

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE BAJA CALIFORNIA

Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería



Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en el periplasma de *Escherichia coli*

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

P R E S E N T A

Jorge Luis Jiménez Niebla

Tijuana, B.C.

Abril de 2017.

Universidad Autónoma de Baja California

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS E INGENIERÍA

"2017 Año del 60 Aniversario de la Universidad Autónoma de Baja California"

FOLIO No. 013

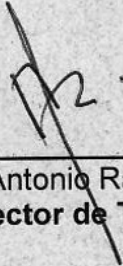
Tijuana, B. C., a 05 de abril de 2017.

C. Jorge Luis Jiménez Niebla
Pasante de Químico Farmacobiólogo
Presente

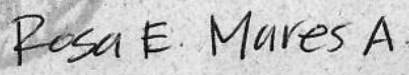
El tema de trabajo y/o tesis para su examen profesional, en la
Opción Tesis

Es propuesto, por el Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra y la Dra. Rosa Elena Mares
Alejandre, quienes serán los responsables de la calidad de trabajo que usted
presente, referido al tema "Expresión de la serina proteasa MarP de
Mycobacterium tuberculosis en el periplasma de Escherichia coli", el cual deberá
usted desarrollar, de acuerdo con el siguiente orden:

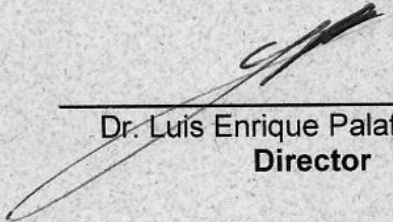
- I.- INTRODUCCIÓN
- II.- HIPÓTESIS Y OBJETIVOS
- III.- MATERIALES Y MÉTODOS
- IV.- RESULTADOS Y DISCUSIONES
- V.- CONCLUSIONES
- VI.- BIBLIOGRAFÍA



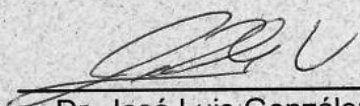
Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra
Co-Director de Tesis



Dra. Rosa Elena Mares Alejandre
Co-Directora de Tesis



Dr. Luis Enrique Palafox Maestre
Director



Dr. José Luis González Vázquez
Subdirector

Jiménez Niebla, Jorge Luis

**Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis*
en el periplasma de *Escherichia coli***

Tesis de licenciatura

Todos los derechos sobre los datos y resultados, derivados de la investigación realizada, contenidos en este documento son propiedad de los autores y de las instituciones donde se realizó el estudio. Por tal motivo, se prohíbe la reproducción, distribución, publicación, traducción, y cualquier otro uso o adaptación (total o parcial) de la información, por cualquier medio o forma de difusión.

La prohibición anterior no tendrá validez, de forma exclusiva y limitada, cuando el uso o adaptación de la información cumpla los siguientes requisitos:

- 1) el material o medio de difusión sea utilizado sólo para fines académicos, no lucrativos ni comerciales;
- 2) incluir la siguiente cita: “Jiménez Niebla, Jorge Luis. Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en el periplasma de *Escherichia coli*. Tesis de licenciatura. Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo, Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, Universidad Autónoma de Baja California. Abril de 2017.”
- 3) enviar un correo electrónico a mramos@uabc.edu.mx, solicitando anuencia y dando aviso de qué datos se van a utilizar y cuál es el propósito de su uso.

Lo anterior no otorga derecho o licencia alguna, respecto a la información utilizada.

Para cualquier otro asunto relacionado, contactar a mramos@uabc.edu.mx.

D.R. © Jiménez Niebla, Jorge Luis. Tesista.

D.R. © Ramos Ibarra, Marco Antonio. Director de tesis.

D.R. © Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería. Unidad Académica de la UABC.

D.R. © Universidad Autónoma de Baja California. Institución de Educación Superior.

©2017.

Tesis: Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en el periplasma de *Escherichia coli*.
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.
Institución: Universidad Autónoma de Baja California.
Sustentante: Jorge Luis Jiménez Niebla.
Fecha: Abril de 2017.

El presente proyecto de investigación fue realizado en el **Laboratorio de Biotecnología** de la **Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC**, bajo la co-dirección de los profesores **Dr. Marco Antonio Ramos Ibarra** y **Dra. Rosa Elena Mares Alejandre**, con el financiamiento del **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT)**: Fondo Sectorial SEP-CONACYT para **Investigación en Ciencia Básica** (apoyo 155714) y Fondo Sectorial SSA/IMSS/ISSSTE para **Investigación en Salud** (apoyo 161544), otorgados al Dr. Ramos Ibarra.

Los resultados correspondientes fueron presentados en dos eventos académicos: (i) **4to. Encuentro Estatal de Jóvenes Investigadores en Baja California**, 29 y 30 de septiembre de 2016 (Tijuana, BCN); y (ii) **XXXI Congreso Nacional de Bioquímica**, 06-11 de noviembre de 2016 (Aguascalientes, AGS). La participación en los dos eventos académicos fue apoyada por la Dirección de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería de la UABC.

Tesis: Expresión de la serina proteasa MarP de *Mycobacterium tuberculosis* en el periplasma de *Escherichia coli*.
Grado: Licenciatura, Programa Educativo de Químico Farmacobiólogo.
Institución: Universidad Autónoma de Baja California.
Sustentante: Jorge Luis Jiménez Niebla.
Fecha: Abril de 2017.

El presente **Manuscrito de Tesis** fue **Revisado y Aprobado** por un **Comité Académico**, conformado por los profesores:

Marco Antonio Ramos Ibarra, Dr. (Presidente)

Rosa Elena Mares Alejandre, Dra. (Secretaria)

Alexis Zarahy Minchaca Acosta, QFB (Sinodal)

Samuel Guillermo Meléndez López, Dr. (Suplente)

Pablo Alfonso Madero Ayala, QFB (Suplente)

*Según vamos adquiriendo conocimiento
las cosas no se hacen más comprensibles,
sino más misteriosas.
Albert Schweitzer*

Agradecimientos

Quiero agradecer a Dios por las oportunidades y bendiciones que me ha brindado día con día.

A mi familia, nunca voy a poder darles las gracias suficientes por jamás dejarme solo, y porque cuando me he sentido perdido me han ayudado a retomar el camino. Gracias, los amo.

La amistad es un tesoro que no todos pueden tener y durante estos años de trabajo, me han enseñado a nunca bajar los brazos, me han inspirado para conseguir muchas metas que sin su compañía dudo hubiera podido alcanzar. Gracias a mis amigos del laboratorio Ekateriana, Jessica, Aldo, Celina, Vero, Eliseo, Pablo, Alexis, Ricardo, Álvaro Uzziel, Lilian, Dr. Samuel y a mis amigos de la universidad Isabel, Maura, Carlos, Miguel, Samuel, Kenya, Saúl, Jesús, por ser una pieza clave en mi vida. Gracias Isabel por tu apoyo incondicional y por estar presente tanto en los momentos de angustia como también en los de felicidad. Siempre has sabido que decir.

De igual manera quiero agradecer al Dr. Marco Ramos y a la Dra. Rosy Mares, por abrirme las puertas del laboratorio, su apoyo y enseñanzas.

Contenido

Agradecimientos	6
Contenido.....	7
Índice de figuras y tablas.....	9
Abreviaturas.....	10
1. INTRODUCCIÓN.....	11
1.1. Tuberculosis (TB).....	11
1.1.1. TB como problema de salud pública.....	11
1.1.2. Tuberculosis clínica.....	13
1.1.3. Tratamiento y cepas MDR/XDR	15
1.2. <i>Mycobacterium tuberculosis</i> como patógeno.....	16
1.2.1. Mecanismos de resistencia.....	16
1.2.2. Mecanismos de evasión del sistema inmune.....	18
1.3. Vía de secreción de proteínas en bacterias	20
1.3.1. Secreción en bacterias Gram-negativas	20
1.3.2. Secreción en bacterias Gram-positivas	22
1.3.3. <i>E. coli</i> como modelo de secreción bacteriana	23
1.3.4. Mecanismos de secreción en <i>M. tuberculosis</i>	23
1.4. MarP de <i>M. tuberculosis</i> como diana terapéutica.....	24
1.4.1. Bioquímica estructural y funcional	24
1.4.2. Resolución de la estructura terciaria	25
1.4.3. Genética microbiana	25
1.4.4. Papel en la interacción patógeno-hospedero	26
1.4.5. Papel en los mecanismos de resistencia a acidificación	26
1.5. Expresión de MtMarP en el periplasma <i>E. coli</i>.....	27
1.5.1. Expresión de proteínas de <i>M. tuberculosis</i> en <i>E. coli</i>	27
1.5.2. El periplasma de <i>E. coli</i> como modelo de estudio de proteínas heterólogas	27
1.5.3. El periplasma de <i>E. coli</i> como plataforma para estudiar MtMarP.....	28
2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS.....	30
2.1. Hipótesis	30
2.2. Objetivo general	30
2.3. Objetivos específicos.....	30
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1. Reactivos biológicos y químicos	31
3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos	31
3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos.....	31
3.1.3. Estuches comerciales	31
3.2. Células y medios de cultivo.....	32
3.3. Plásmidos	32
3.4. Equipo y programas computacionales.....	33
3.5. Protocolos generales.....	34
3.5.1. Crecimiento y mantenimiento de células bacterianas	34
3.5.2. Electroforesis en gel de agarosa.....	34
3.5.3. Secuenciación automática de ADN.....	34
3.5.4. Preparación de bacterias competentes.....	34
3.5.5. Transformación bacteriana mediante choque térmico.....	35
3.5.6. Expresión de proteínas (mini-ensayo).....	35

3.5.7. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas.....	35
3.5.8. Fraccionamiento sub-celular en condiciones nativas	36
3.5.9. Cuantificación de proteínas (método de Bradford)	36
3.5.10. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE	36
3.5.11. Inmuno-detección tipo <i>Western Blot</i>	37
3.6. Construcción de pBPelB-<i>MtMarP</i>-Myc.....	37
3.6.1. Amplificación del gen codificante para <i>MtMarP</i>	37
3.6.2. Preparación de componentes para la ligación: pBPelB-BHX-Myc y <i>MtMarP</i>	38
3.6.3. Ligación y obtención de pBPelB- <i>MtMarP</i> -Myc	38
3.7. Construcción de pBAD-PelB-<i>MtMarP</i>-Myc	38
3.7.1. Amplificación de la secuencia codificante para PelB- <i>MtMarP</i> -Myc	38
3.7.2. Preparación de componentes para ligación: pBAD33 y PelB- <i>MtMarP</i> -Myc	39
3.7.3. Ligación y obtención de pBAD-PelB- <i>MtMarP</i> -Myc	39
3.8. Análisis de la actividad proteasa	39
3.8.1. Análisis zimográfico	39
3.8.1. Ensayo universal para proteasas (método de Follin-Ciocalteu)	40
3.9. Análisis del crecimiento bacteriano y efecto del estrés medioambiental	40
3.9.1. Efecto de la sobre-expresión de <i>MtMarP</i> sobre el crecimiento bacteriano.....	40
3.9.2. Ensayo de resistencia a acidificación y análisis de viabilidad.....	41
4. RESULTADOS Y DISCUSIONES	42
4.1. MarP de <i>M. tuberculosis</i>	42
4.2. Obtención del plásmido pBPelB- <i>MtMarP</i> -Myc	42
4.3. <i>MtMarP</i> se localiza en el periplasma de <i>E. coli</i> BW25113/pBPelB- <i>MtMarP</i> -Myc.....	44
4.4. Obtención del plásmido pBAD-PelB- <i>MtMarP</i> -Myc	45
4.5. <i>MtMarP</i> se localiza en el periplasma de <i>E. coli</i> BW25113/pBAD-PelB- <i>MtMarP</i> -Myc.....	46
4.6. La sobre-expresión de <i>MtMarP</i> afecta la cinética de crecimiento bacteriano.....	47
4.7. <i>MtMarP</i> en el periplasma de <i>E. coli</i> confiere resistencia a la acidificación del medio	49
5. CONCLUSIONES	50
6. BIBLIOGRAFIA	51

Índice de figuras y tablas

Figura 1-1. Principales causas de mortalidad nacional (2013). Tuberculosis ocupó el segundo lugar, con una tasa de 2,151 por cada 100,000 habitantes.	11
Figura 1-2. Estadísticas estatales de mortalidad causada por tuberculosis (2013).	12
Figura 1-3. Estructura terciaria de la proteína MarP de <i>M. tuberculosis</i>	25
Figura 1-4. Modelo para la activación del mecanismo de hidrólisis de peptidoglucano mediado por RipA, que a su vez fue activada por MarP, en <i>M. tuberculosis</i> sometida a estrés por acidificación.	27
Figura 1-5. Mecanismo de oxidación e isomerización en el periplasma de <i>E. coli</i>	28
Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB-BHX-Myc.	32
Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pBAD33.	33
Figura 4-1. Arquitectura de dominios de la proteína MarP de <i>M. tuberculosis</i>	42
Figura 4-2. Representación esquemática del plásmido pBPelB-MtMarP-Myc.	43
Figura 4-3. Análisis del producto de PCR MtMarP.	43
Figura 4-4. Análisis y caracterización del plásmido pBPelB-MtMarP-Myc.	44
Figura 4-5. Análisis de localización de MtMarP en las fracciones subcelulares de la cepa BW25113/pBPelB-MtMarP-Myc.	45
Figura 4-6. Representación esquemática del plásmido pBAD-PelB-MtMarP-Myc.	45
Figura 4-7. Análisis de localización de MtMarP en las fracciones subcelulares de la cepa BW25113/pBAD-PelB-MtMarP-Myc.	46
Figura 4-8. Cinética de crecimiento de los cultivos de <i>E. coli</i> portadora de los plásmidos pBAD33 y pBAD-PelB-MtMarP-Myc, en condiciones basales y de inducción de la expresión de MtMarP.	48
Figura 4-9. Análisis de viabilidad de <i>E. coli</i> BW25113 portadora de los plásmidos pBAD33 y pBAD-PelB-MtMarP-Myc en respuesta al valor de pH del medio.	49
Tabla 1-1. Mecanismos de acción de algunos de los fármacos anti-TB de uso común en protocolos de tratamiento terapéutico.	17
Tabla 3-2. Cepas de <i>Escherichia coli</i> usadas en el presente estudio.	32

Abreviaturas

°C	Grados Celsius o centígrados
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Amp	Ampicilina
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosín trifosfato
BSA	Albumina de suero bovino
CMI	Concentración mínima inhibitoria
dNTPs	Deoxirribonucleótidos trifosfatados
DO	Densidad óptica
FC	Follin-Ciocalteu
GTP	Guanosín trifosfato
h	Horas
Hsp	Proteínas de choque térmico
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
INH	Isoniazida
IPTG	Isopropil- β -D-tiogalactopiranosido
LB	Luria-Bertani
LBST	Lisado bacteriano soluble total
M, mM	Molar, milimolar
MarP	Proteína micobacteriana de resistencia a acidificación
MDR	Resistencia múltiple a fármacos
mg, μ g	Miligramos, microgramos
MHC	Complejo mayor de histocompatibilidad
min	Minutos
ml, μ L	Mililitros, microlitros
mm, nm	Milímetros, nanómetros
MPM	Marcador de peso molecular
NAD ⁺	Nicotín-adenín dinucleótido, oxidado
NADH	Nicotín-adenín dinucleótido, reducido
OMS	Organización Mundial de la Salud
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la ADN-polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
SIDA	Síndrome de inmunodeficiencia humana adquirida
SRP	Partícula de Reconocimiento de Señal
TB	Tuberculosis
TCEP	Tris(2-carboxietil) fosfina
TEMED	Tetrametiletilendiamina
TNF	Factor de necrosis tumoral
ufc	Unidades formadoras de colonia
V	Volts
VIH	Virus de inmunodeficiencia humana
XDR	Resistencia extendida a fármacos

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Tuberculosis (TB)

1.1.1. TB como problema de salud pública

La tuberculosis es una infección bacteriana que afecta a una gran parte de la población humana, prevaleciendo como una de las principales causas de muerte por enfermedades infecciosas en todo el mundo, sólo superada por el SIDA [Zhao *et al.*, 2014]. En el año 2014, la Organización Mundial de la Salud (OMS) reportó alrededor de 1.5 millones de defunciones por año ocasionadas por esta bacteria. Si bien, la tasa de mortalidad disminuyó considerablemente, con respecto a la reportada en 1990, el informe del 2015 mostró una cifra alarmante: 9.6 millones de casos nuevos de TB, una cifra significativamente mayor con respecto a otros años, lo cual significa que la erradicación de la enfermedad aún está fuera de nuestro alcance [Gandhi *et al.*, 2010], estos hechos definen como una prioridad el diseño e implementación de nuevas alternativas para diagnóstico temprano y oportuno de pacientes portadores de *M. tuberculosis* [Drobnieski *et al.*, 2003].

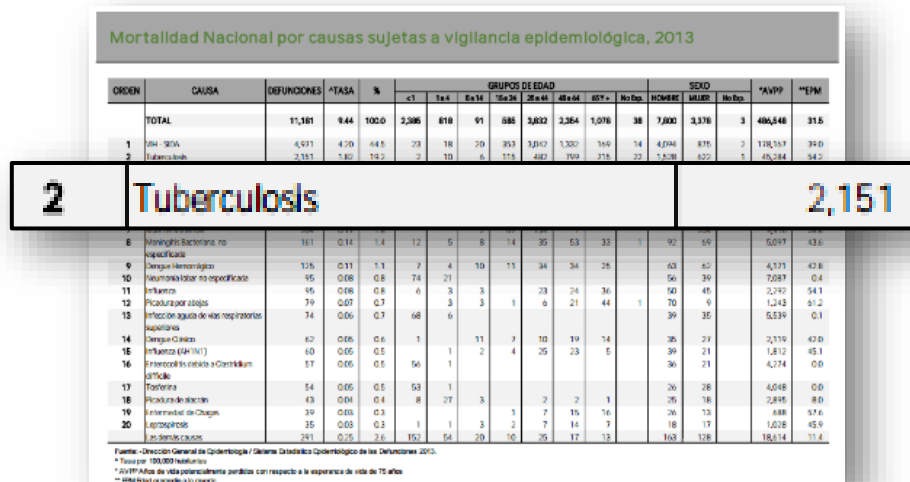


Figura 1-1. Principales causas de mortalidad nacional (2013). Tuberculosis ocupó el segundo lugar, con una tasa de 2,151 por cada 100,000 habitantes.

