-phosphate uridyltransferase, modulates its acetyltransferase activity. *J. Mol. Biol.* **386 (2)**: 451-464.
- Parish, T., Gordhan, B.G., McAdam, R.A., Duncan, K., Mizrahi, V., Stoker, N.G. 1999. Production of mutants in amino acid biosynthesis genes of *Mycobacterium tuberculosis* by homologous recombination. *Microbiology.* **145**: 3497-3503.
- Parish, T., Mahenthiralingam, E., Draper, P., Davis, E.O., Colston, M.J. 1997. Regulation of the inducible acetamide gene of *Mycobacterium smegmatis*. *Microbiology.* **143**: 2267-2276.
- Parish, T., Smith, D.A., Roberts, G., Betts, J., Stoker, N.G. 2003. The senX3-regX3 two-component regulatory system of *Mycobacterium tuberculosis* is required for virulence. *Microbiology.* **149 (Pt 6)**: 1423-1435.
- Parish, T., Stoker, N.G. 1997. Development and use of a conditional antisense mutagenesis system in micobacteria. *FEMS. Microbiol. Lett.* **154**: 151-157.
- Parkinson, J.S., Kofoed, E.C. 1992. Communication modules in bacterial signaling proteins. *Annu. Rev. Genet.* **26**: 71-112.
- Pérez, E., Samper, S., Bordas, Y., Grilhot, C., Gicquel, B., Martín, C. 2001. An essential role for phoP in *Mycobacterium tuberculosis* virulence. *Mol. Microbiol.* **41 (1)**: 179-187.
- Pieters, J. 2001. Entry and survival of pathogenic mycobacteria in macrophages. *Microbes. Infect.* **3 (3)**: 249-255.

Portevin, D., de Sousa-D'Auria, C., Montrozier, H., Houssin, C., Stella, A., Laneelle, M.A. y colaboradores. 2005. The acyl-AMP ligase FadD32 and AccD4-containing acyl-CoA carboxylase are required for the synthesis of mycolic acids and essential for mycobacterial growth: identification of the carboxylation product and determination of the acyl-CoA carboxylase components. *J. Biol. Chem.* **280**: 8862-8874.

Puech, V., Guilhot, C., Perez, E., Tropis, M., Armitige, L.Y., Gicquel, B., Daffé, M. 2002. Evidence for a partial redundancy of the fibronectin-binding proteins for the transfer of mycoloyl residues into the cell wall arabinogalactan termini of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Microbiol.* **44 (4)**: 1109-1122.

Rafferty, J.B., Sedelnikova, S.E., Hargreaves, D., Artymiuk, P.J., Baker, P.J., Sharples, G.J. y colaboradores. 1996. Crystal structure of DNA recombination protein RuvA and a model for this its binding to the Holliday junction. *Science.* **274**: 415-421.

Rajagopal, L., Clancy, A., Rubens, C.E. 2003. A eukaryotic type serine/threonine kinase and phosphatase in *Streptococcus agalactiae* reversibly phosphorylate an inorganic pyrophosphatase and affect growth, cell segregation, and virulence. *J. Biol. Chem.* **278 (16)**: 14429-14441.

Rezwan, M., Laneelle, M.A., Sander, P. y colaboradores. 2007. Breaking down the wall: fractionation of micobacteria. *J. Microbiol. Methods.* **68 (1)**: 32-39.

Rickman, L., Saldanha, J.W., Hunt, D.M., Hoar, D.N., Colston, M.J., Millar, J.B., Buxton, R.S. 2004. A two-component signal transduction system with a PAS domain-containing sensor is

required for virulence of *Mycobacterium tuberculosis* in mice. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **314 (1)**: 259-267.

Roberts, G., Muttucumaru, D.G., Parish, T. 2003. Control of the acetamide gene of *Mycobacterium smegmatis* by multiple regulators. *FEMS. Microbiol. Lett.* **221**: 131-136.

