



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**USO DEL SISTEMA BACTH PARA ELUCIDAR POSIBLES
INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEINA ENTRE LA PROTEÍNA
EccB₃ Y LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR UNA GENOTECA
DE *Mycobacterium tuberculosis*.**

TRABAJO ESPECIAL DE GRADO

Presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela, por la bachiller Daniela Marina Frías Soto como requisito parcial para optar al título de Licenciado en Biología.

Tutor (es): Lic. Luis Querales
Lic. Victoria Navas

CARACAS, VENEZUELA

OCTUBRE – 2018

A Elsa y Pascual, a quienes amo, admiro y valoro, por su esfuerzo y sacrificio de brindarme siempre lo mejor y lo que me hace feliz. Por impulsarme siempre hacia adelante. Estoy eternamente agradecida.

AGRADECIMIENTOS

A mi Alma Mater, la Universidad Central de Venezuela, por permitirme vencer la sombra y culminar con éxito esta etapa tan importante en mi vida.

Al Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), por darme su apoyo tanto académico como institucional.

Al Dr. Howard Takiff, por adoptarme en su laboratorio, darme las riendas de este proyecto, permitirme conocer gente maravillosa y por supuesto por brindarme su apoyo y sabiduría.

A mi tutor, el Lic. Luis Querales, por apoyarme desde el comienzo con este proyecto, por tener la paciencia de explicarme y re-explicarme cuando hacía falta, por la confianza y por sus valiosas enseñanzas.

A mi asesora académica, la Lic. Victoria Navas, por estar siempre pendiente, por sus consejos y por muchas veces ser la voz de mi conciencia.

A la Dra. Guillermina Alonso, por ser una de las mejores profesoras que encontré en mi paso por la UCV, por guiarme a lo largo de la carrera y por sus buenos consejos.

A mis compañeros del Laboratorio de Genética Molecular: Alcibeth, Eduardo, Lizeth, Scarleth, Dra. Claudia, Dra. Elba, Maizo y la Sra. Marta, por todos los momentos compartidos, por mostrarme un poquito de lo que cada uno hace y por enseñarme el valor de un buen trabajo en equipo.

A los amigos que la vida me dio en este trayecto: Andrea y su maravillosa familia, Carla, Carolina, Diego, Fernando, José, Juan, Juanpi, Kelly, Luz y Victoria, personas con las que se puede reír, llorar, volver a reír y además terminan convirtiéndose en parte de tu familia.

A mi abuela, mis tíos, primos y hermanos, a los que quiero y valoro tanto y siempre me han demostrado su cariño y apoyo.

A mi madrina, Alba, por ser mi segunda madre, apoyarme y quererme desde siempre.

A mis padres, Elsa y Pascual, quienes siempre me han dicho que no hay mejor herencia que la educación. Por estar incondicionalmente, por su apoyo, paciencia, buenos consejos y tanto más. Los amo para siempre.

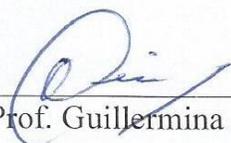
A Dios y la vida, por permitirme ser, estar y cumplir paso a paso las metas que me trazo.

†En memoria del Dr. Gustavo “Gus” López, excelente profesor, amigo y persona. Por compartir conmigo un poquito de las tantas cosas que sabía. Nos dejó muy pronto pero siempre lo recordaré con mucho cariño.

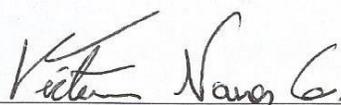
**DEL EXAMEN PÚBLICO Y SOLEMNE DEL TRABAJO ESPECIAL
DE GRADO DEL (A) Br. DANIELA MARINA FRÍAS SOTO**

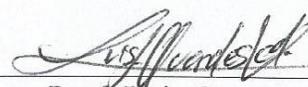
Quienes suscribimos, miembros del jurado evaluador designado por el Consejo de la Escuela de Biología de la Facultad de Ciencias de la Universidad Central de Venezuela para examinar el Trabajo Especial de Grado del (la) Br. Daniela Marina Frías Soto, C.I: 21120460, titulado “USO DEL SISTEMA BACTH PARA ELUCIDAR POSIBLES INTERACCIONES PROTEÍNA-PROTEINA ENTRE LA PROTEÍNA EccB₃ Y LAS PROTEÍNAS CODIFICADAS POR UNA GENOTECA DE *Mycobacterium tuberculosis*”, para optar al título de Licenciado (a) en Biología, considerando que dicho trabajo cumple con los requisitos exigidos en los reglamentos respectivos lo consideramos **APROBADO**.

Para dar fe de ello se levanta la presente acta en Caracas, a los 11 días del mes de Octubre del año 2018, dejando constar que la Prof. Victoria Navas actuó como coordinadora del jurado examinador.


Prof. Guillermina Alonso


Prof. Sandra Fernández


Prof. Victoria Navas
(Tutor - Coordinador)


Prof. Luis Querales
(Tutor)

RESUMEN

Las micobacterias presentan un envoltorio celular inusual caracterizado por la presencia de una pared celular altamente rica en lípidos. Debido a esto requieren de un sistema de secreción de proteínas especializado que atraviese esta barrera hidrofóbica. Recientemente se ha descrito un sistema de secreción para el transporte de proteínas hacia el exterior celular, denominado sistema de secreción tipo VII o ESX, a través del cual las micobacterias patógenas pueden alterar las defensas inmunitarias de su hospedador por la secreción de múltiples factores de virulencia.

En el genoma de *M. tuberculosis* existen 5 grupos de genes que codifican sistemas de secreción tipo VII (ESX-1 hasta el ESX-5) los cuales están constituidos principalmente por proteínas conservadas denominadas: EccA, EccB, EccC, EccD y EccE. El sistema más estudiado es el ESX-1 y es responsable de la secreción de las proteínas EsxA y EsxB las cuales cumplen un rol importante en la virulencia de *M. tuberculosis*. Por otro lado, a pesar de que el resto de los sistemas no han sido estudiados tan extensivamente, se ha descubierto que el sistema ESX-3 es esencial para el crecimiento *in vitro* de *M. tuberculosis* y que está involucrado en la homeostasis de hierro y zinc.

En esta investigación, haciendo uso del sistema BACTH cualitativa y cuantitativamente, parecen haber sido detectados tres genes que codifican proteínas capaces de interactuar con la proteína EccB₃: *rv1610*, *hemY* y *ppe5*. Además, evidenciamos la posible ocurrencia de un deslizamiento transcripcional que permitiría la expresión los genes *hemY* y *ppe5*, a pesar de haber quedado fuera de marco con el fragmento T18. Estas proteínas están involucradas en biosíntesis de Trp (Rv1610), biosíntesis del grupo hemo (HemY) y variación antigénica (PPE5). Sin embargo, estos resultados representan una primera aproximación al entendimiento de la red de interacciones de la proteína EccB₃.

Estudiar al sistema ESX-3 permitirá ayudar a mejorar el entendimiento sobre la persistencia de este letal patógeno. El análisis de las proteínas que lo componen, su mecanismo de acción y las interacciones que puedan tener éstas con el resto de las proteínas codificadas por el genoma de *M. tuberculosis* puede contribuir a ello, de manera que en un futuro ésta información pueda emplearse en el desarrollo de nuevas vacunas o drogas contra la tuberculosis.

Palabras clave: *Mycobacterium*, Micobacterias, *Mycobacterium tuberculosis*, Tuberculosis, Sistema de secreción ESX, Sistema BACTH, Interacción de proteínas, EccB₃, Rv1610, HemY, PPE5.