Fuente: Dirección General de Epidemiología, Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (Reporte 2013). NOTA: Para fines didácticos, sólo se resalta el valor de interés; para conocer los otros valores, se recomienda consultar la fuente (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>).

Hoy en día, la situación epidemiológica de la tuberculosis deriva en la necesidad de crear nuevos métodos de diagnóstico y propuestas farmacológicas más eficientes [Wilson, 2013], como lo menciona el Dr. Mario Raviglione, director del Programa Mundial contra la Tuberculosis de la OMS: “...todavía nos enfrentamos a la carga que supone la muerte de 4400 personas al día, cifra inaceptable en una era en la que se pueden diagnosticar y curar prácticamente todas las personas con TB...”.

Desde 1993, la OMS mantiene a la TB en estado de prioridad como emergencia a nivel mundial, primordialmente por la estrecha asociación TB-SIDA y por la aparición de cepas resistentes a los medicamentos [Koch et al., 2014].

En México, VIH/SIDA y TB son las dos principales causas de mortalidad, siendo responsables del 63.7% del total de las defunciones sujetas a vigilancia epidemiológica en el año 2013. En ese reporte anual, dos datos son especialmente meritorios de resaltar: (i) TB se ubicó en el segundo lugar nacional, con una tasa de 2,151 defunciones por cada 100,000 habitantes (Figura 1), y (ii) Baja California ocupó el primer lugar, contribuyendo a la tasa nacional con 270 defunciones, registrando una tasa estatal de 8 muertes por cada 100,000 habitantes (Figura 2) [Dirección General de Epidemiología].

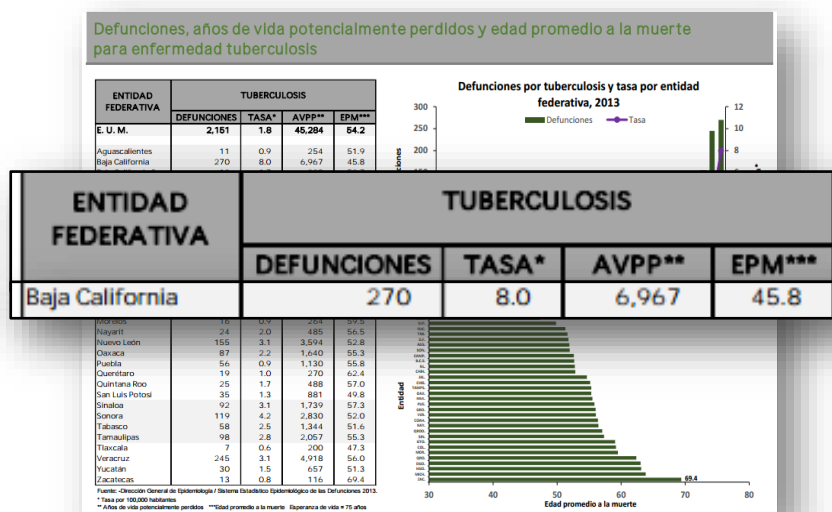


Figura 1-2. Estadísticas estatales de mortalidad causada por tuberculosis (2013).

Fuente: Dirección General de Epidemiología, Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones (Reporte 2013). AVPP, años de vida potencialmente perdidos. EPM, edad promedio de vida. Expectativa de vida de 75 años. NOTA: Para fines didácticos, sólo se resalta el valor de interés; para conocer los otros valores, se recomienda consultar la fuente (<http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/>).

1.1.2. Tuberculosis clínica

Cuadro clínico. De acuerdo al manual de salud “Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México”, la TB pulmonar es una de las manifestaciones clínicas más frecuentes de la infección, ya que representa el principal punto de ingreso del patógeno al organismo humano, y se caracteriza por los siguientes signos y síntomas: tos persistente (por 15 días o más) con expectoración, astenia, pérdida de peso, fiebre, diaforesis nocturna, anorexia, cansancio, decaimiento, diarrea, caquexia, y hemoptisis (flema con sangre) [Secretaría de Salud]¹.

Diagnóstico. Alrededor del mundo, muchos países siguen dependiendo de la baciloscopía de esputo para diagnosticar TB. Sin embargo, esta técnica presenta dos grandes desventajas: (i) solo detecta la mitad de los casos, y (ii) es incapaz de distinguir cepas farmacorresistentes [Drobniewski *et al.*, 2003]. En 2010, la OMS recomendó el uso de la prueba rápida Xpert[®] MTB/RMP, la cual es una prueba molecular que detecta de forma simultánea al patógeno y su resistencia a rifampicina (el fármaco más importante contra la infección). Recientemente, fue recomendada como prueba de diagnóstico inicial para todas las personas con signos y síntomas de TB. Actualmente, más de 100 países ya la utilizan y, en 2015, se reportaron ventas mundiales mayores a 6 millones de cartuchos [OMS].

Con respecto al manual de salud antes citado¹, se considera como “Caso de Tuberculosis Confirmado” a todo paciente con cuadro clínico compatible con TB que cumpla, cualesquiera de los siguientes criterios:

1. Aislamiento de *Mycobacterium tuberculosis* por cultivo.
2. Resultado positivo en la baciloscopía.
3. Lesiones histopatológicas (biopsia, autopsia) compatibles con TB.
4. Detección de genes de micobacterias por métodos de biología molecular.
5. Cuantificación de adenosín-desaminasa (ADA): mayor a 40 U/mL para TB peritoneal y pleural; o mayor a 7 U/mL para infección del sistema nervioso central (SNC).
6. Antecedente epidemiológico de convivencia con un caso bacilífero (BK [+]).
7. Reactor al PPD, con o sin antecedente de vacunación con BCG.
8. Respuesta favorable al tratamiento anti-TB y alguno de los siguientes estudios de gabinete: (a) TB pulmonar: radiografías de tórax postero-anterior y lateral pueden mostrar imagen de síndrome del lóbulo medio, derrame pleural, ensanchamiento mediastinal o patrón miliar; (b) TB ganglionar: ultrasonido con imágenes de material calcificado y líquido; (c) TB del SNC: la tomografía computarizada (TAC) de cráneo puede mostrar datos de aracnoiditis e hidrocefalia;

¹ Obtenido el día 29 de enero de 2017 (como documento PDF) del sitio: http://www.cenaprece.salud.gob.mx/programas/interior/micobacteriosis/normatividad_manuales.html.

en tanto la radiografía de cráneo, datos de hipertensión endocraneana; (d) TB ósea o enfermedad de Pott: radiografías de columna vertebral anteroposterior y lateral muestran destrucción de las vértebras dorsolumbares y rotoxiifoscoliosis. Radiografías de huesos largos muestran fracturas patológicas; (e) TB genitourinaria: urografía excretora muestra imágenes tortuosas debido a la rigidez de los uréteres; (f) TB abdominal: ultrasonido o tomografía axial computarizada muestra ascitis e imágenes compatibles con tabicaciones. Por laparoscopia se observan lesiones granulomatosas, ascitis y fibrina.

Patogénesis. Como se ha descrito anteriormente, la TB es una enfermedad altamente infecciosa y el desarrollo de la enfermedad será, por lo tanto, determinado primordialmente por la respuesta inmune del paciente [Gupta et al., 2012]. La principal vía de diseminación es la exhalación de microgotas, por parte de pacientes portadores del agente causal, y la inhalación de éstas por individuos sanos. Adicionalmente, se ha observado que la TB puede adquirirse vía administración subcutánea o intradérmica de la micobacteria [Reece et al., 2016].

Por la vía aérea (exhalación-inhalación), el principal órgano de infección es el pulmón. Una vez expuesto al patógeno, el organismo desencadena la respuesta inmune celular (principalmente macrófagos), en primera instancia, buscando concentrar a las micobacterias en focos de infección donde pueda controlarla con mayor facilidad. Con esto, cerca del 90% de los casos se mantendrá como infección latente y asintomática, y el resto desarrollará la enfermedad, ya sea en fase aguda o crónica [Flynn, et al., 2003]. Durante esta primera etapa, las micobacterias solo son capaces de duplicarse dentro del macrófago alveolar; en tanto la respuesta inmune se ve fortalecida por la migración de monocitos hacia el sitio de infección.

Cuando el macrófago alveolar es lisado por el patógeno, inicia la formación de un material caseoso sólido, donde las micobacterias pueden permanecer en estado latente o infectar a los monocitos de reciente migración al sitio de infección. En este punto, tanto el título de micobacterias presentes como la oportuna activación de los monocitos son determinantes en el establecimiento de la enfermedad [Law et al., 2011]: si los monocitos activados apropiadamente son capaces de superar a las micobacterias, el desarrollo de la enfermedad se suprime (mediante la encapsulación del patógeno en el material caseoso sólido); sin embargo, si la activación de monocitos es moderada (o ineficiente), la infección y lisis de éstos procederá, favoreciendo la formación de un material caseoso licuado, donde las micobacterias podrán reproducirse, por primera vez fuera del monocito (o macrófago) y migrar a otras regiones del pulmón [Schlossberg, 2011], desarrollando una respuesta de hipersensibilidad tardía (por parte del sistema inmunológico) y promoviendo tanto la degradación de tejido como la formación de regiones hipóxicas, donde se mantendrán en estado latente [Gupta et al., 2012].

En casos severos, las micobacterias logran diseminarse a otros órganos o tejidos del cuerpo, promoviendo el desarrollo de otros tipos de TB, tales como ótica, oftálmica, genitourinaria, músculo-esquelética, cardiovascular, intestinal, peritoneal, cutánea, miliar, hígado-biliar, y del SNC, entre otras [Marais *et al.*, 2005]. Un caso particular es la co-infección con el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), donde los pacientes portadores presentan una cantidad de linfocitos T CD4⁺ disminuida, comprometiendo la activación adecuada de los macrófagos y, por ende, promoviendo la diseminación del patógeno en todo el organismo [Schlossberg, 2011].

1.1.3. Tratamiento y cepas MDR/XDR

Los esquemas de tratamiento anti-TB se adaptan constantemente en consideración a la evolución de la problemática mundial. Diferentes regímenes de dosificación han sido utilizados y evaluados; siendo el “Tratamiento Acortado Estrictamente Supervisado (TAES)” el esquema terapéutico con mayor índice de eficacia, cerca del 95% [Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México]. TAES consta de una fase inicial intensiva con cuatro fármacos anti-TB de primera línea: isoniazida, rifampicina, pirazinamida y etambutol, 7 días a la semana durante 8 semanas (completando 56 dosis), seguida de una fase de continuación con 2 fármacos anti-TB: isoniazida y pirazinamida, 7 días a la semana durante 18 semanas (completando 126 dosis). Las dosis no administradas (perdidas) pueden conducir al fracaso terapéutico, a la recaída, y a la farmacorresistencia [CDC, 2014].

Los fármacos anti-TB más comunes tienen décadas utilizándose. Alrededor del mundo, se ha comprobado la existencia de cepas resistentes a por lo menos un fármaco. Este mecanismo de defensa bacteriano surge como consecuencia de un mal manejo de tratamiento, ya sea por prescripción incorrecta, mala calidad de los medicamentos, o interrupción prematura del tratamiento [Jassal *et al.*, 2009].

La TB multirresistente (TB-MDR) es causada por una cepa que no responde al tratamiento con isoniazida (INH) y rifampicina (RMP), los dos medicamentos antituberculosos de primera línea más eficaces (actualmente disponibles). La TB-MDR puede ser tratada y curada con medicamentos de segunda línea. Sin embargo, las opciones de tratamiento son limitadas y la farmacoterapia es de larga duración (hasta dos años de tratamiento), además de que los medicamentos son costosos y potencialmente tóxicos [Law *et al.*, 2011]. En algunos casos, la enfermedad puede alcanzar un grado de farmacorresistencia aún más preocupante: TB ultrarresistente (TB-XDR), la cual es causada por cepas que no responden a los medicamentos de primera y segunda línea, dejando al paciente sin otras opciones de tratamiento [Jassal *et al.*, 2009]. En 2015, en todo el mundo, se registraron cerca de 480

mil casos de TB-MDR y, adicionalmente, alrededor de 100 mil RMP-resistentes. Por otro lado, aproximadamente el 9.5% de los casos de TB-MDR presentaban TB-XDR.

En todo el mundo, sólo el 52% de los pacientes infectados con TB-MDR y el 28% con TB-XDR reciben actualmente un tratamiento eficaz [Zhang *et al.*, 2009]. En 2016, la OMS aprobó la aplicación de un régimen normalizado de corta duración para pacientes con TB-MDR clásica; es decir, en los que no se han detectado cepas resistentes a los fármacos anti-TB de segunda línea. Sin embargo, en los pacientes con TB-XDR o portadores de cepas resistentes a fármacos anti-TB de segunda línea, no se recomienda utilizar el régimen normalizado, por lo que deberán seguir el tratamiento convencional más la adición de uno de los nuevos fármacos (bedaquilina y delamanida) [OMS].

Algunos aislados clínicos han mostrado diferentes grados de resistencia. Ante esto, y para normalizar criterios, las cepas micobacterianas se clasifican en: (i) monorresistentes, cuando exhiben resistencia sólo a un fármaco de primera línea; (ii) polirresistentes, cuando muestran resistencia a más de un fármaco de primera línea, con excepción de la combinación INH-RMP; (iii) multirresistentes, cuando presentan resistencia a la combinación INH-RMP; y (iv) ultrarresistentes (o de resistencia extendida), cuando despliegan resistencia a INH y RMP, a una quinolona, y por lo menos a un fármaco inyectable de segunda línea (capreomicina, kanamicina, amikacina)¹.

Los mecanismos de acción de algunos fármacos anti-TB se muestran en la Tabla 1-1.

1.2. *Mycobacterium tuberculosis* como patógeno

M. tuberculosis, el patógeno responsable de un significativo número de muertes al año, en todo el mundo, a menudo causa infecciones asintomáticas o latentes, y sólo el 10% de los infectados desarrollan infección activa. En respuesta al patógeno, el paciente desarrolla una fuerte respuesta inmune, desencadenando la activación de linfocitos T, tanto CD4⁺ como CD8⁺, y la producción de anticuerpos específicos, dirigidos contra antígenos de la micobacteria [Flynn *et al.*, 2003].

1.2.1. Mecanismos de resistencia

A nivel genético, la resistencia a un fármaco anti-TB se debe a mutaciones espontáneas, a una frecuencia 1 por cada 10⁶ a 10⁸ replicaciones celulares; ya que los elementos móviles típicos, como plásmidos o transposones, no participan en *M. tuberculosis*. Con esto, la probabilidad de desarrollar resistencia a tres fármacos, administrados simultáneamente, se estima en 10⁻¹⁸ a 10⁻²⁴ [Zhang *et al.*, 2009]. Por lo tanto, el fenotipo MDR/XDR es ocasionado por acumulación secuencial de mutaciones en diferentes genes implicados en monorresistencia a fármacos [Wade *et al.*, 2004].

Tabla 1-1. Mecanismos de acción de algunos de los fármacos anti-TB de uso común en protocolos de tratamiento terapéutico.

Fármaco	Mecanismos de acción
Rifampicina	Interfiere con la síntesis de ARN, mediante unión a la subunidad β de la ARN-polimerasa.
Pirazinamida	Pro-fármaco que requiere conversión a su forma activa, ácido pirazinoico (POA), mediante acción de la pirazinamidasas /nicotinamidasas (codificada por el gen <i>pncA</i>). El pH ácido extracelular facilita la formación de POA protonado no cargado, el cual después de atravesar la membrana y acumularse intracelularmente altera el potencial de membrana en <i>M. tuberculosis</i> .
Etambutol	Interfiere con la biosíntesis del arabinogalactano de la pared celular, inhibiendo la polimerización e induciendo la acumulación de D-arabinofuranosil-P-decaprenol (un intermediario en la biosíntesis de arabinanos).
Estreptomina	Inhibe la biosíntesis de proteínas mediante interacción con la subunidad 30S del ribosoma bacteriano; específicamente, con la proteína ribosomal 12S y el ARN ribosomal 16S, causando una lectura errónea del ARN mensajero.
Fluoroquinolonas	Inhiben tanto la ADN-girasa (ADN-topoisomerasa II) como la ADN-topoisomerasa IV, dando como resultado la muerte bacteriana. <i>M. tuberculosis</i> expresa una ADN-girasa tetramérica, conformada por las subunidades A y B (A ₂ B ₂), codificadas por los genes <i>gyrA</i> y <i>gyrB</i> .

Fuente: Wade, 2004.

Resistencia a isoniazida (INH). A la fecha, la resistencia a fármacos anti-TB con mayor frecuencia observada en cepas resistentes es contra isoniazida (INH-resistentes, $f = 10^{-5}$ a 10^{-6}). INH sólo muestra actividad contra micobacterias en crecimiento [Morlock et al., 2003]. Aislados clínicos INH-resistentes (CMI > 5 $\mu\text{g/mL}$) frecuentemente exhiben pérdida de la actividad catalasa-peroxidasa, catalizada por la enzima KatG, y muestran la mutación *katG* S315T como genotipo de mayor frecuencia [Musser et al., 1996]. Por otro lado, la resistencia a INH también ha sido atribuida a mutaciones en la región promotora del operón *mabA/inhA*, causando sobre-expresión de la proteína InhA, o por mutaciones en la secuencia codificante del gen *inhA*, disminuyendo la afinidad de InhA hacia el complejo de INH-NAD⁺ [Morlock et al., 2003]. Adicionalmente, también se ha reportado que las mutaciones en *inhA* confieren resistencia cruzada a etionamida (ETH), un fármaco estructuralmente relacionado a INH [Wade et al., 2004].

Resistencia a rifampicina (RMP). Las cepas RMP-resistentes ocurren con una frecuencia de 10^{-7} a 10^{-8} , siendo tres residuos (516, 526, y 531) de la proteína RpoB los que presentan mayor incidencia de mutación y que, generalmente, rinden como resultado una resistencia de alto nivel (CMI > 32 $\mu\text{g/mL}$) [Zhang et al., 2009].