Rossmann, M., Milton, D. 1996. Tuberculosis clínica y nuevos desafíos. Editorial McGraw-Hill Interamericana, Primera Edición, México.

Russel, D.G. 2001. *Mycobacterium tuberculosis*: here today, and here tomorrow. *Nat Rev. Mol. Cell. Biol.* **2 (8)**: 569-577.

Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. 1989. Molecular Cloning: a Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Segunda edición, New York.

Sanseau, P. 2001. Impact of human genome sequencing for in silico target discovery. *Drug. Discov. Today.* **6**: 316-323.

Santoyo, G. 2008. Recombinación en bacterias: ingeniería del AND usando recombinación homóloga. *Alam.* **50**: 38-47.

Saskova, L., Vo, A., Silvestroni, A., Rubens, C.E. 2006. Eukaryotic-type serine/threonine protein kinase StkP is a global regulator of gene expression in *Streptococcus pneumoniae*. *J. Bacteriol.* **189**: 4168-4179.

Sasseti, C.M., Boyd, D.H., Rubin, E.J. 2003. Genes required for mycobacterial growth defined by high density mutagenesis. *Mol. Microbiol.* **48 (1)**: 77-84.



Sharples, G.J., Ingleston, S.M., Lloyd, R.G. 1999. Holliday junction processing in bacteria: insights from the evolutionary conservation of RuvABC, RecG, and RusA. *J. Bacteriol.* **181**: 5543-5550.

Sickmann, A., Meyer, H.E. 2001. Phosphoamino acid analysis. *Proteomics.* **1 (2)**: 200-206.

Singh, A., Singh, Y., Pine, R., Shi, L., Chandra, R., Drlica, K. 2006. Protein kinase I of *Mycobacterium tuberculosis*: cellular localization and expression. *Tuberculosis Edinb.* **86 (1)**: 28-33.

Snapper, S.B., Melton, R.E., Mustafa, S., Kieser, T., Jacobs, W.R. 1990. Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.* **4**: 1911-1919.

Stokes, R., Norris-Jones, R., Brooks, D.E., Beveridge, T.J., Doxsee, D., Thorson, L.M. 2004. The glycan-rich outer layer of the cell wall of *Mycobacterium tuberculosis* acts as an antiphagocytic capsule limiting the association of the bacterium with macrophages. *Infect. Immun.* **72 (10)**: 5676-5686.

Székely, R., Wączek, F, Szabadkai, I, Németh G, Hegymegi-Barakonyi, B., Eros, D., Szokol, B. y colaboradores. 2008. A novel drug discovery concept for tuberculosis: inhibition of bacterial and host cell signaling. *Immunol Lett.* **116 (2)**: 225-231.

Umeyana, T., Lee, P.C., Horinouchi, S. 2002. Protein serine/threonine kinases in signal transduction for secondary metabolism and morphogenesis in *Streptomyces*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **180**: 6764-6768.

Terstappen, G.C., Reggiani, A. 2001. In silico research in drug discovery. *Trends. Pharmacol. Sci.* **22 (1)**: 23-26.

Thakur, M., Chaba, R., Mondal, A.K., Chakraborti, P.K. 2008. Interdomain Interaction Reconstitutes the Functionality of PknA, a Eukaryotic Type Ser/Thr Kinase from *Mycobacterium tuberculosis*. *J. Biol. Chem.* **283 (12)**: 8023-8033.

Thakur, M., Pradip, K., Chakraborti, P.K. 2006. GTPase Activity of Mycobacterial FtsZ Is Impaired Due to Its Transphosphorylation by the Eucaryotic-type Ser/Thr kinase, PknA. *J. Biol. Chem.* **281 (52)**: 40107-40113.

Tufariello, J.L., Chang, J., Flynn, J.L. 2003. Latent tuberculosis: mechanism of host and bacillus that contribute to persistent infection. *Lancet. Infect. Dis.* **3**: 578-590.

van Soolingen, D., Hermans, P.W., de Haas, P.E., Soll, D.R., van Embden, J.D. 1991. Occurrence and stability of insertion sequences in *Mycobacterium tuberculosis* complex strains: evaluation of an insertion sequence-dependent DNA polymorphism as a tool in the epidemiology of tuberculosis. *J. Clin. Microbiol.* **29**: 2578-2586.