ÍNDICE DE CONTENIDO

Resumen	V
Índice de tablas	VIII
Índice de figuras	IX
Lista de abreviaturas	XI
Introducción	1
1. Principales características de las micobacterias	2
2. Tuberculosis: patogénesis e incidencia global.....	3
3. Sistemas de secreción en bacterias.....	6
4. Sistema de secreción tipo VII.....	8
4.1. Sistema de secreción ESX-3.....	11
4.1.1. Proteína EccB.....	13
5. Sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano (BACTH)	14
Antecedentes	18
Objetivos	20
Materiales y métodos	21
Reactivos, buffers y medios de cultivo	21
Cepas bacterianas	22
Plásmidos	22
Preparación de células competentes.....	23
Transformación bacteriana.....	24

Verificación de los plásmidos	24
Extracción de ADN	24
Digestión con enzimas de restricción.....	24
Electroforesis en gel de agarosa	25
Evaluación de interacciones proteína-proteína a través del sistema BACTH	25
Selección de colonias de interés	25
Confirmación de las interacciones	26
Ensayo de la actividad de la β -galactosidasa	26
Análisis estadístico	27
Identificación de los genes que interactúan con EccB ₃	28
Análisis con programas bioinformáticos.....	28
Resultados	30
Ensayo cualitativo para la detección de clones que presenten posibles interacciones proteína-proteína entre la proteína EccB ₃ y otras proteínas de <i>M. tuberculosis</i>	30
Medición de la actividad de la β -galactosidasa para cuantificar la complementación funcional entre las proteínas híbridas.....	36
Identificación de los genes de <i>M. tuberculosis</i> que codifican proteínas que podrían interactuar con EccB ₃	39
Discusión	51
Conclusiones	63
Bibliografía	64
Anexo	72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Enzimas de restricción usadas para verificación de los plásmidos del sistema BACTH .	24
Tabla 2. Iniciadores utilizados para la identificación de los genes de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	28
Tabla 3. Concentración de ADN de los cuatro plásmidos aislados (pUT18c-gen MTB).....	40

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Modelo para los sistemas de secreción tipo VII.....	10
Figura 2. Organización genética de los loci ESX-1 y ESX-3.....	11
Figura 3. Mapa genético río arriba del gen <i>rv0282</i>	12
Figura 4. Modelos estructurales de la proteína EccB ₁	14
Figura 5. Principio del sistema BACTH	16
Figura 6. Representación esquemática de los plásmidos BACTH.....	23
Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de los plásmidos del sistema BACTH	30
Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de la construcción plasmídica pKT25-EccB ₃	31
Figura 9. Colonias obtenidas durante el segundo ensayo BACTH.....	32
Figura 10. Colonias obtenidas durante el tercer ensayo BACTH	33
Figura 11. Primer paso de confirmación de interacciones proteína-proteína	33
Figura 12. Segundo paso de confirmación de interacciones proteína-proteína	34
Figura 13. Tercer paso de confirmación de interacciones proteína-proteína	35
Figura 14. Representación de la absorbancia vs tiempo del control positivo ZIP y control negativo durante ensayo de la actividad de β -galactosidasa	36
Figura 15. Actividad de la β -galactosidasa de las muestras obtenidas durante el ensayo cualitativo.....	38
Figura 16. Nivel de actividad de la β -galactosidasa respecto a los controles negativos.....	39
Figura 17. ADN plasmídico de las cuatro muestras positivas para interacción proteína-proteína con EccB ₃	40
Figura 18. Alineamiento entre la muestra #1 y el plásmido pUT18c.....	41

Figura 19. Alineamiento entre la muestra #1 y el plásmido pUT18	41
Figura 20. Esquemización del plásmido pUT18.....	42
Figura 21. Alineamiento entre la muestra #1 y el gen <i>rv1610</i> : secuencias aminoacídicas.....	43
Figura 22. Alineamiento entre la muestra #1 y el gen <i>rv1610</i> : secuencias nucleotídicas.....	43
Figura 23. Alineamiento entre la muestra #2 y el gen <i>hemY</i> : secuencias aminoacídicas	44
Figura 24. Alineamiento entre la muestra #2 y el gen <i>hemY</i> : secuencias nucleotídicas	44
Figura 25. Alineamiento entre la muestra #3 y el gen <i>PE_PGRS30</i> : secuencias aminoacídicas .	44
Figura 26. Alineamiento entre la muestra #3 (hebra complementaria) y el gen que codifica para la proteína <i>PE_PGR30</i> : secuencias nucleotídicas	45
Figura 27. Alineamiento entre la muestra #4 y el gen <i>PPE5</i> : secuencias aminoacídicas.....	45
Figura 28. Alineamiento entre la muestra #4 y el gen <i>PPE5</i> : secuencias nucleotídicas	45
Figura 29. Posible secuencia de desplazamiento transcripcional en la muestra #2.....	46
Figura 30. Posible secuencia de desplazamiento transcripcional en la muestra #4.....	47
Figura 31. Predicción de regiones transmembrana, citoplasmáticas y extracelulares de la proteína Rv1610 utilizando el programa TMHMM.....	49
Figura 32. Modelado topológico de las proteínas Rv1610, hemY y PPE5 usando el programa Protter.....	49
Figura 33. Modelado topológico de la proteína EccB ₃ usando el programa Protter	50

LISTA DE ABREVIATURAS

- **aa:** Aminoácido.
- **ADN:** Ácido desoxirribonucleico.
- **AMPc:** Adenosín monofosfato cíclico.
- **ARNm:** Ácido ribonucleico mensajero.
- **ATP:** Adenosín trifosfato.
- **BACTH:** Sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano.
- **BCG:** Bacilo de Calmette-Guerin.
- **BrEt:** Bromuro de etidio.
- **CAP:** Proteína activadora de catabolitos.
- **D.O:** Densidad óptica.
- **Ecc:** Componente conservado del sistema ESX.
- **ESX:** Sistema de secreción ESAT-6.
- **FACS:** Clasificación de células asistida por fluorescencia.
- **FAD:** Flavín adenín dinucleótido.
- **GFP:** Proteína verde fluorescente.
- **IdeR:** Represor dependiente de hierro.
- **IPTG:** Isopropil β -D-1-tiogalactopiranosido.
- **lacZ:** Gen de la β -galactosidasa.
- **LB:** Medio Luria Bertani
- **MCS:** Sitio múltiple de clonamiento.
- **MDR-TB:** Tuberculosis multidroga resistente.
- **MTB:** *Mycobacterium tuberculosis*.
- **MTN:** Micobacterias no tuberculosas.
- **OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- **ONPG:** Orto-nitrofenil- β -galactósido.
- **Pb:** Pares de bases.
- **PE:** Pro-Glu (Familia de proteínas micobacterianas)
- **PGRS:** secuencia polimórfica rica en GC (Familia de proteínas micobacterianas)
- **PPE:** Pro-Pro-Glu (Familia de proteínas micobacterianas)
- **RD1:** Región de diferencia 1.
- **RR-TB:** Tuberculosis resistente a rifampicina.
- **RT-PCR:** Reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa reversa.
- **SDS:** Dodecilsulfato sódico.
- **TB:** Tuberculosis.
- **TFB I:** Buffer de transformación I.
- **TFB II:** Buffer de transformación II.
- **Trp:** Triptófano.
- **VIH:** Virus de la inmunodeficiencia humana.
- **XDR-TB:** Tuberculosis ultrarresistente a drogas.
- **Zur:** Regulador de la toma de zinc.

INTRODUCCIÓN

El género *Mycobacterium* es innegablemente uno de los taxa bacterianos más importante clínicamente y ha sido muy estudiado debido a que varias de sus especies causan enfermedades con una gran morbilidad y mortalidad a nivel mundial, como lo son la tuberculosis, la lepra y en las últimas décadas, las causadas por micobacterias no tuberculosas (MTN) (Casal y col., 1999). El interés clínico en las micobacterias comenzó con el trabajo de Koch en el año 1882, quien detectó el bacilo tuberculoso en tejidos infectados, cultivó el organismo y tuvo éxito al obtener colonias de este organismo sobre suero de sangre coagulada (Madigan y col., 2009).

La tuberculosis es una de las aflicciones humanas más antigua y todavía hoy en día, según datos aportados por la OMS, es el mayor asesino entre las enfermedades infecciosas bacterianas, a pesar del uso a nivel mundial de una vacuna viva atenuada (BCG) y una gran variedad de antibióticos. En general, una pequeña proporción (5-15%) de los 2-3 billones de personas infectadas con *Mycobacterium tuberculosis* podrían desarrollar la enfermedad durante su vida, siendo la probabilidad mucho más alta entre personas infectadas con VIH (OMS, 2016).