Resistencia a pirazinamida (PZA). Las mutaciones que confieren resistencia a PZA son muy diversas y dispersas a lo largo de la región codificante del gen *pncA*. A pesar de esto, se han reportado

cepas PZA-resistentes que no tienen mutaciones en tal región, lo que sugiere la existencia de mutaciones en un regulador de *pncA* o en su región promotora [Nijire et al., 2015].

Resistencia a etambutol (EMB). La enzima arabinosil transferasa, codificada por *embB*, está implicada en la síntesis del arabinogalactano y es la diana terapéutica de EMB. Las cepas EMB-resistentes muestran una CMI > 7.5 µg/mL. Las mutaciones en el gen *embB* ocurren con una frecuencia de 10^{-5} ; sin embargo, alrededor del 35% de las cepas EMB-resistentes no exhiben mutaciones en tal gen, lo que sugiere la existencia de otros mecanismos de resistencia asociados [Da Silva et al., 2011].

Resistencia a antibióticos aminoglucósidos. Diferentes mutaciones en el gen *gidB*, que codifica para una 7-metilguanosina metiltransferasa específica para el ARN-ribosomal 16S, se han identificado como la causa de resistencia de bajo nivel a estreptomina (SM), en un tercio de los aislados SM-resistentes. Por otro lado, mutaciones en el gen *rrs*, codificante para el ARN-ribosomal 16S, han sido asociadas con la resistencia de alto nivel a kanamicina y amikacina, antimicrobianos inhibidores de la síntesis de proteínas mediante la modificación de estructuras ribosómicas [Zhang et al., 2009].

Resistencia a fluoroquinolonas (FQ). Los genes *gyrA* y *gyrB* contienen regiones determinantes en la resistencia a quinolonas (*gyrA*: 320 pb; *gyrB*: 375 pb), las cuales conservan la mayor frecuencia de mutaciones en cepas FQ-resistentes. Generalmente, dos mutaciones en *gyrA*, o mutaciones concomitantes en *gyrA* y *gyrB*, son necesarias para el desarrollo de altos niveles de resistencia [Wade et al., 2004].

1.2.2. Mecanismos de evasión del sistema inmune

El mecanismo anti-TB más estudiado de los macrófagos activados es el proceso mediado por la enzima óxido nítrico sintasa 2 (NOS2), que genera intermediarios reactivos de nitrógeno (IRN) altamente tóxicos. Sorprendentemente, *M. tuberculosis* ha desarrollado diversos sistemas para evadir la toxicidad por IRN. Por ejemplo, se ha observado que la peroxirredoxina AhpC (alquilhidroperóxido reductasa) confiere protección a la toxicidad por IRN. Además, un complejo anti-oxidante, dependiente de NADH, conformado por AhpC, Lpd (dihidrolipoamida deshidrogenasa), SucB (dihidrolipoamida succiniltransferasa), y AhpD (una tioredoxina) exhibe actividad peroxidasa y peroxinitrito reductasa [Flynn et al., 2003].

La fusión de fagosomas, que contienen al patógeno, con lisosomas es un evento complejo y regulado, que culmina en la formación de fagolisosomas. Para persistir en la célula hospedera, *M. tuberculosis* retrasa la maduración del fagosoma, evadiendo así el efecto antimicrobiano del lisosoma. Además, una vez formado el fagolisosoma, mantiene un ambiente intrafagosomal propicio para su

persistencia. Así mismo, se ha reportado que la detención de la maduración de fagosomas se asocia con la retención aberrante de la proteína Rab5, una GTPasa que se encuentra en endosomas tempranos, pero no tardíos [Saviola *et al.*, 2013].

El complejo lipoarabinomano manosilado, glucolípido asociado a la pared celular de la micobacteria, es capaz de atenuar la actividad de hVPS34, una fosfatidilinositol-3-OH cinasa que inhibe el reclutamiento de EEA1 (autoantígeno de endosoma temprano 1). Interesantemente, hVPS34 y EEA1 (efectores de Rab5) están implicados en la actividad normal y maduración de fagosomas. Además, se ha observado que la celubrevina, una proteína SNARE (receptor soluble de unión a proteínas NSF) implicada en la maduración fagosomal, existe en una forma aberrante en los fagosomas infectados con micobacterias, lo que sugiere que *M. tuberculosis* puede alterar el proceso de maduración del fagosoma mediante modificación (directa o indirecta) de la celubrevina [Kusner, 2005].

Otro medio por el cual las micobacterias pueden afectar la maduración del fagosoma es a través de la interacción con coronina-1, una proteína de la familia WD que se une a actina. Esto se debe a que, la retención de coronina-1 en la superficie de fagosomas infectados previene la formación del fagolisosoma; así, el patógeno evade los efectos citotóxicos de las enzimas lisosomales [Kusner, 2005].

Las células CD4 β T, que producen citocinas como IFN- γ y TNF- α , son cruciales para el control de la infección por *M. tuberculosis*. El reconocimiento de macrófagos infectados, por parte de CD4 β T, depende de la presentación de antígenos micobacterianos, vía MHC clase II. Un reconocimiento deficiente CD4 β T \rightarrow macrófago ha sido atribuido a tres factores: (i) secuestro intracelular de las moléculas MHC de clase II, (ii) disminución de la expresión del transactivador de clase II (C_{II}TA), e (iii) inhibición de vías de señalización activadas por IFN- γ en macrófagos [Flynn *et al.*, 2003].

Una vez que la infección ha progresado, las micobacterias se replican dentro de macrófagos parcialmente activados. Las células T llegan a la zona infectada y se desarrolla una estructura inmune, el granuloma. A partir de este punto, la progresión de la enfermedad está condicionada al estado inmunológico del hospedero: (1) si es inmuno-competente, puede activar eficientemente a macrófagos y, probablemente, controlar la infección; en cambio (2) si está inmuno-comprometido, el patógeno puede seguirse replicando en macrófagos parcialmente activados. Por lo tanto, si la infección progresa, el centro de los granulomas se degenera y forman una sustancia caseosa [Schlossberg, 2011].

Las micobacterias parecen tener una capacidad intrínseca para resistir el estrés por acidificación, ya que poseen una gruesa pared celular cerosa y una membrana externa que le permiten

resistir el pH del fagosoma. Se cree que ésta barrera física inhibe la entrada de protones al interior de *M. tuberculosis* [Song *et al.*, 2011]. Por otro lado, la limitación de nutrientes (estrés nutricional) parece ser la causa de que el patógeno entre en fase estacionaria de crecimiento. En ésta, el gen *whiB1*, que codifica para un regulador transcripcional que responde al estado redox, se encuentra más activo. De igual manera, producen una sustancia única, el micotiol, que combate el estrés oxidativo, ya que se oxida cuando esta condición predomina, formando el micotión y evitando afección a otras moléculas. Las enzimas superóxido dismutasa (SOD) y catalasa-peroxidasa (KatG) apoyan la resistencia al daño oxidativo [Shi *et al.*, 2008].

El estrés por calor puede causar daño a *M. tuberculosis*. En respuesta, el patógeno sobre-expresa un conjunto de chaperonas que asisten al replegamiento de proteínas. La proteína α -cristalina (Acr-2) es activada por choque térmico y ha mostrado funcionalidad como chaperona molecular. Otras chaperonas, como Hsp65 y Hsp70, han sido identificadas extracelularmente y participan como potentes estimuladores de la respuesta inflamatoria [Anand *et al.*, 2010].

En condiciones de baja concentración intracelular de hierro, *M. tuberculosis* produce sideróforos que muestran una mayor afinidad hacia el hierro, con respecto a proteínas del hospedero (transferrina, lactoferrina y ferritina), sustrayéndolo de las reservas de almacenamiento del hospedero [Tullius *et al.*, 2011]. Por otro lado, muestra una respuesta bifásica a una baja tensión de oxígeno. Inicialmente, la respuesta es controlada por el sistema de dos componentes DosS/DosT-DosR, el cual regula el aumento de la transcripción de genes de latencia. DosR es el regulador transcripcional, en tanto DosS y DosT son sensores que responden a la baja tensión de oxígeno [Park *et al.*, 2003; Kumar *et al.*, 2007]. En las mismas condiciones, se sobre-expresa la chaperonina HspX, ya que está regulada por DosR, la cual asiste el replegamiento de proteínas dañadas por la baja tensión de oxígeno [Fallow *et al.*, 2010]. Curiosamente, la mitad de los genes activados por DosR regresan a su nivel basal después de 24 horas. Por tal motivo, después de este periodo, otros reguladores desempeñan un papel clave en la respuesta a hipoxia, como *sigC* y *sigE* [Manganelli *et al.*, 2004].

1.3. Vía de secreción de proteínas en bacterias

1.3.1. Secreción en bacterias Gram-negativas

En bacterias Gram-negativas, como *Escherichia coli*, las proteínas secretadas tienen que atravesar al menos una de las dos membranas celulares, interna y externa, las cuales difieren en composición y función. Para esto, han evolucionado y perfeccionado varios sistemas de secreción, denominados del I al V, que difieren significativamente y están ampliamente distribuidos [Mergulhao *et al.*, 2005].

La vía de secreción tipo I transporta proteínas a través de las dos membranas celulares en un solo paso, sin estancia intermedia en el periplasma. Esta vía es usada para la secreción de toxinas de alto peso molecular y exotoxinas. En este proceso, participan las proteínas de membrana interna HlyB y HlyD, que pertenecen a la familia de transportadores ABC (*ATP Binding Cassette*), y la proteína de membrana externa TolC [Fernández & De Lorenzo, 2001]. HlyB y HlyD forman un complejo estable, que se puede unir con la secuencia de señal HlyA y ATP en el citoplasma [Sung Ho Yoon, 2010]; después, un trímero de TolC, conformando un poro hidrofóbico, se une al complejo para formar un canal entre las dos membranas. La hidrólisis de ATP, por acción de HlyB, es necesaria para el transporte de proteínas y, al finalizar el proceso, TolC se separa. La formación de enlaces disulfuro sucede durante la translocación del péptido y es independiente del sistema de DsbA/DsbB [Mergulhao et al., 2005].

La secreción tipo II se lleva a cabo mediante dos etapas: una translocación inicial al periplasma y una posterior al espacio extracelular. El transporte desde el citosol hacia el periplasma está mediado por dos mecanismos, denominados *Secy Tat* [Sung Ho Yoon, 2010]. En el mecanismo *Sec*, la ribonucleoproteína *SRP* (*Signal Recognition Particle*) o la chaperona citosólica *SecB* dirigen al polipéptido nascente hacia la membrana interna, donde interacciona con una translocasa, conformada por la proteína periférica *SecA* (que funciona como motor molecular durante la translocación) y un complejo de tres proteínas integrales (*SecY*, *SecE*, y *SecG*; las cuales constituyen un canal de translocación) [Natale et al., 2008]. En el mecanismo dependiente de *Tat*, inicialmente se reconoce a la proteína (plegada) unida el complejo *TatBC* y, enseguida, la oligomerización de *TatA* en la membrana permite la translocación de la proteína [Mergulhao et al., 2005].

El sistema de secreción tipo III permite a las bacterias adherirse a superficies del hospedero, para así poder introducir proteínas especializadas a través de la membrana plasmática. Este mecanismo representa un factor de virulencia en bacterias con características patógenas [Sung Ho Yoon, 2010]. En este, participan alrededor de 20 proteínas *Ysc*, la mayoría localizadas en la membrana interna y con homología a componentes de la biosíntesis flagelar [Hueck, 1998]. *YscC* se encuentra localizada en la membrana externa y tiene acción de secretina (al igual que *YscD*, *YscR*, *YscU*, *YscV*, *YscS*, y *YscT*). Aparentemente, *YscN* puede ser la fuente de energía para el proceso de secreción, ya que posee motivos de unión a ATP [Cornelis et al., 2000].

Un complejo similar al *pilus* es formado en el sistema de secreción tipo IV, donde participan 12 proteínas: *VirB1-VirB11* y *VirD4*. Las proteínas *VirB2* y *VirB5* forman el complejo; en tanto, *VirB6*, *VirB8*, y *VirB10* forman un canal en la membrana interna. Las proteínas *VirB4*, *VirB11* y *VirD4* son ATPasas que participan en el proceso de ensamblaje y secreción de las proteínas [Fronzes et al., 2009]. Dos familias de proteínas de membrana externa conforman la vía de secreción tipo V:

los auto-transportadores y el sistema TPS (*two-partner secretion*) [Pallen et al., 2003]. Como este mecanismo opera sólo en la membrana externa, requiere de otro sistema para la translocación hacia el periplasma (p. ej., *Sec*); por lo tanto, los polipéptidos que utilizan esta vía contienen una secuencia señal en su extremo N-terminal [Green et al., 2016; Dubuisson et al., 2001]. La secreción de proteínas al medio extracelular también puede ocurrir mediante difusión simple a través de la membrana externa, debido a pequeñas fugas del contenido del periplasma; por lo tanto, el fenómeno de translocación de proteínas no siempre es mediado por sistemas o mecanismos específicos de transporte [Mergulhao et al., 2005].

1.3.2. Secreción en bacterias Gram-positivas

A diferencia de las Gram-negativas, las bacterias Gram-positivas presentan solo una membrana cubierta por una pared celular gruesa, por lo que es de esperarse que el mecanismo de secreción de proteínas sea diferente [Green et al., 2016]. La vía de secreción *Sec* es el mecanismo más conservado en todas las bacterias. Sin embargo, algunas especies de bacterias Gram-positivas expresan dos proteínas homólogas a *SecA* (las Gram-negativas contienen sólo una), denominadas *SecA1* y *SecA2*. En esos organismos, *SecA1* es esencial para el crecimiento y *SecA2* es requerida en ciertas condiciones de estrés; además, ha sido relacionada con la virulencia [Feltcher et al., 2012].

Algunas bacterias de la familia Streptococci y Staphylococci expresan otro mecanismo, denominado *SecA2-SecY2*. Este sistema consiste de *SecA2*, *SecY2*, y tres proteínas accesorias. Este mecanismo transporta polipéptidos desde el citoplasma hacia la superficie celular, vía *SecA2* [Mistou et al., 2009]. Adicionalmente, codifican para una clase de enzimas hidrolíticas denominadas *sortasas* (Srt), las cuales permanecen ancladas en la superficie celular mediante transpeptidación con proteínas de la pared celular. Los sustratos de algunas *sortasas*; p.ej., SrtA, presentan un dominio hidrófobo y el pentapéptido LPXTG; que son utilizados como señal de reconocimiento y sitio de corte, respectivamente: SrtA corta entre los residuos de Thr y Gly, y une el carboxilo libre del Thr a un residuo de Cys cercano al extremo C-terminal de la *sortasa*. Para finalizar, este intermediario es unido covalentemente a un precursor lipídico que pasará a formar parte de la pared celular, y expondrá a la proteína al espacio extracelular [Mazmanian et al., 1999].

Por otro lado, no todas las proteínas secretadas se mantienen ancladas en la pared celular, algunas son liberadas al espacio extracelular, principalmente por difusión pasiva o mediante la formación de aparatos de secreción especializados [Green et al., 2016]. El *injectosoma* es uno de los aparatos de secreción más conocidos. *Streptococcus pyogenes* utiliza este sistema para introducir al menos un factor de virulencia directamente al citoplasma de la célula hospedera (eucariota): a través de la formación de un poro en la membrana celular eucariótica, acción mediada por citolisina (una

toxina dependiente de colesterol), la bacteria secreta a la NAD glicohidrolasa directamente al citosol [Madden *et al.*, 2001].

Las familias de Mycobacteria y Corynebacteria contienen una pared celular rica en lípidos, la cual sirve como una barrera de protección contra estrés medioambiental (incluida la acción de los antibióticos). Como resultado de esta pared celular, estos grupos bacterianos han generado un mecanismo de secreción altamente especializado, compuesto por las proteínas integrales EccB, EccC, EccD, EccE, y MycP. Las cuatro proteínas Ecc se encargan de formar un poro, mediante el cual la proteína de secreción será translocada, y la proteína MycP (una proteasa) aparentemente regula al sistema [Houben *et al.*, 2012].

1.3.3. *E. coli* como modelo de secreción bacteriana

A pesar de la disponibilidad de diferentes sistemas heterólogos de expresión de proteínas, la bacteria *E. coli* sigue siendo una de las alternativas más atractivas, esencialmente por su capacidad de crecimiento rápido en sustratos de bajo costo, está bien caracterizada genéticamente, es relativamente fácil de transformar con ADN exógeno, y existe una amplia variedad de cepas con genotipos específicos [Baneyx, 1999; Rosano *et al.*, 2014; Ho Yoon *et al.*, 2010]. Dependiendo de las características estructurales requeridas en la proteína heteróloga, los sistemas de expresión habitualmente dirigen la producción hacia el citosol o el periplasma bacteriano [Green *et al.*, 2016]. En específico, cuando la actividad funcional de un polipéptido depende de un plegamiento oxidativo correcto, es recomendable la sobre-expresión en el periplasma [Schlegel *et al.*, 2013]. Este compartimiento contiene la maquinaria molecular para un plegamiento apropiado (chaperonas) y la correcta formación de enlaces disulfuro (familia Dsb y PPI) [Mergulhao *et al.*, 2005]. Por otro lado, la mayoría de los sistemas de expresión que se han desarrollado a la fecha, utilizan los sistemas de secreción tipo II (dependientes de *SRP/Sec*), pero no exclusivamente [Pallen *et al.*, 2003].

1.3.4. Mecanismos de secreción en *M. tuberculosis*

Típicamente, *M. tuberculosis* secreta proteínas de la manera clásica: reconocimiento de péptidos señal (N-terminal) y translocación a través de la vía *Sec* [Braunstein *et al.*, 2001]; sin embargo, no expresa la chaperona SecB, que se encarga de escoltar a los polipéptidos no plegados desde el ribosoma (en el citosol) hacia SecA (en la membrana citoplasmática) [DiGiuseppe Champion, 2007]. Por otro lado, muchas proteínas secretadas poseen la secuencia Asp-Pro en el extremo N-terminal, después del sitio de corte de la señal, sugiriendo un mecanismo secundario de translocación a través de la pared celular [Wiker *et al.*, 2000]. Todos los genomas secuenciados de micobacterias codifican para dos proteínas homologas a SecA: SecA1 y SecA2. Mediante ensayos

funcionales, se demostró que sólo SecA1 es esencial; sin embargo, SecA2 (cuyo índice de similitud a SecA1 es bajo) es importante para el proceso de infección, ya que mutantes carentes de SecA2 exhiben un crecimiento lento durante esta etapa, lo que sugiere la existencia de un sustrato dependiente de SecA2 que participa en la interacción con el hospedero [Braunstein et al., 2001].