Veyron-Churlet, R., Molle, V., Taylor, R.C., Brown, A.K., Besra, G.S., Zanella-Cleon, I., Futterer, K. y colaboradores. 2009. The *Mycobacterium tuberculosis* beta-ketoacyl-acyl carrier protein synthase III activity is inhibited by phosphorylation on a single threonine residue. *J. Biol. Chem.* **284 (10)**: 6414-6424.

Villarino, A., Duran, R., Wehenkel, A., Fernandez, P., England, P., Brodin, P., Cole, S.T. y colaboradores. 2005. Proteomic identification of *M. tuberculosis* protein kinase substrate: PknB

recruits GarA, a FHA domain-containing protein, through activation loop-mediated interactions. *J. Mol. Biol.* **350 (5)**: 953-963.

Wang, J., Li, C., Yang, H., Mushegian, A., Jin, S. 1998. A Novel Serine/Threonine Protein Kinase Homologue of *Pseudomonas aeruginosa* is specifically inducible within the host infection site and is required for full Virulence in neutropenic Mice. *J. Bacteriol.* **180 (24)**: 6764-6768.

Wang, S., Sim, T.B., Kim, Y.S., Chang, Y.T. 2004. Tools for target identification and validation. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8 (4)**: 371-377.

Watson., Baker., Bell., Gann., Levine., Losick. 2006. Biología Molecular del gen. Medica Panamericana, Quinta edición, Madrid, España.

Wehenkel, A., Bellinzoni, M., Graña, M., Duran, R., Villarino, A., Fernandez, P., Andre-Leroux, G. y colaboradores. 2008. Mycobacterial Ser/Thr protein kinases and phosphatases: Physiological roles and therapeutic potencial. *Biochim. Biophys. Acta.* **1784 (1)**: 193-202.

Yeats, C., Finn, R.D., Bateman, A. 2002. The PASTA domain: A lactam-binding domain. *Trends. Biochem. Sci.* **27 (9)**: 438.

Young, T.A., Delagoutte, B., Endrizzi, J.A., Falick, A.M, Alber, T. 2003. Structure of *M. tuberculosis* PknB supports a universal activation mechanism for Ser/Thr protein kinases. *Nat. Struct. Biol.* **10 (3)**: 168-174.

Zhart, T.C. 2003. Molecular mechanisms regulating persistent *Mycobacterium tuberculosis* infection. *Microbes infect.* **5**: 159-167.

Zhart, T.C., Deretic, V. 2001. *Mycobacterium tuberculosis* signal transduction system required for persistent infections. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98 (22)**: 12706-12711.

Zhang, W., Inouye, M., Inouye, S. 1996. Reciprocal regulation of the differentiation of *Myxococcus Xanthus* by Pkn5 and Pkn6, eukaryotic-like Ser/Thr protein kinases. *Mol Microbiol.* **20 (2)**: 435-447.

Zhang, Y. 2005. The magic bullets and tuberculosis drug targets. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **45**: 529-564.

Zinsser, H. 1999. Diagnostico Microbiológico. Editorial Panamericana, Veinteava Edición, Buenos Aires, Argentina.

### **Consultas en línea**

<http://egamor.blogspot.com/2010/06/pared-celular-mycobacterium.html> [Consulta: 2 de Marzo de 2011].

<http://www.fermentas.com/en/products/all/dna-electrophoresis/generuler-dna-ladders/sm031-generuler-1kb> [Consulta: 10 de Septiembre de 2011].

<http://www.multalin.toulouse.inra.fr/multalin/multalin.html> [Consulta: 4 de Junio de 2011].

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov> [Consulta: 3 de Junio de 2011].

<http://tools.neb.com/NEBcutter2/> [Consulta: 5 de Junio de 2011].