La vacuna BCG fue desarrollada hace aproximadamente 100 años y aunque sólo previene las formas más severas de tuberculosis en niños, es comúnmente usada en muchos países. Sin embargo, la Organización Mundial de la Salud (2016) indica que ésta no es una vacuna que sea efectiva en la prevención de la enfermedad en adultos, ya sea antes o después de la exposición a la infección. Por tal motivo, se ha hecho necesario el descubrimiento de nuevas drogas y vacunas para detener la epidemia mundial de tuberculosis, que mata alrededor de 2 millones de personas cada año. Para el desarrollo de estos agentes antituberculosos es esencial estudiar la fisiología y genética tanto de *Mycobacterium tuberculosis*, así como de las micobacterias en general. Además es importante entender las interacciones con el hospedador para saber cómo esta bacteria destruye sus defensas y causa la enfermedad (Smith, 2003).

1. Principales características de las micobacterias.

El género *Mycobacterium* está conformado por bacilos largos (3-5 μm) que tienen la propiedad de ser ácido alcohol resistentes debido a la presencia en su superficie de unos lípidos característicos denominados ácidos micólicos (Madigan y col., 2009). Estos lípidos conforman una membrana externa particular, denominada “micomembrana”, que es específica de micobacterias y cumple una función de barrera, similar a la membrana externa de bacterias Gram-negativas (Le Chevalier y col., 2014).

Las micobacterias son biológicamente similares a las bacterias Gram-positivas (aunque frente a la tinción Gram no se tiñen o lo hacen muy débilmente), sin embargo aunque ambos tipos de bacterias tienen peptidoglicano en su pared celular, difieren en que las moléculas asociadas a este polímero son en las micobacterias fundamentalmente de naturaleza lipídica en lugar de proteínas y lipopolisacáridos como en otras bacterias (Rodríguez, 2008).

El genoma de las bacterias que integran este género tiene un contenido de bases nitrogenadas Guanina-Citosina entre el 60 y 70%, suelen ser pleomórficas y pueden desarrollar ramificaciones o filamentos. Además, pueden dividirse en dos grupos principales de acuerdo al tiempo que tardan en crecer en medios de cultivo sólidos, denominándose de crecimiento rápido a las que tardan menos de 7 días en crecer, como *Mycobacterium smegmatis* y de crecimiento lento a las que tardan más de 7 días en crecer, como *Mycobacterium tuberculosis* (Madigan y col., 2009).

Según Falkinham (2008), las principales características distinguibles de las micobacterias son: crecimiento lento, hidrofobicidad e impermeabilidad debido a su membrana externa hidrofóbica, cerosa y lipídica. Estos lípidos son refractarios al ataque hidrolítico por parte de enzimas celulares, confiriéndoles resistencia ante un gran número de agentes antimicrobianos así como tolerancia general al estrés ambiental o celular (Liu y col., 1999; Primm y col., 2004).

2. Tuberculosis: patogénesis e incidencia global.

Entre las micobacterias patógenas más letales se encuentra el bacilo *Mycobacterium tuberculosis* (MTB), agente causal de la tuberculosis, enfermedad infecciosa que afecta comúnmente los pulmones (tuberculosis pulmonar), aunque también puede afectar otros órganos (tuberculosis extra pulmonar), incluyendo el ataque a huesos causando deformidades esqueléticas (Organización Mundial de la Salud, 2016).

Esta enfermedad es transmitida a través de gotas aerolizadas que contienen al bacilo, las cuales son generadas por la tos de una persona infectada con tuberculosis pulmonar, pudiendo ser inhaladas por las personas de su entorno. Durante la infección, el bacilo reside principalmente en los espacios aéreos pulmonares donde logra entrar y replicarse en macrófagos alveolares, cuya función es fagocitar y destruir microorganismos invasores. Así, la bacteria induce muerte celular a los macrófagos para luego ser liberada y propagarse hacia otros macrófagos cercanos dentro del hospedero (Glickman y Jacobs, 2001; Stanley y col., 2003).

En la mayoría de los casos de infección por MTB, el individuo es asintomático y no infeccioso. Sin embargo, este estado de latencia puede reactivarse en respuesta a perturbaciones de la respuesta inmune, ocasionando la forma activa de la enfermedad. Entre los factores que incrementan el potencial de reactivación de la tuberculosis latente se encuentran la infección con VIH, tratamientos con corticosteroides, envejecimiento y abuso de drogas y alcohol (Flynn y Chan, 2001).

En el 90% de los casos, individuos inmunocompetentes suelen controlar la infección ya que alrededor del bacilo se agrupan células del sistema inmunitario (principalmente linfocitos y macrófagos) que originan la formación de un granuloma, encerrándolo y evitando su proliferación (Rodríguez, 2008; Maulén, 2011). Sin embargo, el bacilo no es erradicado completamente del organismo hospedero, por lo que *Mycobacterium tuberculosis* es considerado el patógeno bacteriano más hábil para establecerse y mantenerse en estado latente con opción de reactivación a futuro (Maulén, 2011).

Según Pieters y Gatfield (2002), MTB puede sobrevivir dentro del cuerpo humano por muy largos periodos de tiempo sin ser letal para el hospedero infectado. Se cree que la clave para su persistencia y patogenicidad es su capacidad para evitar la fusión de fagosomas a lisosomas. Normalmente cuando las bacterias son internalizadas por macrófagos, éstas son rápidamente destruidas en lisosomas debido a la presencia de potentes enzimas hidrolíticas capaces de degradar un amplio rango de macromoléculas (Flynn y Chan, 2001).

Sin embargo, en un 5-10% de los casos y más aún en personas inmunodeprimidas como las que padecen VIH, desnutrición o diabetes y consumidores de tabaco, la infección no puede contenerse por fallas a nivel de respuestas inmunitarias, de manera que la reactivación y replicación del bacilo continúa. Las micobacterias patógenas permanecen dentro de fagosomas micobacterianos y se cree que elementos bacterianos interfieren con la ruta normal que envía moléculas desde fagosomas a lisosomas (Flynn y Chan, 2001; Pieters y Gatfield, 2002; OMS, 2018).

Actualmente se conoce que un factor de virulencia que podría contribuir con la supervivencia de MTB en macrófagos es su habilidad para prevenir la acidificación del fagosoma. Comúnmente, cuando una bacteria es ingerida por fagocitosis ocurre la acidificación del fagosoma, lo cual está mediado por ATPasas en la membrana del fagosoma que bombea protones hacia su interior, reduciendo así su pH. Esta acidificación no solo inhibe el crecimiento bacteriano sino que además es un paso importante en la fusión fagosoma-lisosoma así como en la activación de factores bactericidas liberados durante esta fusión como lo son las enzimas hidrolíticas. A través de estudios *in vitro* se demostró que MTB contrarresta la acidificación produciendo grandes cantidades de amoníaco en cultivos, se cree entonces que produce un efecto inhibitorio en la fusión del fagolisosoma manteniendo así las condiciones óptimas para su crecimiento dentro de las vesículas. Sin embargo, los mecanismos precisos sobre cómo el amoníaco previene la fusión del fagolisosoma aún no se han determinado (Flynn y Chan, 2001; Rodríguez, 2008).

El estado latente de MTB dentro del hospedador es mantenido bajo control por las respuestas inmunes innatas y adaptativas que están bien equipadas para acabar con la micobacteria que ha

invadido los macrófagos. Pero cuando los bacilos logran superar estas defensas, o cuando el sistema inmune del hospedador está comprometido, tienen el potencial para causar severas lesiones (Pieters y Gatfield, 2002). En resumen, la particularidad de MTB en comparación con varios patógenos micobacterianos facultativos es que éste es un patógeno obligado, cuya transmisión a nuevos hospederos humanos ocurre a partir de pacientes que han desarrollado la forma activa de la enfermedad, lo cual implica necrosis del tejido pulmonar, formación de cavidades (granuloma caseoso) y propagación a través de la tos del bacilo infeccioso hacia el ambiente inmediato en forma de pequeñas gotas (Le Chevalier, 2014).