Adicionalmente, cuenta con un mecanismo de secreción dependiente de *Tat* (*twin-arginine translocator*), que facilita la translocación de proteínas plegadas correctamente a través de la membrana. La secuencia señal de sustratos *Tat* es estructuralmente similar al de sustratos *Sec*; sin embargo, contienen dos motivos de Arg-Arg seguidos de un par de residuos sin carga cerca del extremo N-terminal [DiGiuseppe Champion, 2007]. Como se observa en otras bacterias, *M. tuberculosis* expresa mecanismos alternos, a los sistemas *Sec* y *Tat*, que permiten la secreción de proteínas. Por ejemplo, contiene un equivalente funcional a los sistemas anteriores, denominado ESX-1, que ha sido localizado en el *locus* RD1. Además, el descubrimiento de proteínas, como ESAT-6 (6-kDa early secreted antigen target) y CFP-10 (10-kDa culture filtrate protein), que carecen de secuencias señales de tipo *Sec* y que no son sustratos del sistema ESX-1, sugiere la presencia de mecanismos alternos de secreción de proteínas aún no conocidos [MacGurn et al., 2005].

1.4. MarP de *M. tuberculosis* como diana terapéutica

1.4.1. Bioquímica estructural y funcional

El gen Rv3671c codifica para una serina proteasa integral (denominada MarP), la cual pertenece a un grupo de 38 proteasas conservadas y presentes también en *M. leprae*, *M. bovis*, *M. avium paratuberculosis*, y *M. tuberculosis*. Una de las proteasas que presenta mayor homología con Rv3671c es la proteína HtrA (*high temperature requirement A*) de *Thermotoga maritima*. Los dominios catalíticos de ambas exhiben alrededor del 20% de identidad; sin embargo, Rv3671c no presenta los dominios PDZ (presente en HtrA). Estructuralmente, *Mt*MarP es una proteasa de tipo quimotripsina con la clásica triada catalítica: His235, Asp264, y Ser343. La topología inferida, mediante modelos computacionales, localizó al dominio catalítico (C-terminal) en el periplasma bacteriano (extracelular) y cuatro hélices transmembranales (N-terminal). Aunque aún se desconocen las funciones *in vivo* de esta enzima, se ha demostrado, *in vitro*, que el dominio catalítico es capaz de degradar a caseína y exhibe actividad auto-proteolítica, reconociendo con mayor afinidad la secuencia PKRL/SALL (cortando después de Leu). Este fenómeno aún no ha sido demostrado *in vivo*, por lo que se desconoce su papel en la infección y desarrollo del patógeno [Small et al., 2013]. Adicionalmente, se ha reportado que la actividad auto-proteolítica puede ser inhibida por agentes

reductores, como DTT, TCEP, 2-mercaptoetanol, lo que sugiere un mecanismo de inhibición reversible dependiente de la oxidación [Biswall *et al.*, 2010].

1.4.2. Resolución de la estructura terciaria

Actualmente, ya está disponible la estructura cristalográfica (refinada a 1.3 Å) del dominio catalítico de *MtMarP* (Figura 1-3). La estructura resuelta reveló una proteasa monomérica con un plegamiento similar a tripsina. Como en otras proteasas, dos subdominios barril- β , conformados por seis hojas plegadas- β anti-paralelas, forman la triada catalítica (uno contribuyendo con His235 y Asp264, y otro con Ser343). El análisis comparativo global mostró diferencias importantes con respecto a la estructura de las proteasas HtrA y DegP, las cuales contienen una inserción (*loop*) que participa en la inactivación de la proteasa. Como característica adicional, se observó que Rv3671c despliega un extremo C-terminal carente de estructura secundaria. Como particularidad estructural, se observó que los residuos Cys214 y Cys395 forman un enlace disulfuro, los cuales se encuentran conservados en la familia Rv3671c, pero no están presentes en HtrA. Otra característica distintiva es la formación de un pliegue en la hélice α_2 , cerca de Cys395, el cual marca una unión entre una hélice α y una hélice 3_{10} . Este tipo de pliegue es comúnmente formado por residuos de glicina; sin embargo, en esa posición se localiza al residuo Val377, también conservado en la familia Rv3671c [Biswall *et al.*, 2010].

1.4.3. Genética microbiana

Los primeros ensayos genéticos demostraron que la disrupción del gen Rv3671c (Δ MarP) de *M. tuberculosis* disminuye su habilidad de resistir a condiciones de estrés inducidas por acidificación del medio. De igual manera, ocurrió con la exposición a condiciones oxidantes inducidas por peróxido [Blumenthal *et al.*, 2010]. Además, la variante S343A de Rv3671c fue incapaz de complementar la

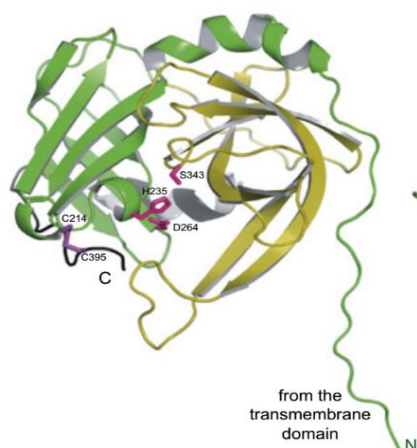


Figura 1-3. Estructura terciaria de la proteína MarP de *M. tuberculosis*.

Representación en listones del dominio extracelular de la serina proteasa MarP de *M. tuberculosis*, los residuos correspondientes a la triada catalítica de encuentran señalados en la estructura de acuerdo a su posición: His235, Asp264, y Ser343.

mutante Δ MarP y revertir la susceptibilidad a condiciones ácidas, lo que sugiere que la proteólisis mediada por MtMarP es requerida para la resistencia a tales condiciones de estrés [Biswas *et al.*, 2010]. Por otro lado, varios estudios genéticos realizados en ratones mostraron que la ausencia de MtMarP atenúa considerablemente la virulencia de *M. tuberculosis* durante las fases crónica y aguda de la infección [Small *et al.*, 2013].

1.4.4. Papel en la interacción patógeno-hospedero

La proteólisis es un factor importante para muchos mecanismos de virulencia bacteriana; específicamente, las proteasas participan en el control de calidad de varios procesos y la regulación de diferentes vías de señalización. Algunas de las proteasas que están involucradas en la patogénesis de *M. tuberculosis* son: Rip1, ClpP1P2, MycP1, y MarP. Los mecanismos de regulación del pH intracelular ya han sido descritos en bacterias; sin embargo, el mecanismo mediante el cual *M. tuberculosis* mantiene la homeostasis del pH intracelular (dentro del fagosoma) es aún desconocido. Existe un grupo de proteínas que responde ante la acidificación del medio, donde figura el transportador de magnesio (MgtC), una proteína de membrana (OmpA), un regulador de dos componentes (PhoPR), un gen regulado por PhoPR (aprABC), y la serina proteasa de membrana MarP (*mycobacterial acid resistance protease*) [Small *et al.*, 2013].

M. tuberculosis es capaz de bloquear la formación del fagolisosoma. Sin embargo, la activación del macrófago, vía IFN- γ , es capaz de promover la fusión del lisosoma y acidificar el fagosoma que contiene a la micobacteria [Vandal *et al.*, 2008]. Después de la fagocitosis, el fagosoma mantiene un pH cercano a 6.2, el cual desciende a valores cercanos a 4.5, al fusionarse con lisosomas. Curiosamente, se piensa que MtMarP ayuda a mantener la envoltura celular de *M. tuberculosis*, confiriendo resistencia a la acidificación y otras condiciones estresantes del medio [Vandal *et al.*, 2008; Small *et al.*, 2013].

1.4.5. Papel en los mecanismos de resistencia a acidificación

Los mecanismos a través de los cuales la proteína MarP participa en la resistencia a la acidificación del medio, incluyendo los sustratos implicados, aún no han sido aún definidos con exactitud. Recientemente, un estudio reportó la identificación de RipA (una hidrolasa del peptidoglucano) como sustrato fisiológico de MtMarP [Botella *et al.*, 2017]. En micobacterias, la endopeptidasa RipA, y su paróloga funcional RipB, son esenciales para la separación celular [Hett *et al.*, 2008; Martinelli & Pavelka, 2016]. Específicamente, basados en ensayos *in vivo* e *in vitro*, se ha propuesto un modelo de activación del mecanismo de hidrólisis del peptidoglucano mediado por

RipA, que a su vez fue activada por acción de MarP (Figura 1-3), el cual ayuda a mantener la viabilidad de *M. tuberculosis* durante el estrés por acidificación del medio [Botella et al., 2017].

1.5. Expresión de *MtMarP* en el periplasma *E. coli*

1.5.1. Expresión de proteínas de *M. tuberculosis* en *E. coli*

Una amplia variedad de proteínas provenientes de *M. tuberculosis* han sido expresadas como polipéptidos recombinantes en *E. coli*. Por ejemplo, ESAT6 y otras codificadas en el *locusRD1* [Amoudy et al., 2008], CYP51 (14 α -demetilasa de estero) [Shavkunov et al., 2002], SenX3 [Huoyang et al., 2013], y MarP [Vandal et al., 2008], entre otras, algunas de estas han sido propuestas como posibles dianas terapéuticas o toxoides para el tratamiento de la tuberculosis. Simultáneamente, se han expresado en forma recombinante varias proteínas cuya función aún se desconoce, tales como el producto del gen Rv3265c [Wu et al., 2011] y diferentes proteínas de membrana [Korepanova et al., 2007], lo que permite estudiar las características bioquímicas, biofísicas, y estructurales del patógeno. Adicionalmente, *E. coli* ha sido utilizada como plataforma celular, modificando cepas y recreando mecanismos que no se encuentran de manera constitutiva en su genoma, como la vía de población: Pup (proteínas similares a ubiquitina), PafA (factor accesorio) y Dop (desamidasa de Pup), permitiendo la evaluación de un mecanismo de modificación post-traduccional recientemente identificado en *M. tuberculosis* [Cerdeira-Maira et al., 2011].

1.5.2. El periplasma de *E. coli* como modelo de estudio de proteínas heterólogas

El periplasma bacteriano ofrece un ambiente altamente oxidante y una eficiente maquinaria que asiste al plegamiento oxidativo de proteínas (residentes o en tránsito hacia el espacio extracelular) [Schlegel et al., 2013]. La formación correcta de enlaces disulfuro es crucial para el plegamiento y estabilidad de la mayoría de las proteínas secretadas. La formación errónea de estos enlaces puede

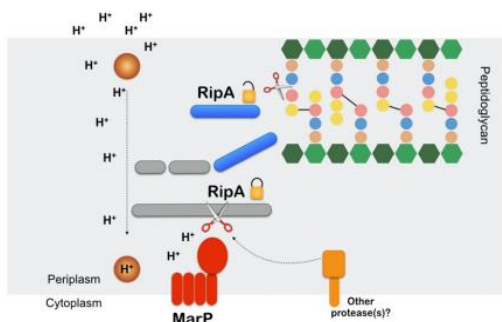
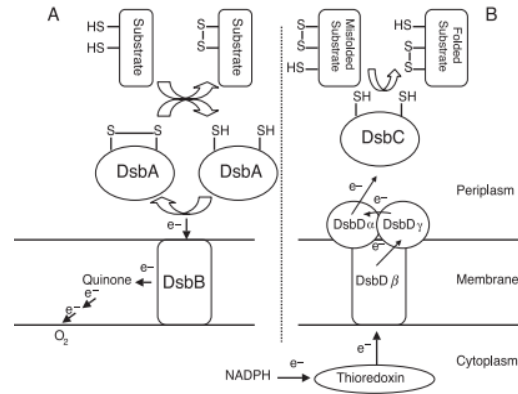


Figura 1-4. Modelo para la activación del mecanismo de hidrólisis de peptidoglucano mediado por RipA, que a su vez fue activada por MarP, en *M. tuberculosis* sometida a estrés por acidificación.

MarP (rojo) puede detectar el estrés por sí sola o, alternativamente, con la asistencia de otra proteína desconocida (marrón). MarP corta a RipA (gris), liberando al dominio C-terminal (azul), que posee actividad hidrolasa sobre el peptidoglucano. En otras condiciones, otras proteasas (naranja) pueden activar a RipA.

Figura 1-5. Mecanismo de oxidación e isomerización en el periplasma de *E. coli*.

(A) DsbA forma enlaces disulfuros nuevos en proteínas no plegadas y es reoxidada por DsbB. En condiciones anaeróbicas DsbB pasa electrones a ubiquinona. (B) DsbC es capaz de reorganizar enlaces disulfuros que no sean nativos y se mantiene reducida por DsbD. DsbD recibe electrones del sistema tioredoxina. La imagen permanece en el idioma original.



conducir a la formación de agregados proteicos o a su degradación proteolítica. En *E. coli*, la formación de enlaces disulfuros es catalizada por acción de la familia de oxidorreductasas periplásmicas Dsb (*disulfide bond formation proteins*), donde DsbA-DsbB se encargan de la formación (oxidación) y DsbC-DsbD del rearrreglo (isomerización) de enlaces disulfuro (Figura 1-4) [Nakamoto *et al.*, 2004]. Además de estas, se requiere la participación de otras moléculas que facilitan el plegamiento correcto de intermediarios y mantienen su solubilidad (como la chaperona Skp), o que disminuyen el estrés en respuesta a la formación de cuerpos de inclusión formados por acumulación de proteínas plegadas incorrectamente (como la peptidil-prolil cis/trans-isomerasa FkpA) [Ow *et al.*, 2010].

1.5.3. El periplasma de *E. coli* como plataforma para estudiar *MtMarP*

La aplicación de *E. coli* como plataforma biológica para el estudio de proteínas heterólogas simplifica los problemas asociados al manejo y disposición de microorganismos patógenos, como *M. tuberculosis*. Además, como célula procariota modelo, ofrece la bondad de ser un organismo cuya genética, bioquímica, y fisiología están bien estudiadas, lo que facilita la generación de sistemas *ad hoc* (mutantes y sus ambientes sub-celulares) para fines específicos. Por otro lado, existe una amplia variedad de sistemas de expresión que pueden ser aplicados para dirigir a las proteínas heterólogas hacia sus diferentes compartimentos subcelulares; p. ej., citosol, periplasma, superficie celular, y espacio extracelular. Inclusive, algunos procesos altamente especializados, como los mecanismos de secreción de proteínas, han sido claramente descritos [Green *et al.*, 2016; Henderson *et al.*, 2004; Franzes *et al.*, 2009; Natale *et al.*, 2008].

El periplasma bacteriano es un compartimiento susceptible a daño por acidificación del medio, ya que se equilibra rápidamente con el entorno extracelular. Ante esto, *E. coli* ha desarrollado varios mecanismos de respuesta protectora al estrés ácido (pH 4.5-6.0), incluyendo descarboxilasas

de aminoácidos, chaperonas periplásmicas, proteínas de membrana externa, y transportadores de protones [Botella *et al.*, 2017], Considerando estos factores, es factible proponer el uso del periplasma de *E. coli* como plataforma sub-celular, ya que posee el ambiente y la maquinaria apropiada, para el estudio de la relación estructura-función de la proteína *MtMarP*. Además, como esta proteína contiene un enlace disulfuro, se ha propuesto que su plegamiento oxidativo es probablemente asistido por una oxidoreductasa, como *MtVKOR* [Small *et al.*, 2013], ya que la funcionalidad de *MtDsbA* aún sigue en debate. Aún más, debido a la disponibilidad de mutantes nulas de *DsbA*, es posible especular sobre el diseño de una estrategia experimental dirigida a establecer la dependencia *MtMarP* para su plegamiento oxidativo asistido por *MtDsbA*.

2. HIPOTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El periplasma de la bacteria *Escherichia coli* es un compartimento sub-celular capaz de proporcionar un medio ambiente propicio para la expresión funcional y caracterización fisiológica de la serina proteasa *MtMarP*.

2.2. Objetivo general

Examinar las propiedades funcionales de la serina proteasa *MtMarP* expresada en el periplasma de *E. coli*, mediante ensayos bioquímicos y fisiológicos, para valorar la factibilidad de aplicar ese compartimiento bacteriano (como plataforma *in-vivo*) en la evaluación funcional de proteínas de *M. tuberculosis* con potencial como diana terapéutica.

2.3. Objetivos específicos

1. Obtener la secuencia codificante para el dominio extracelular de *MtMarP* en fase con la señal PelB (N-terminal) y la etiqueta Myc (C-terminal), mediante una estrategia de sub-clonación por inserción en el plásmido pBPelB-BHX-Myc y producción del vector pBPelB-*MtMarP*-Myc.
2. Obtener la secuencia de fusión PelB-*MtMarP*-Myc bajo el control del promotor de arabinosa (PBAD), mediante una estrategia de sub-clonación por inserción en el vector pBAD33 y producción del plásmido pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc.
3. Analizar la expresión funcional y localización intracelular de la enzima *MtMarP* en la cepa BW25113 de *E. coli*, mediante ensayos de actividad proteolítica y fraccionamiento sub-celular, para verificar su expresión activa en el periplasma bacteriano.
4. Analizar la funcionalidad de *MtMarP* en el periplasma de la cepa BW25113 de *E. coli*, mediante ensayos de resistencia a acidificación y viabilidad celular, para valorar su papel operacional en la fisiología bacteriana ante condiciones estresantes.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Reactivos biológicos y químicos

3.1.1. Reactivos químicos y bioquímicos

Amresco: cloruro de sodio (NaCl). *Becton Dickinson*: agar bacteriológico, extracto de levadura, triptona. *Bio-Rad*: agarosa, azul brillante de *Coomassie*, solución de acrilamida al 30%. *Fermont*: etanol. *FM Science*: 2-mercaptoetanol. *IBI*: ácido etilendiamino-tetra-acético (EDTA), ditionitrotol (DTT), dodecil sulfato de sodio (SDS), glicerol, isopropil- β -D-tio-galactopiranosido (IPTG), Tris (tris[hidroximetil]aminometano), Tritón X-100. *MP Biomedicals*: glicina. *Nestlé*: leche en polvo *Svelty*TM. *Productos Químicos de Monterrey*: cloruro de calcio (CaCl₂), isopropanol. *Scientific Industries*: perlas de vidrio 0.1 mm. *Sigma*: acetona, ácido acético glacial, arabinosa, azul de bromofenol, azul de xilencianol, bromuro de etidio (BrEt), reactivo *CellLytic*TM B, gelatina de porcino, N,N,N',N'-tetra-metil-etilenediamina (TEMED), reactivo de *Bradford*, Tween[®]-20. *Spectrum*: metanol.