Los tratamientos efectivos usando drogas contra esta enfermedad fueron desarrollados por primera vez en los años 1940s y no fue hasta los años 1970s que comenzó su uso en personas infectadas. Actualmente, los tratamientos recomendados para nuevos casos de tuberculosis susceptibles a drogas deben ser prolongados debido a que MTB es una bacteria de crecimiento lento. Este tratamiento incluye un régimen de 6 meses con el uso de 4 drogas de primera línea: isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida para 2 meses, y otros 4 meses sólo con isoniacida y rifampicina. Se calcula que entre los años 2000 y 2016 se salvaron unas 53 millones de vidas gracias al diagnóstico y tratamiento de la tuberculosis (OMS, 2018).

Sin embargo, ha aumentado la aparición de resistencia a agentes antituberculosos, lo que ha constituido el principal problema para el tratamiento (OMS, 2016). El único mecanismo demostrado hasta el presente capaz de originar resistencia en MTB es el resultado de mutación espontánea a nivel cromosómico. Es por ello que surgió la necesidad de una terapia combinada, ya que permite la destrucción de bacilos resistentes a una droga a través de otras. El problema emergente actualmente en algunas poblaciones es la multirresistencia (Rodríguez, 2008). Los tratamientos para Tuberculosis Resistente a Rifampicina (RR-TB), Tuberculosis Multidroga-Resistente (MDR-TB) y Tuberculosis Ultrarresistente a Drogas (XDR-TB), requieren de otras drogas más costosas y tóxicas, representando el último caso la forma más grave de la enfermedad y constituyendo un mayor riesgo ya que las opciones para tratamiento son muy limitadas (OMS, 2016; Chan y col., 2017; OMS, 2018).

La tuberculosis es una enfermedad que está presente en el mundo entero. En el año 2015 ocupó el primer lugar de causas de muerte por infecciones bacterianas a nivel mundial y se calcula que una cuarta parte de la población mundial tiene tuberculosis en estado de latencia. En el año 2016 el mayor número de casos se registró en Asia (45%) seguido de África (25%). La mejor estimación realizada por la Organización Mundial de la Salud (2016) es que hubo cerca de 1.4 millones de muertes por tuberculosis en 2015, y un adicional de 0.4 millones de muertes resultaron de la enfermedad entre personas VIH positivas. Además, aunque ha sido planteada la eliminación de la tuberculosis dentro de las próximas décadas, la tasa de disminución en la incidencia permanece sólo en 1.5% del año 2014 al 2015.

Con respecto a los datos y cifras en Venezuela, para el año 2016 la Organización Mundial de la Salud estimó que 710 personas murieron debido a esta enfermedad (excluyendo a personas con VIH) y alrededor de 250 personas que padecían coinfección con VIH. La incidencia se estima en 10.000 nuevos casos y se estima que existen alrededor de 410 casos de personas con TB-RR y TB-MDR.

3. Sistemas de secreción en bacterias.

Para favorecer la infección y que las bacterias patógenas sean capaces de interactuar con componentes de las células hospederas, estas han desarrollado maquinarias que permiten expresar un amplio rango de moléculas hacia el exterior celular. Estas se denominan sistemas de secreción de proteínas, constituyendo un mecanismo de virulencia determinante durante la infección (Pizarro y Cossart, 2006; Cárdenas-Perea y col., 2014).

Los sistemas de secreción bacteriana fueron inicialmente estudiados en la bacteria Gram-negativa *E. coli* K-12, sin embargo existen otros tipos de sistemas de secreción de proteínas que esta bacteria no posee. En bacterias Gram-negativas las proteínas a translocarse deben atravesar dos barreras lipídicas separadas por el espacio periplásmico y la capa de peptidoglicano: la membrana interna, y la membrana externa que está compuesta principalmente por lipopolisacáridos. Por ende, debe existir un mecanismo para que ocurra el transporte de proteínas, ya sea el acoplamiento de la energía de la membrana interna para transportar las proteínas a

través de la membrana externa o el cruce de toda la envoltura celular en un único paso. Por otra parte, en bacterias Gram-positivas la secreción de proteínas hacia el exterior celular requiere del transporte a través de una única membrana (Cárdenas-Perea y col., 2014; Ates y col., 2016).

Existen siete tipos de sistemas de secreción principales (del tipo I al tipo VII) clasificados en base a la naturaleza molecular de las maquinarias de transporte y las reacciones que catalizan. A su vez, estos pueden subdividirse en dos clases según el mecanismo usado para el transporte a través de la membrana plasmática: la vía Sec-dependiente y la vía Sec-independiente (Cabañas y Huerta, 2014).

La vía Sec-dependiente necesita de una secuencia señal ubicada en el extremo amino terminal de la proteína a ser secretada, ya que por medio de esta la proteína puede ser reconocida y transportada por el sistema de secreción. Además, la secreción ocurre en dos pasos atravesando primero la membrana interna y luego la externa (Koster y col., 2000). Esta vía transloca proteínas principalmente en su estado desplegado que pueden cumplir diversas funciones, incluyendo promover la virulencia en caso de patógenos bacterianos (Green y Mecsas, 2016). Por otro lado, las vías Sec-independientes, no necesitan de un péptido señal y translocan sus productos de secreción en un único paso atravesando la membrana interna, la membrana externa y en caso de ser patógenas, la membrana de la célula hospedera (Koster y col., 2000). Un ejemplo de bacterias que usan este sistema de secreción es el caso de *Escherichia coli* (Hernández, 2009).

Las micobacterias, debido a la presencia de una característica membrana externa rica en ácidos micólicos requieren de un sistema de secreción diferente que se ha denominado Sistema de Secreción Tipo VII o ESX (Abdallah y col., 2007). Este sistema es responsable de la secreción de múltiples proteínas que carecen de péptidos señal de secreción clásica en micobacterias (Daleke y col., 2012) y es a través de este que *Mycobacterium tuberculosis* altera las defensas inmunes del hospedador, debido a la secreción de múltiples factores de virulencia (Ligon y col., 2012).

4. Sistema de secreción tipo VII.

El complejo envoltorio celular de las micobacterias necesita eficientes sistemas de secreción que puedan asegurar el transporte de una amplio rango de biomoléculas a través de esta barrera multicapa (Le Chevalier, 2014). Más aún, las micobacterias patogénicas requieren este tipo de sistema de secreción para transportar factores de virulencia a través de sus características membranas de protección celular hacia las células del hospedero infectado (Daleke y col., 2012).

El genoma de las micobacterias puede tener hasta 5 loci parálogos ESX (ESX-1 al ESX-5) y en particular, MTB contiene los 5 loci completos en su genoma (Daleke y col., 2012). Se ha demostrado que tanto ESX-1, ESX-3 como ESX-5 parecen ser esenciales para la virulencia y viabilidad de especies patógenas (Houben y col., 2014).

Análisis filogenéticos realizados por Gey van Pittius y col. (2001) revelaron que el sistema ESX-4 es el locus más pequeño y a través de análisis de secuencias de proteínas de los 5 sistemas, predijeron que este sistema es la región ancestral a partir del cual el resto emergió por duplicación de genes y/o eventos de diversificación genética. Según Bitter y col. (2009), la hipótesis de que el sistema ESX-4 es el sistema ancestral se basa en la observación de que los loci como ESX-4 son los únicos cluster ESX que se encuentran en otras bacterias Gram-positivas con alto contenido G+C, sugiriendo que el ultimo ancestro común de las micobacterias ya albergaba el sistema de secreción tipo VII ESX-4. Los subsecuentes eventos de duplicación parecen extenderse a través del siguiente orden: los sistemas ESX-1 (Rv3866-Rv3883c) y ESX-3 (Rv0282-Rv0292) hasta los sistemas ESX-2 (Rv3884c-Rv3895c) y ESX-5 (Rv1782-Rv1798) (Gey van Pittius y col., 2001).

El sistema ESX-1 ha sido el más estudiado porque es responsable de la secreción de numerosas proteínas, entre las que se encuentran ESAT-6 (EsxA) y CFP-10 (EsxB) que son secretadas como un heterodímero y además se ha demostrado cumplen un rol importante como factores de virulencia (Berthet y col., 1998). Además, se cree que están involucradas en la inducción de la ruptura fagosomal, liberando así a la bacteria y/o sus productos bacterianos dentro del citosol de la célula hospedera, promoviendo el crecimiento intracelular de MTB en macrófagos

(Daleke y col., 2012; Stoop y col., 2012). Los genes de este sistema están localizados en el genoma de MTB en el locus RD1 y son importantes para la virulencia ya que varios mutantes con ausencia de esta región, incluyendo la cepa BCG (vacuna usada contra la tuberculosis), experimentan atenuación tanto *in vitro* como *in vivo* (Guinn y col., 2004). Por otra parte, el sistema ESX-3 además de ser importante en virulencia, también está involucrado en la adquisición y regulación de hierro y zinc, así como ha resultado ser esencial para el crecimiento de MTB *in vitro* en medios de cultivo (Loots y col., 2013). El sistema ESX-5 juega también un rol importante en la virulencia ya que secreta la mayoría de las proteínas PE/PPE las cuales son únicas para micobacterias ocupando casi el 10% del genoma de *M. tuberculosis* (167 genes), además de ser altamente inmunogénicas (Abdallah y col., 2007). Generalmente este sistema es responsable de la integridad y estabilidad de la pared celular, lisis de la célula hospedera y fuerte atenuación. Secreta las proteínas EsxM y EsxN, que dimerizan en MTB, y son antígenos que inducen respuestas de las células T CD4+ en varios modelos animales y humanos (Chan y col., 2017). Con respecto a los sistemas ESX-2 y ESX-4, estos no han sido muy estudiados y se cree que no cumplen funciones vitales para MTB (Bitter y col., 2009).

Una vez que los sustratos de los sistemas de secreción tipo VII son reconocidos en el citosol, ellos deben ser dirigidos hacia la membrana interna y subsecuentemente transportados a través del envoltorio celular micobacteriano (Houben y col., 2014). Para ello, cada sistema de secreción ESX está constituido por un complejo multiprotéico (figura 1), compuesto por proteínas conservadas ESX (denominadas Ecc) entre las que se encuentran la EccA (ATPasa citosólica), EccB (proteína transmembrana), EccC (ATPasa transmembrana), EccD (canal de membrana) y EccE (proteína transmembrana). Además, tienen una proteasa MycP y sustratos representados por un par de proteínas de secreción denominadas Esx, y proteínas PE/PPE. Se hipotetiza que tanto las proteínas Esx como las PE/PPE actúan como factores de virulencia (Cole y col., 1998; Bitter y col., 2009).

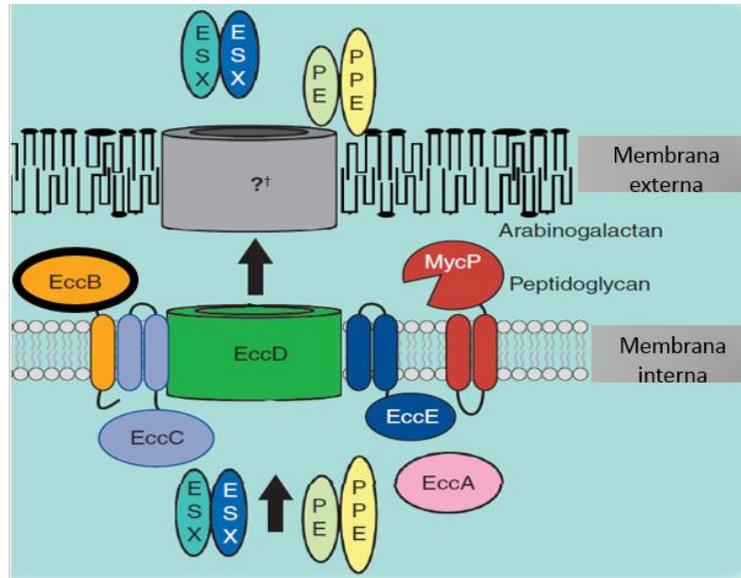


Figura 1. Modelo para los sistemas de secreción tipo VII. Se muestran las localizaciones putativas de las proteínas de los sistemas ESX. Tanto las proteínas Esx como las PE/PPE son exportadas como dímeros. En este modelo, el sistema de secreción tipo VII ocurre en un proceso de dos pasos, en el que el canal de la membrana externa se refiere a un poro hipotético y aún no identificado (Tomado de Houben y col., 2014 y Le Chevalier y col., 2014)

Intrigantemente, los 5 sistemas ESX no se complementan entre sí a pesar de poseer genes parálogos muy similares. Esto se evidenció por la incapacidad de los cuatro sistemas ESX (2-5) para complementar la pérdida de virulencia que es causada por deleciones en el sistema ESX-1 (Abdallah y col., 2007). Los mismos autores confieren esta incapacidad de complementación a la divergencia evolutiva de sus señales de secreción y también a sus sistemas de regulación diferentes. Además, a partir de estudios mutagénicos en MTB se ha demostrado que los genes de los sistemas ESX-1, ESX-2 y ESX-4 pueden ser interrumpidos sin afectar la viabilidad de la bacteria. Esto es diferente para los genes de ESX-3 y algunos de ESX-5 los cuales no pueden interrumpirse a menos que se complemente el medio con otra fuente de hierro, sugiriendo a estos últimos sistemas como esenciales para el crecimiento *in vitro* (Tufariello y col., 2016).

La esencialidad de los sistemas ESX-5 y ESX-3 para el crecimiento de *Mycobacterium tuberculosis* hace a estos dos sistemas blancos potenciales para el diseño de nuevos agentes antituberculosos (Simeone y col., 2015).

4.1. Sistema de secreción ESX-3

El sistema de secreción ESX-3 está codificado en el genoma de MTB por los genes del *rv0282* al *rv0292* y se ha demostrado que a diferencia de ésta, la micobacteria no patogénica *M. smegmatis* puede crecer sin este sistema en un medio normal de crecimiento (Siegrist y col., 2009). Sin embargo, se han complicado los esfuerzos para probar las contribuciones que tienen las proteínas individuales que lo conforman a la función del sistema completo (Siegrist y col., 2009; Loots y col., 2012).

Según Bitter y col. (2009), la organización de los loci de los sistemas ESX-1 y ESX-3 es similar (figura 2). Los genes *esxA* y *esxB* del sistema ESX-1 son parálogos a los genes *esxG* y *esxH* pertenecientes al sistema ESX-3 y se ha demostrado que forman un heterodímero con características estructurales similares (Houben y col., 2014).

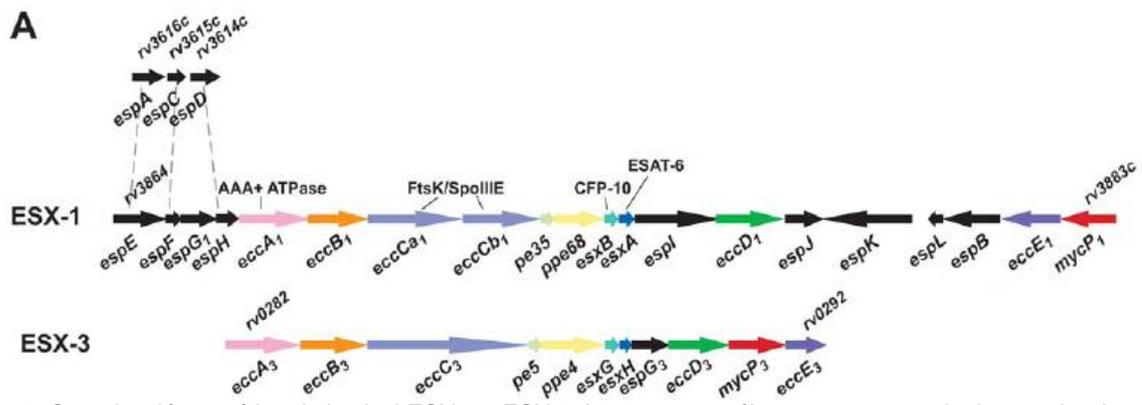


Figura 2. Organización genética de los loci ESX-1 y ESX-3. Los genes parálogos conservan el mismo color de la flecha (tomado de Bitter y col., 2009).