3.1.2. Enzimas y otros reactivos biológicos

Agilent: ADN-polimerasa de *Pyrococcus furiosus* (*Pfu* ADN-pol) y su solución amortiguadora 10X. *New England Biolabs*: endonucleasas (BamHI, HindIII, MfeI, NdeI, XbaI, y XhoI), soluciones amortiguadoras 10X para endonucleasas (NEB1 y NEB2), albumina sérica bovina (BSA), ADN-ligasa del bacteriófago T4 (T4 ADN-lig) y su solución amortiguadora 10X, mezcla de deoxirribonucleótidos (dNTPs), marcador de peso molecular para proteínas (*Blue Prestained Protein Standard, Broad Range, 11-190 kDa*) y ADN (*100-bp Ladder* y λ DNA-HindIII). *Qiagen*: 2X *Taq Mix*. *Rockland*: anticuerpo policlonal anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina. *Sigma*: anticuerpo monoclonal anti-Myc.

3.1.3. Estuches comerciales

La purificación de productos de PCR o ADN plasmídico lineal fue realizada empleando el estuche *QIAquick PCR Purification Kit*; la extracción de fragmentos de ADN a partir de gel de agarosa fue llevada a cabo usando el estuche *QIAquick Gel Extraction Kit*; la purificación de ADN plasmídico fue ejecutada utilizando el estuche *QIAquick Spin Miniprep Kit*, los tres de *Qiagen*. La inmuno-detección fue revelada empleando el estuche *AP Conjugate Substrate Kit* de *Bio-Rad*.

Tabla 3-1. Cepas de *Escherichia coli* usadas en el presente estudio.

Cepa	Genotipo	Nomenclatura oxidorreductasa	Fuente [Ref.]
ER2738	F' <i>proA</i> ⁺ <i>B</i> ⁺ <i>lacI</i> ^q Δ (<i>lacZ</i>) <i>M15</i> <i>zff::Tn10</i> (Tet ^R)/ <i>fhuA2 glnV</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) <i>thi-1</i> Δ (<i>hsdS-mcrB</i>)5	Silvestre: <i>dsbA</i> ⁺	New England Biolabs
BW25113	Δ (<i>araD-araB</i>)567 Δ <i>lacZ</i> 4787(:: <i>rrnB-3</i>) λ <i>rph-1</i> Δ (<i>rhaD-rhaB</i>)568, <i>hsdR514</i>	Silvestre: <i>dsbA</i> ⁺	CGSC [Baba, 2006]
JCB570	<i>araD139</i> Δ (<i>araABC-leu</i>)7679 <i>galU galK</i> Δ (<i>lac</i>)X74 <i>rpsL thi</i> <i>phoR zih-12::Tn10</i>	Silvestre: <i>dsbA</i> ⁺	[Bardwell, 1991]
JCB571	<i>JCB570 dsbA::kan</i>	Mutante: <i>dsbA</i> ⁻	[Bardwell, 1991]

Ref: Referencia; CSGC: *Coli Genetic Stock Center* (Universidad de Yale).

3.2. Células y medios de cultivo

Las cepas de *E. coli* empleadas durante el desarrollo del presente estudio se enlistan en la Tabla 3-1. La cepa ER2738 fue usada rutinariamente como hospedera en protocolos de clonación molecular; en tanto, las cepas BW25113, JCB570, y JCB571 fueron utilizadas como hospederas en protocolos de expresión y análisis de actividad.

Las células bacterianas fueron cultivadas en medio Luria-Bertani (LB), líquido (1% de triptona; 0.5% de extracto de levadura; 1% de NaCl) o sólido (LB suplementado con 1.7% de agar bacteriológico). Las transformantes estables fueron seleccionadas mediante resistencia a antibióticos, mediante proliferación en medio LB suplementado con el antibiótico requerido según el plásmido: ampicilina (0.15 mg/mL) o cloramfenicol (0.015 mg/mL). Posterior al choque térmico, el medio 2X YT (1.6% de triptona; 1% de extracto de levadura; 0.5% de NaCl) fue utilizado para la recuperación celular.

3.3. Plásmidos

El plásmido recombinante pBPelB-BHX-Myc (Figura 3-1), derivado del vector comercial pBluescript SK- (*Stratagene*), contiene las secuencias reconocimiento para las endonucleasas BamHI, HindIII, y XhoI, en fase

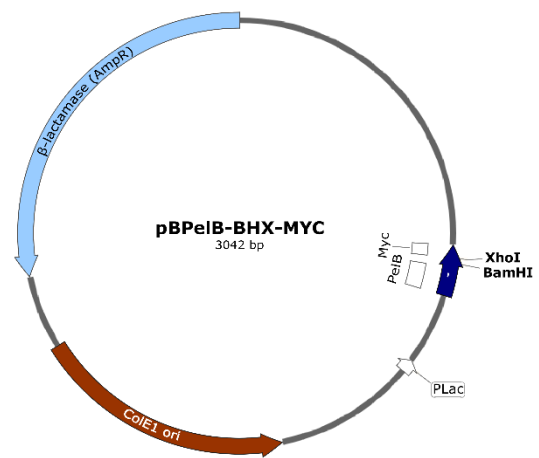


Figura 3-1. Representación esquemática del plásmido pBPelB-BHX-Myc.

con la secuencia señal de la proteína bacteriana PelB (en el extremo N-terminal) y la etiqueta molecular Myc (en el extremo C-terminal), bajo el control del promotor PLac (inducible por IPTG). De manera conveniente, los cortes endonucleolíticos con BamHI y XhoI permiten la inserción en fase y direccional de genes codificantes para proteínas de interés.

El vector comercial pBAD33 (Figura 3-2) [Guzmán *et al.*, 1995], adquirido de la colección ATCC, posee tres características moleculares de interés para la co-expresión de proteínas en *E. coli*: (i) el promotor PBAD, que es estrictamente regulable e inducible por arabinosa; (ii) la secuencia codificante para la enzima CAT (cloramfenicol acetiltransferasa), que confiere resistencia al antibiótico cloramfenicol; y (iii) el origen de replicación p15A, que es compatible con plásmidos de la familia pUC (ColE1 ori).

Ambos plásmidos fueron obtenidos de la reserva de productos biológicos del Laboratorio de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Químicas e Ingeniería, UABC.

3.4. Equipo y programas computacionales

Las amplificaciones moleculares (PCR) fueron llevadas a cabo usando un termociclador *Gradient Thermal Cycler Multigene* de *Labnet International, Inc.* Los fragmentos de ADN teñidos con BrEt fueron visualizados empleando un fotodocumentador *Gel Doc™ EZ Imager* de *Bio-Rad*. Las células bacterianas fueron cultivadas en una incubadora de temperatura y agitación controlada *IncubatorShaker Series 25* de *New Brunswick Scientific Co.* Las incubaciones en microtubo fueron realizadas en un termobloque *Digital Dry Block Heater* de *VWR*. Las separaciones celulares fueron llevadas a cabo usando las micro-centrifugas *Biocentrifuge Fresco* de *Heraeus* y *MiniSpin® Plus* de *Eppendorf* (según las condiciones requeridas). Los lisados bacterianos fueron preparados usando un homogenizador *Digital Disruptor Genie* de *Scientific Industries Inc.* Los registros colorimétricos en microplaca se obtuvieron empleando el lector *Microplate Reader 680* de *Bio-Rad*. El tratamiento de los datos y los análisis bioestadísticos realizados con el programa *Graphpad™ Prism® v4.0*.

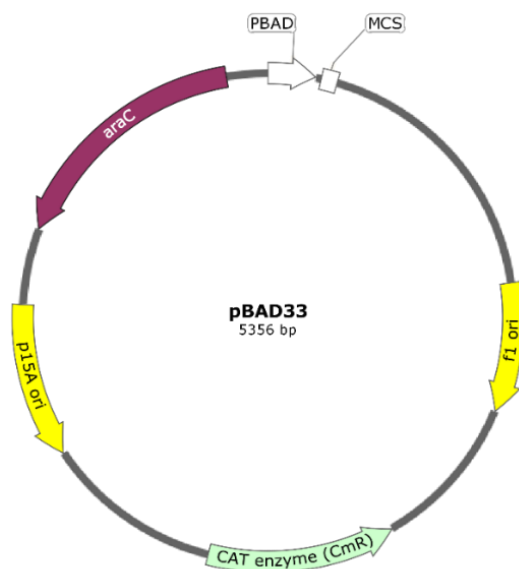


Figura 3-2. Representación esquemática del plásmido pBAD33.

3.5. Protocolos generales

3.5.1. Crecimiento y mantenimiento de células bacterianas

Las células bacterianas portadoras del plásmido de interés fueron proliferadas, en medio LB suplementado con el antibiótico correspondiente, mediante incubación a 37 °C durante toda la noche (12-14 h), con agitación constante (300 rpm). Cada experimento fue realizado utilizando sub-cultivos jóvenes, dilución 1:100 del cultivo nocturno, en medio fresco suplementado con el antibiótico de selección. Para su preservación a corto plazo, los cultivos fueron conservados en refrigeración (12-14 °C) y pasados a medio fresco cada 30-45 días (dilución 1:1,000).

3.5.2. Electroforesis en gel de agarosa

Los fragmentos de ADN fueron separados por su talla molecular mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%, preparado en solución amortiguadora TAE 1X suplementada con 0.5 µg/mL de BrEt. Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 10 partes de la solución de ADN con 1 parte de solución amortiguadora 10X de carga (30% de glicerol, 0.25% de azul de bromofenol, 0.25% de azul de xilencianol). Enseguida, una alícuota (10 µL) de cada muestra fue cargada en un gel de agarosa al 1% (en TAE 1X), suplementado con 0.5 µg/mL de BrEt. La separación electroforética de fragmentos de ADN (en base a su talla molecular) fue realizada a 100 V (30-60 min). Una vez concluida, el gel fue revelado usando el filtro UV para BrEt en el fotodocumentador.

3.5.3. Secuenciación automática de ADN

La autenticidad de los fragmentos clonados fue verificada mediante secuenciación automática de ADN, utilizando los servicios técnicos de la unidad de secuenciación del Instituto de Biotecnología de la UNAM.

3.5.4. Preparación de bacterias competentes

Las células competentes para transformación por choque térmico fueron preparadas siguiendo un protocolo estándar de laboratorio [*Sambrook et al., 2001*]. Brevemente, a partir de 1 mL de cultivo de la cepa hospedera ($DO_{600} = 0.4-0.6$), la pastilla celular fue separada mediante centrifugación a 12,000 rpm durante 2 min. En condiciones estériles, la pastilla fue lavada en dos ocasiones: (1) 0.5 mL de agua destilada fría, y (2) 0.5 mL de CaCl₂ a 100 mM frío, siguiendo un procedimiento de resuspensión-centrifugación como sigue: la pastilla fue resuspendida, incubada en hielo (5 min), y centrifugada (5,000 rpm; 5 min; 10 °C). Enseguida, la pastilla fue resuspendida en

0.05 mL de CaCl_2 a 100 mM frío e incubadas en hielo. Después de 5 min, las células se encontraron listas para transformación.

3.5.5. Transformación bacteriana mediante choque térmico

La muestra (1-2 μL) de ADN (plasmídico o ligación) fue mezclada perfectamente con 0.05 mL de suspensión de células competentes. Después de 30 min en hielo, el ADN fue transfectado mediante choque térmico, incubando 1.5 min a 42°C y 5 min en hielo. Inmediatamente, las células fueron recuperadas en 1 mL de medio 2X YT e incubadas a 37°C durante 1 h. Las transformantes estables fueron seleccionadas mediante su capacidad de proliferar en medio suplementado con el antibiótico de selección; para esto, las células recuperadas fueron sembradas en medio LB-antibiótico e incubadas a 37°C durante 14-16 h (toda la noche).

3.5.6. Expresión de proteínas (mini-ensayo)

La expresión proteica fue valorada a partir de un sub-cultivo de células bacterianas portadoras del plásmido de interés. Inicialmente, un cultivo joven fue preparado mediante proliferación en medio LB-antibiótico (toda la noche). Al día siguiente, el sub-cultivo fue preparado (1-3 mL) mediante dilución 1:100 en medio LB-antibiótico e incubado a 37°C durante 2 h (pre-inducción), con agitación constante (300 rpm). La expresión proteica fue estimulada mediante la adición de inductor correspondiente al promotor operante: (1) IPTG a 1 mM, para plásmidos con el promotor de lactosa PLac); o (2) arabinosa a 0.2%, para plásmidos con el promotor de arabinosa (PBAD). La sobre-expresión fue favorecida mediante incubación a 37°C durante 4 h (post-inducción), con agitación constante (300 rpm). Las células fueron separadas mediante centrifugación (12,000 rpm; 2 min). El paquete celular fue conservado en congelación hasta su análisis.

3.5.7. Extracción de proteínas totales en condiciones nativas

La pastilla celular fue descongelada a temperatura ambiente y resuspendida en 0.2 mL de reactivo *CellLytic*TM B. La lisis celular fue favorecida mediante agitación mecánica en un disruptor a 3,000 rpm durante 5 min, con ayuda de perlas de vidrio (0.1 mm). Posteriormente, el homogenizado celular fue agitado (*rocking*) durante 10 min. Finalmente, fracción soluble fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min). El sobrenadante (fracción de proteínas solubles totales) fue transferido a un microtubo nuevo (estéril) y almacenado en refrigeración hasta su análisis.

3.5.8. Fraccionamiento sub-celular en condiciones nativas

La pastilla celular fue descongelada a temperatura ambiente y resuspendida en 0.4 mL de solución amortiguadora TEX (50 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 3 mM de EDTA pH 8.0; 0.1% de Tritón X-100) con agitación suave (en disruptor celular: 2 min a 1,500 rpm). La extracción de proteínas periplásmicas fue favorecida mediante incubación en hielo durante 30 min. La fracción soluble fue separada mediante centrifugación (13,000 rpm; 10 °C; 15 min). El sobrenadante fue transferido a un microtubo limpio (estéril) y rotulado como fracción periplásmica (FPP). El precipitado fue resuspendido en 0.4 mL de solución amortiguadora TEX y lisado mediante agitación mecánica en un disruptor celular (3,000 rpm durante 5 min), con ayuda de perlas de vidrio (0.1 mm). La fracción soluble fue separada mediante centrifugación (14,500 rpm, 10 °C, 15 min). El sobrenadante fue transferido a un microtubo nuevo (estéril) y rotulado como fracción citosólica (FCY). Las fracciones FPP y FCY fueron almacenadas en refrigeración hasta su análisis.

3.5.9. Cuantificación de proteínas (método de *Bradford*)

En pocillos de una microplaca de titulación, se realizaron diluciones de concentración conocida de BSA (curva estándar): 0, 10, 20, 30, 40, y 50 µg/mL, en un volumen final de 0.05 mL (usando agua destilada como diluyente). En paralelo, se prepararon diluciones (por duplicado) de la muestra problema, ajustando los valores de concentración esperada en el rango de 0 a 50 µg/mL (p. ej., por dilución 1:50, 1:100, 1:200). Enseguida, a cada pocillo se le añadieron 0.1 mL del reactivo de *Bradford*, se mezcló perfectamente y se incubó la reacción a temperatura ambiente durante 5 min. Inmediatamente, las absorbancias a 450 y 595 nm (A_{450} A_{595}) de cada pocillo fueron registradas usando un lector de microplacas. Una curva estándar fue preparada graficando la concentración [µg/mL] de cada dilución de BSA contra su respectiva relación A_{595}/A_{450} . Típicamente, ésta rindió valores de coeficiente de correlación (r^2) mayores a 0.99. La concentración de proteína fue obtenida extrapolando el promedio de la relación A_{595nm}/A_{450nm} de cada muestra analizada y multiplicando por el factor de dilución utilizado, obteniéndose el valor de proteína total en µg/mL.

3.5.10. Separación de proteínas mediante SDS-PAGE

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 1 volumen de lisado proteico bacteriano con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado en condiciones reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 5% de 2-mercaptoetanol; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Enseguida, las proteínas fueron desnaturalizadas mediante incubación a temperatura de 90-100°C durante 10 min. Una alícuota (10-15 µL) de cada muestra fue cargada en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5% [*Laemmli et al., 1970*]. La migración de proteínas (en base a su talla

molecular) fue realiza inicialmente a 80 V, durante su paso por el gel concentrador (15-30 min), y enseguida a 120 V durante su paso por el gel separador (60-90 min). Una vez terminada la corrida, el gel fue teñido durante 1-4 h con solución CBB-alcohol-ácido (25% de isopropanol; 10% de ácido acético; 0.2% de azul brillante de *Coomassie*) y desteñido durante 12-18 h con solución alcohol-ácido (10% de isopropanol; 10% de ácido acético).