Interesantemente, el sistema de secreción ESX-3 es conservado en todos los genomas micobacterianos secuenciados hasta la fecha, sugiriendo que cumple un rol importante (Stoop y col., 2012). Aunque es poco lo que se conoce sobre este sistema de secreción, se ha descubierto que en MTB la expresión de sus genes está bajo regulación transcripcional doble (figura 3), es decir por dos promotores diferentes río arriba de su primer gen (*rv0282*): uno superpone el sitio de unión Zur mientras que el otro superpone el sitio de unión IdeR. Actuando IdeR como un represor transcripcional regulado negativamente por hierro, mientras que Zur actúa como un represor

transcripcional negativamente regulado por zinc, sugiriendo a este sistema involucrado en el mantenimiento de la homeostasis de estos dos metales (Maciag y col., 2007; Bottai y col., 2014).

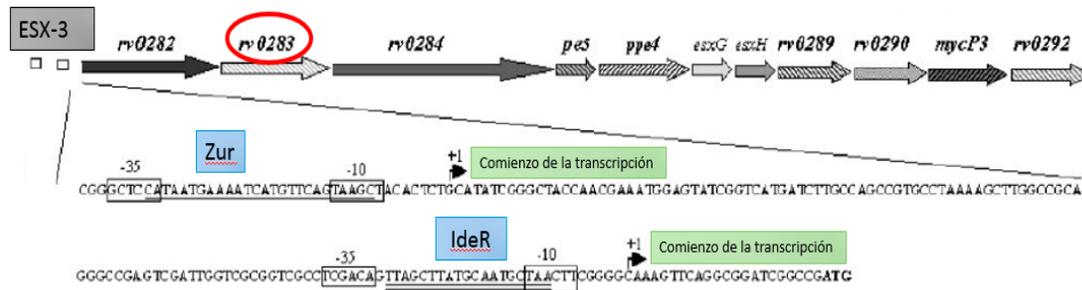


Figura 3. Mapa genético río arriba del gen *rv0282*. Los sitios de unión Zur están subrayados y los de IdeR están doblemente subrayados. Se señalan los sitios donde comienza la transcripción (+1) y las regiones promotoras -35 y -10 están en cajas (Tomado de Maciag y col., 2007).

El hierro es abundante en micobacterias y actúa como cofactor de al menos 40 enzimas codificadas por el genoma de MTB, incluyendo varias proteínas involucradas en biosíntesis de aminoácidos, cadena transportadora de electrones y otras hemoproteínas involucradas en el metabolismo. Sin embargo, el exceso de hierro y zinc resulta tóxico para las células, ya que el exceso de hierro puede romper el balance redox celular y el exceso de zinc puede competir con otros metales para unirse a los sitios activos de múltiples enzimas esenciales. Es por esto que la toma y almacenamiento de ambos metales necesita ser estrictamente regulada en estos organismos. Sin embargo, el rol preciso del sistema ESX-3 en su homeostasis es poco clara (Loots y col., 2012). Serafini y col. (2009) encontraron que mutantes condicionales de *M. tuberculosis* ESX-3 fueron capaces de crecer en un cultivo filtrado de *M. tuberculosis* tipo silvestre, lo que sugirió que el sistema ESX-3 secreta un factor o sustrato que permite la captura de hierro y zinc.

Incluso en presencia de altas concentraciones de ambos metales, la represión de los dos promotores no es total, detectando ARNm del sistema ESX-3, lo que sugiere que cumple un rol fundamental en la toma y regulación de hierro y zinc tanto en condiciones de limitación como cuando no la hay. Esta regulación transcripcional es diferente en *M. smegmatis* ya que esta bacteria solo tiene un promotor dependiente de hierro (Bottai y col., 2014).

Maciag y col. (2006) sugieren que es posible que Zur no esté involucrado en la virulencia debido a que experimentos con cepas mutantes expuestas a condiciones estresantes no mostraron ninguna diferencia de las cepas tipo silvestre. Además tampoco mostraron comportamientos diferentes de la cepa silvestre en modelos de infección en ratones.

El descubrimiento de que este sistema está inducido bajo condiciones limitantes de hierro y zinc podría dar pistas sobre su función fisiológica, tomando en cuenta que la concentración de ambos metales disponible en el cuerpo es baja y más aún que la concentración de zinc es baja en los alveolos pulmonares. Esto sugiere que las proteínas secretadas por ESX-3 podrían estar involucradas en el desecho y/o toma de hierro y/o zinc. También es importante mencionar que las proteínas Esx son conocidas por pertenecer a los antígenos T más potentes, sugiriendo que la modulación de su expresión en respuesta a cambios en las concentraciones de hierro y zinc podría modificar fuertemente el perfil antigénico de *M. tuberculosis* durante el curso de la infección (Maciag y col., 2006).

4.1.1. Proteína EccB

En los 5 sistemas ESX se encuentra presente la proteína conservada EccB y se ha demostrado que EccB₁ parece ser esencial para la secreción de factores de virulencia por el sistema ESX-1. Recientemente, Zhang y col. (2017) aportaron la primera data bioquímica y estructural de este componente individual del complejo de membrana de los sistemas de secreción tipo VII.

A través de experimentos de fraccionamiento celular y usando anticuerpos específicos, los autores han sugerido que la proteína EccB₁, codificada por el gen *rv3869*, es una ATPasa hexamérica localizada predominantemente en el espacio periplásmico (figura 4). Debido a que generalmente las proteínas de secreción localizadas en el espacio periplásmico se involucran en la formación de canales de transporte a través de la membrana externa o en el empaquetamiento de sustratos, se hipotetiza que EccB₁ y sus homólogos podrían estar involucrados en la formación de un canal entre la membrana plasmática y la micromembrana. Los autores sugieren también que este canal está impulsado por la hidrólisis de ATP y que la actividad ATPasa podría jugar un rol fundamental en proveer la energía requerida para la secreción de múltiples factores de virulencia

en los sistemas de secreción tipo VII. Además, se cree que esta proteína no actúa sola sino que necesita de la interacción directa o indirecta con otras proteínas, probablemente pertenecientes al mismo sistema de secreción, para que ocurra el transporte de sustratos. Proponiendo entonces que los productos de secreción son translocados desde el periplasma fuera de la micromembrana a través de la proteína EccB.

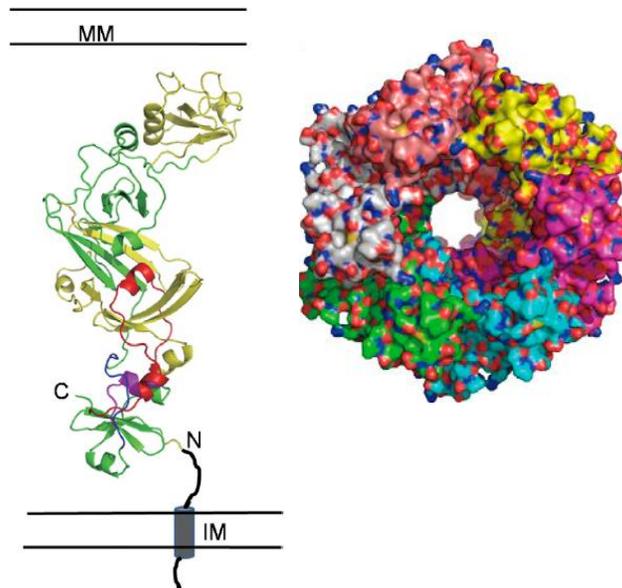


Figura 4. Modelos estructurales de la proteína EccB₁. A la izquierda se representa la estructura cristalizada de la proteína cuya localización predomina en el espacio periplásmico. A la derecha se representa la superficie molecular de la proteína presentando una estructura hexamérica (Tomado de Zhang y col., 2017).

5. Interacción de proteínas: sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano (BACTH)

La mayoría de los procesos biológicos involucra interacciones específicas proteína-proteína ya que por lo general, dentro de las células las proteínas ejercen su función a través de redes o complejos multiprotéicos. Estas desempeñan un papel vital en los procesos celulares por lo que su estudio puede dar una visión biológica fundamental más amplia (Berggard y col., 2007).