3.5.11. Inmuno-detección tipo *Western Blot*

Las muestras para inmuno-detección fueron inicialmente separadas mediante SDS-PAGE. Enseguida, las proteínas fueron electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa, usando un sistema *Criterion™ Blotter* (Bio-Rad), siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Posteriormente, la membrana fue bloqueada durante la noche (12-14 h) con una solución de leche *Svelty™* al 5% (en TBST). Previo a cada reconocimiento, la membrana fue lavada 3 veces (10 min cada vez) con 10 mL de solución amortiguadora TBST (0.1 M de Tris-HCl, pH 8.0; 0.15 M de NaCl; 0.05% de *Tween®*-20). El reconocimiento primario fue realizado durante 1 h, usando el anticuerpo monoclonal anti-Myc (1:5,000 en TBST). El reconocimiento secundario fue realizado durante 1 h, usando el anticuerpo anti-IgG de ratón acoplado a fosfatasa alcalina (1:5,000 en TBST). Finalmente, la membrana fue lavada como antes y el reconocimiento indirecto fue revelado usando el estuche comercial *AP Conjugate Substrate Kit*, siguiendo las recomendaciones del proveedor.

3.6. Construcción de pBPelB-MtMarP-Myc

3.6.1. Amplificación del gen codificante para *MtMarP*

La secuencia codificante para el dominio extracelular (Ser161 a Ser397) de la proteína periplásmica *MtMarP* fue amplificada mediante PCR, usando los oligonucleótidos MTSPF (5'- cat cat *aga tct gcc ctg ctg aac acc tcc* -3'; BglII: itálicas; MarP-específica: subrayada) y MTSPR (5'- aag aag *ctc gag gct gac gca ggc cc* -3'; XhoI: itálicas; MarP-específica: subrayada) como iniciadores sentido y anti-sentido, respectivamente. La mezcla de reacción (50 µL) fue preparada conteniendo 0.2 mM de dNTPs, 20 picomoles de cada oligonucleótido, 1 ng de ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv, y 2.5 U de *Pfu* ADN-pol, en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min); 35 ciclos de amplificación exponencial (94 °C durante 20 seg, 55 °C durante 20 seg, 72 °C durante 60 seg); 1 ciclo de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto de PCR fue mantenido a 12 °C hasta ser retirado del equipo. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.6.2. Preparación de componentes para la ligación: pBPelB-BHX-Myc y *MtMarP*

Inicialmente, el vector (pBPelB-BHX-Myc) y el inserto (producto de PCR *MtMarP*) fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos durante 2 h con las endonucleasas respectivas: (1) el vector con BamHI y XhoI, y (2) el inserto con BglII y XhoI, siguiendo los procedimientos recomendados por el proveedor (solución amortiguadora NEB/BSA, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el vector fue defosforilado, suplementando 1 µL fosfatasa alcalina (bCIP). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados a partir de solución y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

3.6.3. Ligación y obtención de pBPelB-*MtMarP*-Myc

La ligación de los productos de digestión, vector [pBPelB-BHX-Myc/BamHI-XhoI-defosforilado] e inserto [producto de PCR *MtMarP*/BglII-XhoI], fue realizada en una mezcla de reacción (10 µL) conteniendo 7 µL de inserto, 1 µL de vector, y 400 U de T₄ ADN-lig, en solución amortiguadora 1X para T₄ ADN-lig. La reacción fue permitida durante un mínimo de 12 h a temperatura de refrigerador (14-16 °C). El producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y las transformantes estables fueron seleccionadas para análisis de plásmido (liberación de inserto). Posteriormente, un clona positiva (plásmido con inserto) fue utilizada para caracterización molecular y extracción de ADN plasmídico de alta pureza, el cual fue utilizado para secuenciación automática de ADN. Una vez verificada la integridad de la secuencia nucleotídica, el plásmido fue denominado pBPelB-*MtMarP*-Myc (3,744 pb).

3.7. Construcción de pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc

3.7.1. Amplificación de la secuencia codificante para PelB-*MtMarP*-Myc

La secuencia codificante para la fusión génica PelB-*MtMarP*-Myc fue amplificada mediante PCR, utilizando los oligonucleótidos sintéticos T3 (5´- aat taa ccc tca cta aag gg -3´) y H3MYCR (5´- cat cat *aag gtt tta cag atc ctc ttc aga gat gag t*- 3´; HindIII: *itálicas*; Myc: *subrayada*) como iniciadores sentido y anti-sentido, respectivamente. La mezcla de reacción (0.05 mL) fue preparada conteniendo 0.2 mM dNTPs, 20 picomoles de cada oligonucleótido, 1-2 ng del plásmido pBPelB-*MtMarP*-Myc, y 2.5 U de *Pfu* ADN-pol, en solución amortiguadora 1X para *Pfu* ADN-pol. Las condiciones de termociclado fueron: 1 ciclo de desnaturalización inicial (94 °C durante 2 min); 35 ciclos de amplificación exponencial (94 °C durante 20 seg, 50 °C durante 20 seg, 72 °C durante 90 seg); 1 ciclo

de extensión final (72 °C durante 7 min). Al finalizar, el producto fue mantenido a 12 °C hasta retirarlo del equipo. La amplificación fue verificada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%.

3.7.2. Preparación de componentes para ligación: pBAD33 y PelB-*Mt*MarP-Myc

Primeramente, el vector (pBAD33) y el inserto (producto de PCR PelB-*Mt*MarP-Myc) fueron purificados usando estuches comerciales. Posteriormente, ambos fueron digeridos con las endonucleasas HindIII y XbaI durante 2 h, utilizando el procedimiento recomendado por el proveedor (solución amortiguadora 1X de NEB2/BSA, 37 °C). 30 min antes de cumplir el tiempo de digestión, el vector fue defosforilado, suplementando 1 µL fosfatasa alcalina (bCIP). Enseguida, ambos productos de digestión fueron purificados a partir de solución y analizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% (para verificar la integridad de los fragmentos obtenidos).

3.7.3. Ligación y obtención de pBAD-PelB-*Mt*MarP-Myc

La ligación de los productos de digestión, vector [pBAD33/HindIII-XbaI-defosforilado] e inserto [producto de PCR PelB-*Mt*MarP-Myc/HindIII-XbaI], fue realizada en una mezcla de reacción (10 µL) conteniendo 6 µL de inserto, 2 µL de vector, y 400 U de T₄ ADN-lig, en solución amortiguadora 1X para T₄ ADN-lig. La reacción fue permitida durante 2 h a temperatura ambiente. El producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y las transformantes estables fueron seleccionadas para análisis de plásmido (liberación de inserto). Posteriormente, una clona positiva (plásmido con inserto) fue seleccionada para extracción de ADN plasmídico de alta pureza, el cual fue utilizado para secuenciación automática de ADN. Una vez verificada la integridad de la secuencia nucleotídica, el plásmido fue denominado pBAD-PelB-*Mt*MarP-Myc (5,959 pb).

3.8. Análisis de la actividad proteasa

3.8.1. Análisis zimográfico

Las muestras analíticas fueron preparadas mezclando 1 volumen de solución de proteínas con 1 volumen de solución amortiguadora 2X para cargado en condiciones no reductoras (10% de glicerol; 2.5% de SDS; 0.002% de azul de bromofenol; 50 mM de Tris-HCl, pH 6.8). Enseguida, una alícuota (10 µL) de cada muestra fue cargada en un gel de SDS-poliacrilamida al 13.5% [Laemmli *et al.*, 1970], suplementado con 0.1% de proteína sustrato (caseína, gelatina, o BSA). La separación de proteínas (en base a su talla molecular) fue realizada a 80 V (constante). Una vez concluida la separación electroforética, el gel fue tratado en 25 mL de solución amortiguadora TBS-Tritón (10 mM de Tris-HCl pH 8.0; 150 mM de NaCl; 2.5% de Tritón X-100) durante 30 min, a temperatura

ambiente y agitación (*rocking*). Inmediatamente, el gel fue lavado en 3 ocasiones (10 min cada vez) con 15 mL de una solución amortiguadora TBS (10 mM Tris-HCl, pH 8.0; 150 mM de NaCl). Enseguida, la actividad proteolítica fue activada con DTT y favorecida a 37 °C durante 12-14 h, mediante tratamiento en 30 mL de una solución amortiguadora TE-DTT (25 mM de Tris-HCl, pH 8.0; 2 mM de EDTA, pH 8.0; 5 mM de DTT). Finalmente, el gel fue teñido durante 4 h con una solución CBB-alcohol-ácido y desteñido durante 12-18 h con una solución alcohol-ácido.

3.8.1. Ensayo universal para proteasas (método de Follin-Ciocalteu)

Las muestras analíticas fueron preparadas, en microtubos, mezclando 0.1 o 0.2 mg de lisado bacteriano total con 0.5 mL de una solución 0.5% de caseína (en 75 mM de solución amortiguadora universal, citratos-fosfatos-tris-boratos, pH 7.5). Enseguida, la reacción fue permitida durante 30 o 120 min (10 min para proteinasa K, como control positivo). La reacción fue detenida, adicionando 0.5 mL de una solución al 20% de ácido tricloroacético, y corregida, añadiendo el volumen de lisado bacteriano total requerido (para igualar la cantidad de proteína) a los microtubos blanco. Después de 30 min de incubación a 37 °C, las mezclas fueron separadas mediante centrifugación (14,500 rpm; 15 min). Enseguida, 0.2 mL de cada sobrenadante fueron transferidos a microtubos nuevos (estériles) conteniendo 0.5 mL de solución 0.5 M de Na₂CO₃ y, posteriormente, mezclados con 0.1 mL de solución 0.5 M de reactivo de Follin-Ciocalteu. Después de 30 min de incubación a 37 °C, las mezclas fueron mantenidas a temperatura ambiente durante 5 min. Finalmente, las mezclas fueron separadas mediante centrifugación (14,500 rpm; 10 min), el sobrenadante fue transferido a una celda, y la A₆₆₀ fue registrada. Una vez corregidos los valores de la muestra blanco, la actividad proteasa fue determinada como al cambio de A₆₆₀ por min por mg de proteína.

3.9. Análisis del crecimiento bacteriano y efecto del estrés medioambiental

3.9.1. Efecto de la sobre-expresión de *MtMarP* sobre el crecimiento bacteriano

Los cultivos de la cepa BW25113 portadora de los plásmidos pBAD33 y pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc fueron preparados y tratados en dos condiciones: sin y con inductor (0.2% de arabinosa). Las cinéticas de crecimiento fueron obtenidas registrando la densidad óptica a 600 nanómetros (DO₆₀₀) con respecto al tiempo de cultivo. Brevemente, 3 mL de medio LB-cloramfenicol fueron inoculados con un 0.03 mL de un cultivo bacteriano joven. Después de 5 min de incubación (37 °C, 300 rpm), se realizó el primer registro (t₀), y los cultivos continuaron en incubación durante 6 h adicionales, realizando registros cada 30 min. Los cultivos inducidos fueron suplementados con arabinosa a las 2 h de crecimiento. A partir de las curvas de crecimiento, se determinó la rapidez

específica (μ) y el tiempo de duplicación (t_d). Para este fin, se graficó el logaritmo natural de la DO_{600} contra el tiempo, y se ajustaron los datos a una regresión lineal, aplicando la siguiente ecuación:

$$\ln(X) = \ln(X_0) + \mu t$$

donde μ corresponde a la pendiente de la fase exponencial del crecimiento. Por otro lado, t_d fue calculada considerando la fórmula:

$$t_d = 0.693/\mu.$$

3.9.2. Ensayo de resistencia a acidificación y análisis de viabilidad

Inicialmente, dos cultivos de la cepa BW25113, portadora de cada uno de los plásmidos: pBAD33 y pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc, fueron preparados y tratados en presencia de inductor (0.2% de arabinosa). Brevemente, 3 mL de medio LB-cloramfenicol fueron inoculados con un 0.03 mL de un cultivo bacteriano joven. Después de 2 h de incubación (37 °C, 300 rpm), los cultivos fueron suplementados con arabinosa, y continuó la proliferación durante 2 h adicionales. Posteriormente, cada cultivo fue separado en dos fracciones de 1.5 mL y la pastilla celular fue separada mediante centrifugación (12,000 rpm; 5 min). Enseguida, cada pastilla fue lavada con 1 mL de solución amortiguadora 0.1 M de citratos-fosfatos, pH 7.0; mediante resuspensión y centrifugación (12,000 rpm; 5 min). El sobrenadante fue removido y una pastilla de cada cultivo: fue resuspendida en 1 mL de solución amortiguadora 0.1 M de citratos-fosfatos a pH 7.0; y la otra a pH 4.5 (mismo volumen, concentración, y sales). Después de 1 h de incubación (37 °C, 300 rpm), se prepararon diluciones centesimales (10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} , y 10^{-8}) de cada tratamiento. Volúmenes 10 o 100 μ L de cada dilución fueron sembrados en medio LB-cloramfenicol e incubados durante la noche a 37 °C. Las colonias desarrolladas fueron contadas y la dilución con registro de 10 a 100 ufc fue utilizada para calcular la densidad celular, utilizando la siguiente ecuación:

$$\text{ufc/mL} = \frac{\text{ufc}}{v} \cdot \text{FD}$$

donde ufc corresponde al número de colonias contadas, v el volumen de la dilución (en mL), y FD el factor de dilución. Además, el porcentaje de sobrevivencia (viabilidad) fue determinado considerando la siguiente ecuación:

$$\text{viabilidad (\%)} = \frac{\text{Log}(\text{ufc/mL})_{4.5}}{\text{Log}(\text{ufc/mL})_{7.0}} \cdot 100$$

donde los subíndices 4.5 y 7.0 representan el valor de pH al que fueron sometidos los cultivos.

4. RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. MarP de *M. tuberculosis*

En *M. tuberculosis*, MarP es una proteína integral de 397 residuos de aminoácidos con un peso molecular teórico calculado de 40.72 kDa. Su arquitectura estructural consiste de dos dominios (Figura 4-1): uno N-terminal, parecido a la super-familia colicin V (Leu7-Pro150), que consta de cuatro pasos transmembranales (Ile9-Gly29; Leu32-Val52; Leu62-Val82, y Val102-Pro122); y otro C-terminal, parecido a la familia de peptidasas relacionadas a tripsina (Ala190-Ile384), que contiene la triada catalítica distintiva de una serina proteasa activa (His235, Asp264, y Ser343). Además, este último, incluye dos residuos de cisteína comprometidos en la formación de un enlace disulfuro (residuos Cys214 y Cys395).

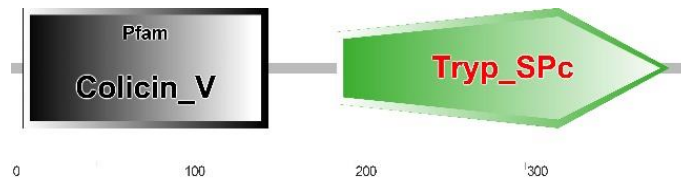


Figura 4-1. Arquitectura de dominios de la proteína MarP de *M. tuberculosis*.

En consideración a la premisa que infiere una dependencia de las proteínas secretadas al plegamiento oxidativo correcto, dentro de un ambiente redox apropiado, se propuso expresar el dominio serina proteasa de la proteína MarP de *M. tuberculosis* (*MtMarP*) en el periplasma de la bacteria *E. coli*, ya que ese compartimiento hospeda una maquinaria celular que asiste al plegamiento y exhibe un estado redox altamente oxidante.

4.2. Obtención del plásmido pBPelB-*MtMarP*-Myc

Primeramente, se construyó un plásmido que favoreciera la expresión del dominio serina proteasa de *MtMarP* (residuos Ser161-Ser397) y su translocación hacia el periplasma bacteriano; además, que permitiera la verificación de su localización sub-celular. Para esto, se utilizó la secuencia señal de la proteína bacteriana PelB (Pectato liasa B de *Erwinia carotovora*), la cual ha sido

ampliamente utilizada en *E. coli* (ya que dirige proteínas hacia el periplasma vía Sec y SRP), y la secuencia del epítipo Myc, que ha funcionado exitosamente como etiqueta molecular. Con ese objetivo, se diseñó el plásmido pBPelB-MtMarP-Myc (Figura 4-2).

La secuencia codificante fue amplificada mediante PCR, utilizando dos iniciadores específicos y ADN genómico de la cepa H37Rv de *M. tuberculosis* (como molde). Para asegurar la fidelidad de la replicación molecular, se utilizó la enzima *Pfu* ADN-pol. Como se observa en la Figura 4-3, un producto de aprox. 700 pb fue amplificado, concordante con el peso molecular esperado (731 pb), indicativo de una reacción exitosa. Posteriormente, el producto de PCR MtMarP y el plásmido pBPelB-BHX-Myc fueron digeridos y ligados.

En esta punto, cabe destacar tres aspectos clave la estrategia de clonación molecular: (1) El producto de PCR incorporó las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas BglII y XhoI, cada una flanqueando un extremo de la secuencia MtMarP; (2) el plásmido contiene las secuencias de reconocimiento para BamHI y XhoI, siendo BglII y BamHI cohesivamente compatibles; y (3) la ligación de los fragmentos de digestión permite la inserción de MtMarP en fase, con respecto a las secuencias PelB y Myc; y direccional, en relación al promotor PLac.

Enseguida, el producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y las células transformantes estables fueron seleccionadas por su habilidad de crecer en presencia de ampicilina. Como escrutinio preliminar, varias unidades formadoras de colonia (ufc) fueron proliferadas en medio LB líquido con antibiótico y el plásmido fue extraído para su posterior análisis. Los resultados iniciales de restricción y liberación de inserto indicaron que sólo una ufc, denominada

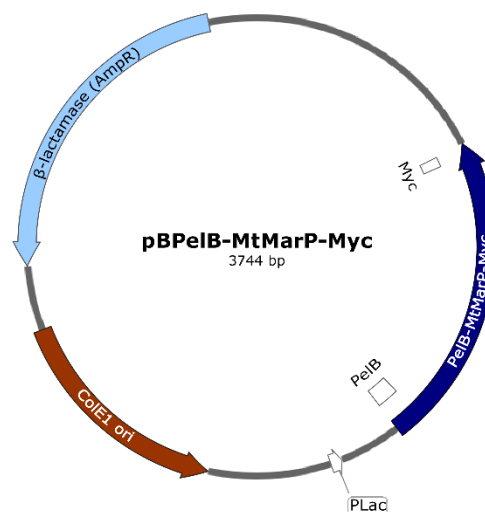


Figura 4-2. Representación esquemática del plásmido pBPelB-MtMarP-Myc.

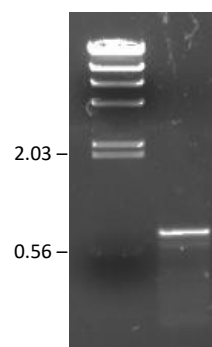


Figura 4-3. Análisis del producto de PCR MtMarP.

Gel de agarosa al 1%, teñido con BrEt. Marcador de peso molecular λ DNA-HindIII (kb).

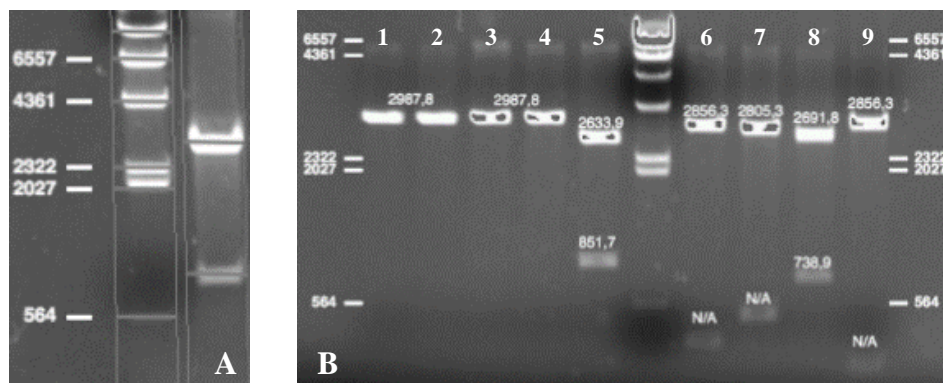


Figura 4-4. Análisis y caracterización del plásmido pBPelB-MtMarP-Myc.

Geles de agarosa al 1%, teñidos con BrEt. Marcador de peso molecular λ DNA-HindIII (pb). (A) Análisis de pBPelB-MtMarP-Myc (clona 29) mediante la digestión con XbaI-XhoI. (B) Caracterización molecular de pBPelB-MtMarP-Myc (clona 29) mediante el análisis de la longitud de los fragmentos de digestión con: (1) BamHI; (2) NcoI; (3) XbaI; (4) XhoI; (5) XbaI/XhoI; (6) BamHI/XbaI; (7) BamHI/XhoI; (8) NcoI/XhoI; (9) BamHI/NcoI.

clona 29, portaba el plásmido de interés (Figura 4-4A). Posteriormente, los resultados de la caracterización molecular mediante un análisis de la longitud de los fragmentos de restricción apoyaron la noción anterior (Figura 4-4B). A partir de un cultivo independiente, se aisló ADN plasmídico de alta pureza y fue enviado a un servicio externo de secuenciación automática de ADN. La autenticidad del fragmento clonado y la inserción apropiada fueron verificados mediante el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida. La Figura 4-2 despliega una representación esquemática del plásmido pBPelB-MtMarP-Myc (3,744 pb).

4.3. MtMarP se localiza en el periplasma de *E. coli* BW25113/pBPelB-MtMarP-Myc

Como primer análisis de expresión y localización subcelular, se realizó en un mini-ensayo de sobre-expresión de MtMarP, inducida por IPTG, y fraccionamiento citosol-periplasma, mediante tratamiento y extracción con tritón X-100. Para esto, *E. coli* BW25113 fue transformada con pBPelB-MtMarP-Myc. A partir de una colonia, se preparó un cultivo en medio LB líquido suplementado con ampicilina. Después de protocolo típico de sobre-expresión: pre-inducción (2 h, 37 °C, 300 rpm), inducción (0.5 M de IPTG); post-inducción (2 h, 37 °C, 300 rpm); se realizaron los extractos bacterianos correspondientes a las fracciones periplásmica y citosólica. A continuación, las fracciones sub-celulares (total, citosol, y periplasma) fueron separadas mediante electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE), electro-transferidas a una membrana de nitrocelulosa, y analizadas mediante inmuno-reconocimiento tipo *Western Blot* (WB). Como se nota en la Figura 4-5, sólo una

proteína, presumiblemente del tamaño esperado para *MtMarP* (26-28 kDa), fue inmunoreconocida en todas las fracciones analizadas (usando el anticuerpo anti-Myc). Aunque mayoritariamente fue detectada en el extracto total y la fracción periplásmica, se observó una pequeña cantidad de *MtMarP* en la fracción citosólica, lo que puede corresponder a la porción que se encuentra en tránsito y translocación del citosol hacia el periplasma. Independiente a lo anterior, los resultados indican que *MtMarP* se transporta y localiza eficientemente en el periplasma bacteriano.

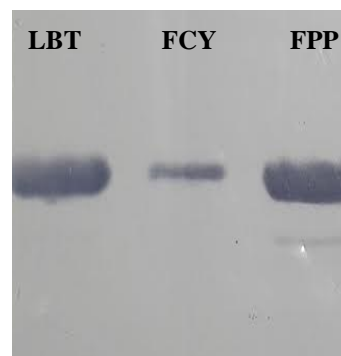


Figura 4-5. Análisis de localización de *MtMarP* en las fracciones subcelulares de la cepa BW25113/pBPelB-*MtMarP*-Myc.

Inmuno-reconocimiento con anticuerpo anti-Myc. Fracciones: LBT, lisado total; FCY, fracción citosólica; FPP, fracción periplásmica.

4.4. Obtención del plásmido pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc

Como segunda etapa, se construyó un plásmido que permitiera una regulación más estricta de la expresión de la fusión PelB-*MtMarP*-Myc y que soportara la co-expresión episomal de otras proteínas. Para esto, se diseñó pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc (Figura 4-6).

La secuencia codificante para la fusión PelB-*MtMarP*-Myc fue amplificada usando dos iniciadores específicos y el plásmido pBPelB-*MtMarP*-Myc (como molde). La enzima *Pfu* ADN-pol fue utilizada para favorecer la fidelidad de la replicación molecular. El producto de PCR amplificado (931 pb) y el plásmido pBAD33 fueron digeridos y ligados. Cabe destacar tres aspectos clave de esta estrategia de clonación molecular: (1) el producto de PCR incluyó las secuencias de reconocimiento para las endonucleasas HindIII y XbaI, cada una flanqueando un extremo de la secuencia PelB-*MtMarP*-Myc; (2) el plásmido contiene un sitio

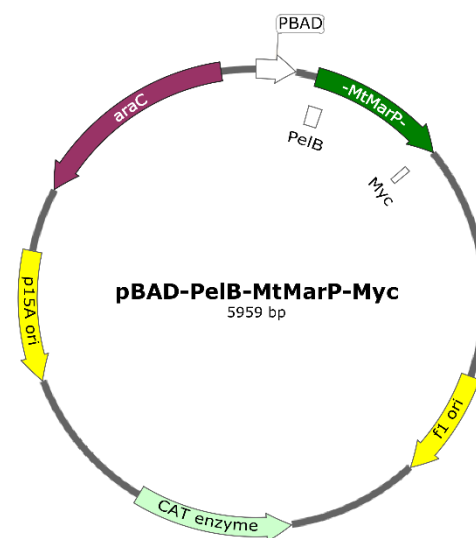


Figura 4-6. Representación esquemática del plásmido pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc.

de clonación múltiple que comprende los sitios de reconocimiento para HindIII y XbaI; y (3) la ligación de los fragmentos de digestión permite la inserción direccional de PelB-*MtMarP*-Myc, con respecto al promotor PBAD. Además, pBAD33 porta el gen codificante para la enzima CAT, que confiere resistencia a cloramfenicol, y el origen de replicación p15A, el cual es compatible con el origen ColE1 (presente en plásmidos derivados de pUC).

Posteriormente, el producto de la ligación fue transfectado en la cepa ER2738 de *E. coli* y las transformantes estables fueron seleccionadas por su habilidad de proliferar en presencia de cloramfenicol. Como escrutinio preliminar, varias ufc fueron crecidas en medio LB líquido con antibiótico y el plásmido fue extraído para su posterior análisis. Los resultados iniciales de restricción y liberación de inserto indicaron que tres ufc portaban el plásmido de interés (datos no mostrados). A partir del cultivo independiente de una de las clonas (denominada C1), se obtuvo ADN plasmídico de alta pureza y fue enviado a un servicio externo de secuenciación automática de ADN. La autenticidad del fragmento clonado y la inserción apropiada fueron verificados mediante el análisis de la secuencia nucleotídica obtenida. La Figura 4-6 muestra una representación esquemática del plásmido pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc (5,959 pb).

4.5. *MtMarP* se localiza en el periplasma de *E. coli* BW25113/pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc

Con el fin de verificar la astringencia de la inducción con arabinosa y corroborar la localización periplásmica, se realizó un mini-ensayo de sobre-expresión de *MtMarP* y análisis de fracciones subcelulares de *E. coli* BW25113 portadora de pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc. Para esto, se preparó un cultivo en las condiciones requeridas y se desarrolló protocolo típico de sobre-expresión, con la variante de inducción (0.2% de arabinosa). El extracto total y las fracciones celulares fueron separadas, electro-transferidas, e inmuno-reconocidas como se describió anteriormente (Sección 4.3.). Como se muestra en la Figura 4-7, sólo una proteína del tamaño correspondiente a *MtMarP* (26-28 kDa) fue inmuno-reconocida en el extracto total y en la fracción periplásmica. Contrastando con los resultados observados usando el sistema PLac-IPTG (Figura 4-5), los resultados obtenidos

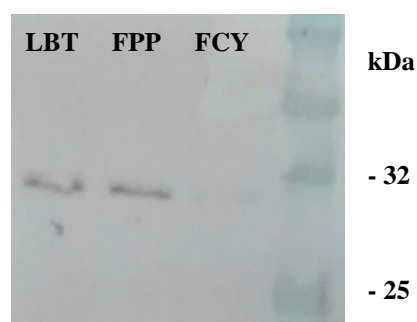


Figura 4-7. Análisis de localización de *MtMarP* en las fracciones subcelulares de la cepa BW25113/pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc.

Inmuno-reconocimiento con anticuerpo anti-Myc. Fracciones: LBT, lisado total; FCY, fracción citosólica; FPP, fracción periplásmica.

utilizando el sistema PBAD/arabinosa sugieren una regulación de la expresión más estricta, tal como se deseaba para los fines del estudio.

4.6. La sobre-expresión de *MtMarP* afecta la cinética de crecimiento bacteriano

En *E. coli*, la sobre-expresión de proteínas heterólogas puede conducir hacia un estrés proteotóxico; el cual puede tener efectos negativos sobre la bioquímica y fisiología bacteriana [Glick, 1995; Neubauer *et al.*, 2003; Baneyx & Mujacic, 2004]. Este estado puede ser reconocido por dos características: (1) una carga metabólica comprometida, dirigida principalmente hacia la sobre-producción de la proteína de interés, obligando al consumo de recursos celulares que habitualmente son utilizados en el metabolismo basal [Glick, 1995; Neubauer *et al.*, 2003], y (2) una acumulación de la proteína en el compartimiento subcelular involucrado, p. ej. citosol o periplasma, lo que puede conducir hacia la formación de agregados (cuerpos de inclusión) con potencial citotóxico [Baneyx & Mujacic, 2004]. Aunado a lo anterior, se ha observado que algunas habilidades fisiológicas pueden verse afectadas por la inducción de la expresión, como la asimilación de sustratos (como fuente de energía) y la capacidad respiratoria [Baneyx & Mujacic, 2004].

En consideración a lo anterior, el efecto de la sobre-expresión de *MtMarP* en el periplasma de *E. coli* sobre la fisiología bacteriana fue valorado mediante la determinación de parámetros cinéticos de crecimiento bacteriano en dos condiciones: ausencia y presencia de inductor. Además, como control y testigo, se utilizaron cultivos portadores del plásmido vacío. La rapidez específica de crecimiento (μ) y el tiempo de duplicación (t_d) fueron calculados a partir de registros de la densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) con respecto al tiempo de cultivo (no inducido: 6 h; inducido: 2 h pre + 4 h post). Como se representa en la Figura 4-8, en condiciones basales de expresión proteica (sin inductor: -Ara), los cultivos bacterianos (BW25113/pBAD33 y BW25113/pBAD-PeIB-*MtMarP*-Myc) desplegaron cinéticas de crecimiento típicas (color rojo), mostrando un μ de $0.024 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$ (equivalente a t_d de $28.8 \pm 1.2 \text{ min}$), lo que sugiere una fisiología bacteriana estable en tales condiciones. Por el contrario, las cinéticas de crecimiento en condiciones de sobre-expresión proteica (con inductor: +Ara) exhibieron diversas tendencias (color azul); particularmente, después de suplementar el inductor (cabeza de flecha verde). Durante la etapa de pre-inducción (0-120 min), los cultivos describieron una tendencia similar, con valores de μ ($0.023 \pm 0.001 \text{ min}^{-1}$) y t_d (30.7 ± 1.1) comparables a los observados en condiciones basales. Por otro lado, durante la etapa de post-inducción, el cultivo portador del vector vacío (pBAD33, cuadro abierto) mostró una cinética de crecimiento parecida a la observada en condiciones no inducidas, lo que supone que la presencia de arabinosa no altera las condiciones basales de expresión proteica. En tanto, el cultivo portador de

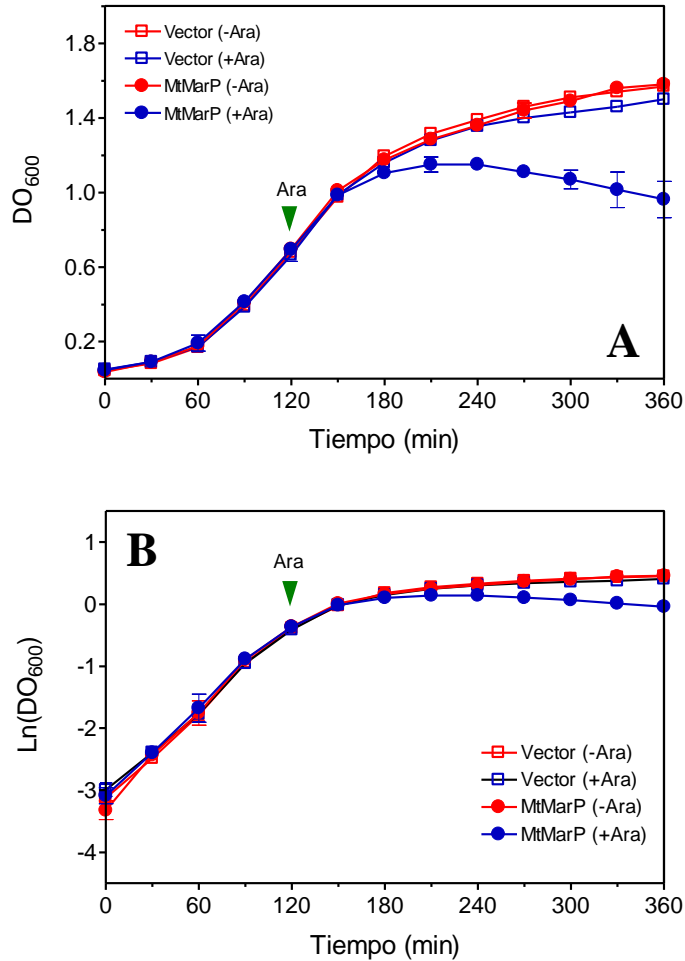


Figura 4-8. Cinética de crecimiento de los cultivos de *E. coli* portadora de los plásmidos pBAD33 y pBAD-PelB-MtMarP-Myc, en condiciones basales y de inducción de la expresión de MtMarP.

Cultivos bacterianos sin inductor (-Ara, rojo) y con 0.2% de arabinosa (+Ara, azul), de las cepas BW25113/pBAD33 (cuadro abierto) y BW25113/pBAD-PelB-MtMarP-Myc (círculo cerrado). Cada punto representa la media \pm error estándar de tres ensayos diferentes. La cabeza de flecha verde indica el tiempo cuando se suplemento el inductor. (A) cinética de biomasa con respecto al tiempo. (B) Ln de la biomasa con respecto al tiempo.

pBAD-PelB-MtMarP-Myc (círculo cerrado) exhibió una tendencia de crecimiento singular: 30 min después de suplementado el inductor, el cultivo entró en fase estacionaria y se mantuvo en ésta durante 90 min; enseguida, sucumbió ante las condiciones prevalentes y entró tempranamente en fase de muerte celular. En conjunto, los resultados demuestran que la sobre-expresión de la proteína MtMarP en el periplasma afecta negativamente fisiología bacteriana, alterando la cinética de crecimiento y reduciendo la viabilidad celular.

4.7. *MtMarP* en el periplasma de *E. coli* confiere resistencia a la acidificación del medio

Aunque las propiedades bioquímicas y fisiológicas no están claramente definidas, la principal función atribuida a MarP en diferentes especies de *Mycobacterium* es la capacidad de conferir resistencia a la acidificación del medio. Independiente al papel que pueda asumir (directo o indirecto) en los diferentes mecanismos involucrados en tal proceso celular, MarP de *M. tuberculosis* representa una diana terapéutica apropiada para el diseño de moléculas con actividad farmacológica anti-TB. Por otro lado, considerando a los ensayos *in vitro* como la primera estrategia para el escrutinio y valoración del potencial terapéutico de cualquier agente farmacológico, el uso de modelos heterólogos representa una alternativa viable para validar su aplicación en plataformas *in vivo*; especialmente cuando el sistema biológico nativo supone: (a) un reto técnico insuperable con la metodología disponible, o (b) un riesgo latente para la salud de los humanos o del medio ambiente.

Para estudiar la función de *MtMarP* y, ulteriormente, sugerir a *E. coli* como un sistema heterólogo viable para el escrutinio de agentes terapéuticos con propiedades anti-TB, se propuso utilizar al periplasma como plataforma biológica para la expresión funcional del dominio serina proteasa de *MtMarP* y evaluar su contribución operacional a la fisiología bacteriana (Figura 4-9).