Para identificar estas interacciones se han desarrollado numerosos ensayos entre los que se encuentran métodos físicos como la cromatografía de afinidad, métodos bioquímicos como la co-inmunoprecipitación y métodos genéticos como los sistemas de dos híbridos (Berggard y col.,

2007). El sistema de dos híbridos fue desarrollado originalmente en levaduras por Stanley Fields y Rolf Sternglanz en el año 1994. Posteriormente, en el año 1997 fue desarrollado por Fabio Rossi y colaboradores un sistema de dos híbridos en mamíferos, el cual usa la complementación de la β -galactosidasa para monitorear interacciones proteína-proteína en células eucariotas intactas. Fue hasta el año 1998 que se reportó un sistema parecido en bacterias, denominado sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano (BACTH), desarrollado por primera vez por Karimova y colaboradores.

Es llamado “sistema de dos híbridos” porque utiliza dos polipéptidos de interés, que pueden ser proteínas conocidas, proteínas codificadas por una genoteca o una proteína conocida que actúe como cebo frente a una genoteca que actúe como presa. Estas proteínas son fusionadas genéticamente a dos plásmidos propios del sistema y co-transformados dentro de cepas hospederas, las cuales contienen genes reporteros inducibles. Así, la interacción entre las dos proteínas resulta en la activación de la transcripción de los genes reporteros generando una señal fenotípica (James y col., 1996; Karimova y col., 1998). El fundamento del sistema BACTH se esquematiza en la figura 5.

En general, el sistema está basado en la reconstitución, mediado por la interacción, de una cascada regulatoria dependiente de AMPc, que es sintetizado por enzimas llamadas adenilato ciclasas. La estructura del dominio catalítico de esta enzima consiste en dos fragmentos complementarios: uno de 25kDa en el que se encuentra propiamente el sitio catalítico y otro de 18kDa que contiene el principal sitio de unión a la calmodulina. La construcción de los fragmentos complementarios de la enzima se realizó a partir del dominio catalítico de *Bordetella pertussis* (Karimova y col., 1998; Karimova y col., 2000).

En ausencia de calmodulina, la unión de los dos fragmentos no exhibe actividad detectable, sugiriendo que no son capaces de reasociarse para producir actividad basal independiente de esta proteína. Sin embargo, cuando se expresan en una cepa de *E. coli* deficiente en actividad de la adenilato ciclasa, los fragmentos T25 y T18 fusionados a proteínas putativas que interactúan podrían reasociarse y conducir a la síntesis de AMPc (Karimova y col., 1998).

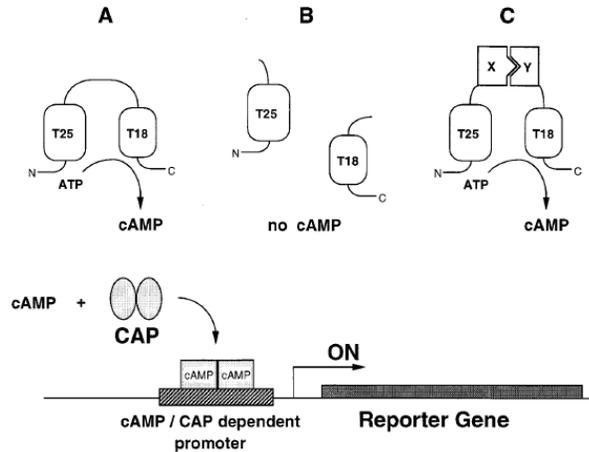


Figura 5. Principio del sistema BACTH. En A se representa la complementación de los dos fragmentos del dominio catalítico T25 y T18 que resulta en la síntesis de AMPc. En B, los dos fragmentos cuando son co-expresados como polipéptidos independientes son incapaces de interactuar y no ocurre la síntesis de AMPc. En C, los dos fragmentos fusionados a dos proteínas que interactúan, X y Y, lleva a la heterodimerización de estas, sintetizando AMPc. En la parte inferior se representa cómo una vez que se ha sintetizado AMPc por complementación entre dos proteínas que interactúan, éste es capaz de unirse a la proteína CAP, formando el complejo AMPc/CAP que es capaz de reconocer el promotor específico y activar la transcripción de los genes reporteros (Tomado de Karimova y col., 1998).

Según Karimova y col. (1998), análisis funcionales de la actividad de la adenilato ciclasa pueden ser monitoreados en una cepa de *E. coli* deficiente en esta enzima. El AMPc sintetizado se une a la proteína CAP que es un activador transcripcional, regulando la expresión de varios genes que incluyen los involucrados en el catabolismo de lactosa y maltosa. Así, cuando el dominio catalítico de la enzima es expresado bajo el control del promotor *lac*, la actividad es suficiente para complementar las cepas deficientes en adenilato ciclasa, permitiendo la restauración de su habilidad para fermentar lactosa o maltosa. Esta actividad puede ser detectada con placas indicadoras y/o placas selectivas y podría también ser cuantificada por medidas en cultivos líquidos ya sea de niveles de AMPc o por actividad de la β -galactosidasa (Karimova y col., 1998).

Llevar a cabo este ensayo en *E. coli* facilita el rastreo de interacciones y la caracterización de las proteínas que interactúan. Además, la alta eficiencia de transformación de *E. coli* permite el análisis de genotecas de alta complejidad (Karimova y col., 1998). Existe, sin embargo, la

posibilidad de aparición de falsos negativos y falsos positivos. En el primer caso podría deberse a proteínas híbridas que interactúan pero que no logran una complementación funcional. En el segundo caso, podría corresponder a clones que exhiban un fenotipo *cya*⁺ a pesar de que no ocurra interacción de proteínas híbridas. Esto puede deberse a reversión espontánea de la cepa reportera o mutaciones espontáneas en el gen *cap* que conlleve a fenotipos Lac⁺ o Mal⁺ independientes de AMPc o mutaciones en el promotor *lac* (Karimova y col., 2000).

En resumen, los trabajos de Karimova y col. (1998) demostraron que este sistema puede revelar interacciones entre pequeños péptidos, proteínas bacterianas y proteínas eucarióticas. También demostraron usando genotecas, que el sistema puede ser usado para identificar unas pocas proteínas interactuantes de entre un exceso de ellas que no interactúan (Karimova y col., 2000).

ANTECEDENTES

Esta investigación deriva de trabajos realizados previamente en el Laboratorio de Genética Molecular del Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC).

Los primeros estudios fueron llevados a cabo por el Dr. Gustavo López a través de su tesis doctoral en el año 2006. Él trabajó con una genoteca de *Mycobacterium tuberculosis* la cual fue clonada en el cósmido pYUB18 y transformada en una cepa de *Mycobacterium smegmatis*, que llevaba integrada el gen *gfp* (proteína verde fluorescente), bajo el control del promotor del gen *dnaA* de *M. tuberculosis*. Un total de 300 transformantes obtenidos fue inoculado en un cultivo *in vitro* de macrófagos y a través de un equipo de clasificación de células activadas por fluorescencia (FACS), se aislaron los macrófagos más fluorescentes. Esto se realizó con el fin de lograr el aislamiento de transformantes de *Mycobacterium smegmatis* con sobrevivencia en macrófagos incrementada y que por ende hicieron a los macrófagos más fluorescentes. Después de tres rondas sucesivas, el cósmido encontrado en mayor proporción entre las bacterias recuperadas fue llamado pCEF y contenía aproximadamente 21kb del ADN de *Mycobacterium tuberculosis*. Luego pudo constatarse que *Mycobacterium smegmatis* portadora de pCEF sobrevivía 3.5 veces más en los macrófagos en comparación a *Mycobacterium smegmatis* transformada con el vector vacío.

Un posterior análisis genético reveló que entre los genes presentes en el cósmido pCEF se encuentran 3 genes PE/PPE seguidos por los primeros genes miembros del complejo ESX-3 *rv0282*, *rv0283* y parte del *rv0284*. Fue en el año 2012 que el estudiante doctoral Luis Querales, a través de estudios con subclonajes de los genes presentes dentro del cósmido pCEF, evidenció que sólo los genes que codifican para PE_PGRS4 y EccB₃ (*rv0283*) podrían conferir el aumento en la sobrevivencia en los macrófagos.