Mediante un análisis de resistencia a condiciones de estrés ácido (pH 4.5 durante 1 h), se determinó que la expresión periplásmica de *MtMarP* beneficia a la viabilidad celular, mostrando un aumento de aprox. 5.5% (barra roja), con respecto al testigo correspondiente (barra gris); contrario a lo observado en su ausencia (Vector), donde el pH ácido suscita una disminución de la viabilidad de aprox. 4.2% (barra roja), en relación al testigo referente (barra gris). En conjunto, estos resultados sugieren que MarP de *M. tuberculosis* puede participar en los procesos bioquímicos o asistir a los mecanismos fisiológicos operantes en el periplasma bacteriano e involucrados en la resistencia a acidificación del medio.

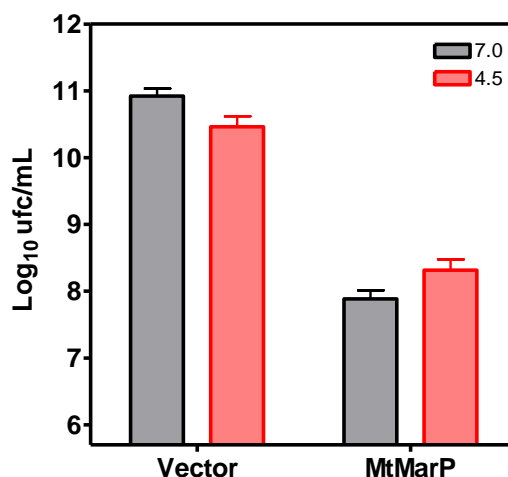


Figura 4-9. Análisis de viabilidad de *E. coli* BW25113 portadora de los plásmidos pBAD33 y pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc en respuesta al valor de pH del medio.

El eje X corresponde al plásmido albergado: Vector (pBAD33) y *MtMarP* (pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc); y el eje Y a los valores logarítmicos de la densidad celular. Para los cultivos: pH 7.0 en gris y pH 4.5 en rojo.

5. CONCLUSIONES

El plásmido pBPelB-*MtMarP*-Myc, que porta la secuencia codificante para el dominio serina proteasa de *MtMarP* fusionado en fase con la secuencia señal PelB (en el N-terminal) y la etiqueta molecular C-Myc (en el C-terminal), fue obtenido exitosamente mediante una estrategia de sub-clonación molecular por inserción usando el plásmido pBPelB-BHX-Myc como parental. Cabe indicar que este vector brinda tres ventajas funcionales de utilidad para futuros proyectos: (1) control relajado de la expresión mediante la adición de IPTG (análogo de lactosa); (2) origen de replicación ColE1, compatible con plásmidos que portan el origen de replicación p15A (p.ej., pBAD y pACYC); y (3) resistencia a ampicilina, que permite doble o triple selección en conjunto con otros antibióticos (p.ej., cloramfenicol, kanamicina, o tetraciclina).

El plásmido pBAD-PelB-*MtMarP*-Myc, que contiene la secuencia codificante para la fusión PelB-*MtMarP*-Myc bajo en control del promotor de arabinosa (PBAD), fue obtenido satisfactoriamente mediante una estrategia de sub-clonación molecular por inserción usando el plásmido pBAD33 como parental. Es importante resaltar que este vector ofrece tres ventajas funcionales de utilidad para futuros proyectos: (1) control estricto de la expresión mediante la adición de arabinosa; (2) origen de replicación p15A, compatible con plásmidos que portan el origen de replicación ColE1 (p.ej., pBS, pET, pGEX, pMAL, y pUC); y (3) resistencia a cloramfenicol, que permite doble o triple selección en conjunto con otros antibióticos (p.ej., ampicilina, kanamicina, o tetraciclina).

El dominio serina proteasa de *MtMarP* fue eficientemente transportado y localizado en el periplasma de *E. coli*. Sin embargo, como era esperado, las condiciones de inducción y sobre-expresión proteica conducen a una alteración en la cinética de crecimiento y disminución de la viabilidad celular. Aunque permanecen pendientes los ensayos de evaluación bioquímica (actividad proteasa), los ensayos de resistencia a estrés ácido (pH 4.5; 1 h) mostraron que la expresión de la proteasa micobacteriana beneficia a la viabilidad celular, sugiriendo que *MtMarP* puede estar participando en procesos bioquímicos o asistiendo a mecanismos fisiológicos, operantes en el periplasma bacteriano, involucrados en la resistencia a acidificación del medio.

Finalmente, para aportar datos adicionales a las funciones bioquímicas y fisiológicas de MarP de *M. tuberculosis*, es recomendable la realización de ensayos de actividad proteolítica, de resistencia a estrés oxidativo, de complementación funcional y dependencia a una oxidorreductasa que participe en el plegamiento asistido de proteínas; p. ej., DsbA, DsbB, DsbC, o PDI.

6. BIBLIOGRAFIA

- Amoudy, H.A., & Mustafa, A.S. (2008). Amplification of six putative RD1 genes of *M. tuberculosis* for cloning and expression in *E. coli* and purification of expressed proteins. *Medical principles and practice*, 17 (5), 378-384.
- Anand, P.K., Anand, E., et al. (2010). Exosomal Hsp70 induces a pro-inflammatory response to foreign particles including mycobacteria. *PloS One*, 5 (4), e10136.
- Baneyx, F. & Mujacic, M. (2004). Recombinant protein folding and misfolding in *Escherichia coli*. *Nature biotechnology*, 22(11), 1399-1408.
- Baneyx, F. (1999). Recombinant protein expression in *E. coli*. *Current opinion in biotechnology*, 10 (5), 411-421.
- Biswas, T., Small, J., et al. (2010). Structural insight into serine protease Rv3671c that protects *M. tuberculosis* from oxidative and acidic stress. *Structure*, 18 (10), 1353-1363.
- Blumenthal, A., Trujillo, C., et al. (2010). Simultaneous analysis of multiple *M. tuberculosis* knockdown mutants *in vitro* and *in vivo*. *PloS One*, 5 (12), e15667.
- Botella, H., Vaubourgeix, J., et al. (2017). *Mycobacterium tuberculosis* protease MarP activates a peptidoglycan hydrolase during acid stress. *The EMBO Journal*, e201695028.
- Braunstein, M., Brown, A.M., et al. (2001) Two nonredundant SecA homologues function in mycobacteria. *J Bacteriol* 183: 6979–6990.
- CDC, Center for Disease Control and Prevention. Managing tuberculosis patients and improving adherence. Atlanta, GA, 2014.
- Chim, N., Riley, R., et al. (2010). An extracellular disulfide bond forming protein (DsbF) from *Mycobacterium tuberculosis*: structural, biochemical, and gene expression analysis. *Journal of molecular biology*, 396 (5), 1211-1226.
- Cornelis, G.R. & Van Gijsegem, F. (2000). Assembly and function of type III secretory systems. *Annual reviews in microbiology*, 54 (1), 735-774.
- Da Silva, P.E.A. & Palomino, J.C. (2011). Molecular basis and mechanisms of drug resistance in *M. tuberculosis*: classical and new drugs. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 66 (7), 1417-1430.
- DiGiuseppe, Champion, P.A. & Cox, J.S. (2007). Protein secretion systems in Mycobacteria. *Cellular microbiology*, 9 (6), 1376-1384.
- Dirección General de Epidemiología, Sistema Estadístico Epidemiológico de las Defunciones 2013 (SEED): Secretaría de Salud.
- Drobniewski, F.A., Caws, M., et al. (2003). Modern laboratory diagnosis of tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 3 (3): 141-147.
- Estándares para la Atención de la Tuberculosis en México. Secretaría de Salud.
- Fallow, A., Domenech, P., & Reed, M. B. (2010). Strains of the East Asian (W/Beijing) lineage of *M. tuberculosis* are DosS/DosT-DosR two-component regulatory system natural mutants. *Journal of bacteriology*, 192 (8), 2228-2238.
- Feltcher, M.E. & Braunstein, M. (2012). Emerging themes in SecA2-mediated protein export. *Nature reviews microbiology*, 10 (11), 779-789.
- Fernández, L.A. & De Lorenzo, V. (2001). Formation of disulphide bonds during secretion of proteins through the periplasmic-independent type I pathway. *Molecular microbiology*, 40 (2), 332-346.
- Flynn, J.L. & Chan, J. (2003). Immune evasion by *M. tuberculosis*: living with the enemy. *Current opinion in immunology*, 15 (4), 450-455.
- Fronzes, R., Schäfer, E., et al. (2009). Structure of a type IV secretion system core complex. *Science*, 323 (5911), 266-268.
- Gandhi, N.R., Nunn, P., et al. (2010). Multidrug-resistant and extensively drug-resistant tuberculosis: a threat to global control of tuberculosis. *The Lancet*, 375 (9728), 1830-1843.
- Glick, B. R. (1995). Metabolic load and heterologous gene expression. *Biotechnology advances*, 13(2), 247-261.
- Green, E.R. & Meccas, J. (2016). Bacterial secretion systems – An overview. *Microbiology spectrum*, 4 (1), 10.1128/microbiolspec.VMBF-0012-2015.
- Gupta, A., Kaul, A., et al. (2012). *Mycobacterium tuberculosis*: immune evasion, latency and reactivation. *Immunobiology*, 217 (3), 363-374.
- Henderson, I.R., Navarro-Garcia, F., et al. (2004). Type V protein secretion pathway: the autotransporter story. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 68: 692–744.
- Hett, E.C., Chao, M.C., et al. (2008). A mycobacterial enzyme essential for cell division synergizes with resuscitation-promoting factor. *PLoS Pathog*, 4(2), e1000001.
- Houben, E.N., Bestebroer, J., et al. (2012). Composition of the type VII secretion system membrane complex. *Molecular microbiology*, 86 (2), 472-484.
- Hueck, C.J. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62 (2), 379-433.
- Jassal, M., & Bishai, W. R. (2009). Extensively drug-resistant tuberculosis. *The Lancet infectious diseases*, 9 (1), 19-30.
- Koch, A., Mizrahi, V., & Warner, D. F. (2014). The impact of drug resistance on *M. tuberculosis* physiology: what can we learn from rifampicin? *Emerging microbes & infections*, 3 (3), e17.
- Korepanova, A., Moore, J. D., et al. (2007). Expression of membrane proteins from *M. tuberculosis* in *E. coli* as fusions with maltose binding protein. *Protein expression and purification*, 53 (1), 24-30.
- Kumar, A., Toledo, J.C., et al. (2007). *Mycobacterium tuberculosis* DosS is a redox sensor and DosT is a hypoxia sensor. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 104 (28), 11568-11573.
- Kusner, D.J. (2005). Mechanisms of mycobacterial persistence in tuberculosis. *Clinical immunology*, 114 (3), 239-247.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685.
- Law, S.D., Zumla, A.I. (2011). Tuberculosis. *Lancet*. 2011; 378: 57-72.
- Levitte, S., Adams, K.N., et al. (2016). Mycobacterial acid tolerance enables phagolysosomal survival and establishment of tuberculous infection *in vivo*. *Cell host & microbe*, 20 (2), 250-258.
- MacGurn, J.A., Raghavan, S., et al. (2005) A non-RD1 gene cluster is required for Snm secretion in *M. tuberculosis*. *Mol Microbiol* 57: 1653–1663.
- Madden, J.C., Ruiz, N., & Caparon, M. (2001). Cytolysin-mediated translocation (CMT): a functional equivalent of type III secretion in gram-positive bacteria. *Cell*, 104 (1), 143-152.
- Manganelli, R., Proveddi, R., et al. (2004). σ factors and global gene regulation in *M. tuberculosis*. *Journal of bacteriology*, 186 (4), 895-902.
- Marais, B.J., Gie, R.P., et al. (2005). Well defined symptoms are of value in the diagnosis of childhood pulmonary tuberculosis. *Arch Dis Child*. 2005; 90: 1162-1165.

- Martinelli, D.J., & Pavelka, M. S. (2016). The RipA and RipB peptidoglycan endopeptidases are individually nonessential to *Mycobacterium smegmatis*. *Journal of bacteriology*, 198 (9), 1464-1475.
- Mazmanian, S.K., Liu, G., et al. (1999). *Staphylococcus aureus* sortase, an enzyme that anchors surface proteins to the cell wall. *Science*, 285, 760-763.
- Mergulhao, F.J.M., Summers, D.K., & Monteiro, G.A. (2005). Recombinant protein secretion in *Escherichia coli*. *Biotechnology advances*, 23 (3), 177-202.
- Mistou, M.Y., Dramsi, S., et al. (2009). Molecular dissection of the secA2 locus of group B Streptococcus reveals that glycosylation of the Srr1 LPXTG protein is required for full virulence. *Journal of bacteriology*, 191 (13), 4195-4206.
- Morlock, G.P., Metchock, B., et al. (2003). ethA, inhA, and katG loci of ethionamide-resistant clinical *Mycobacterium tuberculosis* isolates. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 47 (12), 3799-3805.
- Musser, J. M., Kapur, V., et al (1996). Characterization of the catalase-peroxidase gene (katG) and inhA locus in isoniazid-resistant and -susceptible strains of *M. tuberculosis* by automated DNA sequencing. *Journal of infectious diseases*, 173 (1), 196-202.
- Nakamoto, H., & Bardwell, J.C. (2004). Catalysis of disulfide bond formation and isomerization in the *E. coli* periplasm. (BBA) - *Molecular Cell Research*, 1694 (1), 111-119.
- Natale, P., Brüser, T., & Driessen, A. J. (2008). Sec- and Tat-mediated protein secretion across the bacterial cytoplasmic membrane. *BBA - Biomembranes*, 1778 (9), 1735-1756.
- Neubauer, P., Lin, H. Y., & Mathiszik, B. (2003). Metabolic load of recombinant protein production: inhibition of cellular capacities for glucose uptake and respiration after induction of a heterologous gene in *E. coli*. *Biotechnology & bioengineering*, 83, 53-64.
- Ow, D.S.W., Lim, D.Y.X., et al. (2010). Co-expression of Skp and FkpA chaperones improves cell viability and alters the global expression of stress response genes during scFvD1.3 production. *Microbial cell factories*, 9 (1), 22.
- Pallen, M.J., Chaudhuri, R.R., & Henderson, I.R. (2003). Genomic analysis of secretion systems. *Current opinion in microbiology*, 6 (5), 519-527.
- Park, H.D., Guinn, K.M., et al. (2003). Rv3133c/dosR is a transcription factor that mediates the hypoxic response of *Mycobacterium tuberculosis*. *Molecular microbiology*, 48 (3), 833-843.
- Premkumar, L., Heras, B., et al. (2013). Rv2969c, essential for optimal growth in *M. tuberculosis*, is a DsbA-like enzyme that interacts with VKOR-derived peptides and has atypical features of DsbA-like disulfide oxidases. *Acta crystallographica Section D: Biological crystallography*, 69 (10), 1981-1994.
- Reece, S.T., Loddenkemper, C., et al. (2010). Serine protease activity contributes to control of *M. tuberculosis* in hypoxic lung granulomas in mice. *Journal of clinical investigation*, 120 (9), 3365-3376.
- Rosano, G.L., & Ceccarelli, E.A. (2014). Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. *Recombinant protein expression in microbial systems*, 7.
- Sambrook, Joseph & Russell, David W. (David William), 1957- & Cold Spring Harbor Laboratory (2001). *Molecular cloning: a laboratory manual* (3rd. ed). CSHL, Cold Spring Harbor, N.Y
- Saviola, B. (2013). *Mycobacterium tuberculosis* adaptation to survival in a human host. INTECH Open Access Publisher.
- Schlegel, S., Rujas, E., et al. (2013). Optimizing heterologous protein production in the periplasm of *E. coli* by regulating gene expression levels. *Microbial cell factories*, 12 (1), 24.
- Schlossberg, D. (Ed.). (2011). *Tuberculosis and nontuberculous mycobacterial infections*. American Society for Microbiology Press.
- Shi, L., Sohaskey, C.D., et al. (2008). Transcriptional characterization of the antioxidant response of *M. tuberculosis* in vivo and during adaptation to hypoxia *in vitro*. *Tuberculosis*, 88 (1), 1-6.
- Small, J.L., O'Donoghue, et al. (2013). Substrate specificity of MarP, a periplasmic protease required for resistance to acid and oxidative stress in *M. tuberculosis*. *Journal of biological chemistry*, 288 (18), 12489-12499.
- Song, H., Huff, J., et al. (2011). Expression of the ompATb operon accelerates ammonia secretion and adaptation of *Mycobacterium tuberculosis* to acidic environments. *Molecular microbiology*, 80 (4), 900-918.
- Tullius, M.V., Harmston, C.A., et al. (2011). Discovery and characterization of a unique mycobacterial heme acquisition system. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*. 108 (12), 5051-5056.
- Vandal, O.H., Pierini, L.M., et al. (2008). A membrane protein preserves intrabacterial pH in intraphagosomal *Mycobacterium tuberculosis*. *Nature Medicine*, 14 (8), 849-854.
- Wade, M.M., & Zhang, Y. (2004). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Frontiers in Bioscience*, 9, 975-994.
- Wiker, H.G., Wilson, M.A., and Schoolnik, G.K. (2000) Extracytoplasmic proteins of *M. tuberculosis* – mature secreted proteins often start with aspartic acid and proline. *Microbiology*, 146 (Part 7): 1525–1533.
- Wilson, M.D. (2013) Rapid diagnosis of *Mycobacterium tuberculosis* infection and drug susceptibility testing. *Arch Pathol Lab Med*. 137: 812-819.
- Wu, Q., Zhou, P., et al. (2011). Cloning, expression, identification and bioinformatics analysis of Rv3265c gene from *M. tuberculosis* in *E. coli*. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, 4 (4), 266-270.
- Yoon, S.H., Kim, S.K., & Kim, J.F. (2010). Secretory production of recombinant proteins in *Escherichia coli*. *Recent patents on biotechnology*, 4 (1), 23-29.
- Zhang, Y., & Yew, W.W. (2009). Mechanisms of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis* [state of the art series. Drug-resistant tuberculosis. Edited by C.Y. Chiang. Number 1 in the series]. *International journal of tuberculosis and lung disease*, 13 (11), 1320-1330.
- Zhao, N., Darby, C.M., et al. (2014). Target-based screen against a periplasmic serine protease that regulates intrabacterial pH homeostasis in *M. tuberculosis*. *ACS Chemical Biology*, 10 (2), 364-371.