A partir de los resultados anteriores, el Lic. José Reverol en el año 2017 a través de su tesis de licenciatura, clonó el gen *eccB₃* (*rv0283*) en el plásmido pKT25 y seguidamente, usando el sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano (BACTH), pretendió elucidar la existencia de una posible interacción entre las proteínas codificadas por los genes *rv0283* (perteneciente al

ESX-3) y *rv0279c* (proteína PE_PGRS4, previamente clonado en el vector pUT18). Para ello usó métodos cualitativos basados en cambios de coloraciones en las colonias, una vez que estas son sembradas en el medio diferencial selectivo MacConkey. Como resultado de su trabajo, observó una coloración pálida en las colonias transformantes y al compararlo con los controles pudo a simple vista evidenciarse que no hay una interacción aparente entre ambas proteínas o que la interacción es tan débil y dura tan poco tiempo que no puede ser detectada con este ensayo o quizás debe comprobarse también con ensayos cuantitativos.

Por ello, este trabajo de investigación pretende evidenciar si existen otras proteínas codificadas por el genoma de *Mycobacterium tuberculosis* que sean capaces de interactuar con la proteína EccB₃, componente del sistema secreción ESX-3, para de esta manera obtener más información acerca de cómo funciona este mecanismo esencial de secreción de proteínas.

OBJETIVOS

OBJETIVOS GENERALES: Estudiar la existencia de posibles interacciones proteína-proteína entre la proteína EccB₃ (Rv0283) perteneciente al sistema de secreción ESX-3, y las proteínas codificadas por una genoteca de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv mediante el uso del sistema BACTH.

OBJETIVOS ESPECIFICOS:

1. Detectar cualitativamente clones positivos para interacciones proteína-proteína entre EccB₃ y otras proteínas de MTB a partir de ensayos en placas con medios diferenciales selectivos.
2. Confirmar interacciones entre EccB₃ y otras proteínas de MTB a través de la cuantificación de la actividad de la β -galactosidasa.
3. Identificar mediante secuenciación los genes de *Mycobacterium tuberculosis* que codifican las proteínas que interactúan con EccB₃.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo este trabajo de investigación se contó con el plásmido del sistema BACTH pKT25 que portaba el gen de interés *eccB₃* (*rv0283*) que codifica para la proteína EccB₃ perteneciente al sistema de secreción ESX-3, el cual fue clonado previamente en el laboratorio de Genética Molecular del IVIC por el Dr. Gustavo López. Adicionalmente, la genoteca de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue clonada en el plásmido pUT18c (Anexo), también vector del sistema BACTH, por Klepp y col. en el año 2009 y fue donada al laboratorio de Genética Molecular del IVIC por la Dra. Fabiana Bigi, colaboradora de ese proyecto.

Reactivos

- **IPTG** (0.5mM), conservado a -20°C.
- **Maltosa** (1%), conservado a temperatura ambiente.
- **β-mercaptoetanol** (1M), conservado a temperatura ambiente.
- **ONPG** (4mg/ml), preparado en medio PM2 y conservado a -20°C.
- **Na₂CO₃** (1M), conservado a temperatura ambiente.
- **Kanamicina** (50µg/ml), **carbenicilina** (100µg/ml), **streptomicina** (100µg/ml) y **tetraciclina** (12.5µg/ml), conservados a -20°C.

Buffers y medios de cultivo:

I. Buffer PBS: para su preparación se añadió 8.18g NaCl, 0.745g KCl₂, 1.42g Na₂HPO₄ y 0.27g KH₂PO₄ para un volumen final de 1L. Se autoclavó y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

II. Buffer PM2: se preparó usando 70mM Na₂HPO₄ · 12H₂O, 30mM NaH₂PO₄ H₂O, 1mM MgSO₄ y 0.2mM MnSO₄ (pH 7.0). Se agregó 100mM β-mercaptoetanol justo antes de usarlo.

III. Medio LB líquido y LB agar: se añadió 5g de NaCl, 10g de triptona y 5g de extracto de levadura, agregando agua destilada hasta completar un volumen final de 1L. Antes de su uso se autoclavó. Para preparar placas LB se añadió a los componentes antes mencionados 15g

(concentración final 1,5%) de agar por litro y se autoclavó. Los antibióticos y otros suplementos se añadieron cuando el medio no estuvo demasiado caliente.

IV. Medio MacConkey/Maltosa 1%: se disolvió 49.53g de agar MacConkey por cada litro de agua destilada y posteriormente se autoclavó. Una vez enfriado y antes de servir en placas se suplementó con maltosa 1%, IPTG 0,5mM y los antibióticos apropiados.

V. Medio M63: se añadió 2g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 13.6g KH_2PO_4 , 0.5mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ y 15g de agar por litro de solución. Se autoclavó y se mantuvo a temperatura ambiente hasta su uso.

Cepas bacterianas: se utilizaron dos cepas de este microorganismo. Para el almacenamiento del ADN de los vectores de interés se usó la cepa receptora estándar *E. coli* K12 XL1-Blue, la cual es deficiente en endonucleasas (*endA*) lo que mejora en gran parte la calidad del ADN miniprep y además es deficiente en recombinación (*recA*) lo que mejora la estabilidad de la inserción (Stratagene, 2004). Por otra parte, para la detección de interacciones proteína-proteína usando el sistema BACTH se utilizó como receptora la cepa de *E. coli* BTH101 con deficiencia en la actividad de la adenilato ciclasa (*cya*).

Plásmidos: para que ocurra la co-expresión de las proteínas híbridas, los genes que codifican para las proteínas de interés fueron fusionados a dos vectores plasmídicos compatibles (figura 6) que poseen las siguientes características:

El plásmido pKT25 codifica el fragmento T25 del dominio catalítico de la enzima adenilato ciclasa que corresponde a sus primeros 224 aminoácidos. Deriva del plásmido pSU40 y lleva el gen de selección que confiere resistencia a kanamicina. Además, el sitio múltiple de clonamiento se encuentra en el extremo 3' del gen que codifica la región T25 lo que permite la construcción de las fusiones en el extremo C-terminal del polipéptido T25.

El plásmido pUT18c codifica el fragmento T18 del dominio catalítico de la enzima adenilato ciclasa que corresponde a los aminoácidos desde el 225 al 399. Deriva del plásmido pUC19 y lleva el gen de selección que confiere resistencia a la ampicilina. El sitio múltiple de clonamiento se

encuentra en el extremo 3' del gen que codifica la región T18 lo que permite la construcción de las fusiones en el extremo C-terminal del polipéptido T18.

Los plásmidos del sistema BACTH empleados como control positivo son el pKT25-zip y el pUT18c-zip, los cuales presentan la fusión genética de un zipper de leucina con el fragmento T25 y T18, respectivamente.

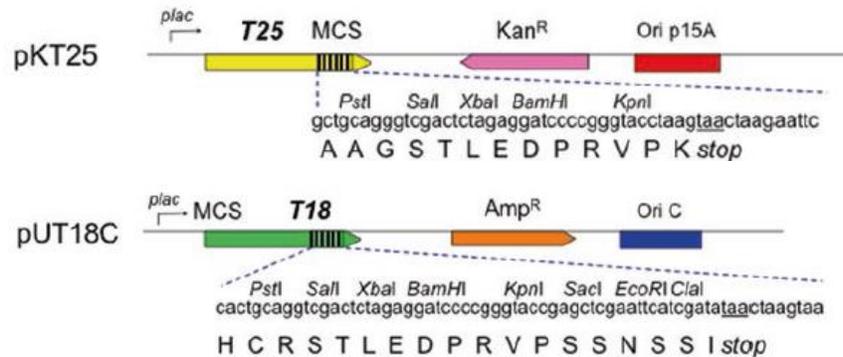


Figura 6. Representación esquemática de los plásmidos BACTH. Las barras amarilla y verde corresponden a los marcos abiertos de lectura de los fragmentos T25 y T18, respectivamente, bajo el control del promotor *lac* (flecha pequeña). Las flechas rosada y naranja indican el antibiótico de selección y la dirección de la transcripción. Las barras roja y azul indican el origen de replicación del plásmido. Las cajas sombreadas representan las secuencias múltiples de clonamiento (MCS) que permiten la inserción de genes foráneos: algunos sitios de restricción únicos se muestran encima de la secuencia nucleotídica y la secuencia de polipéptidos es mostrada debajo (Tomado de Karimova y col., 2017).

Preparación de células competentes: para lograr que las células de *E. coli* receptoras sean capaces de captar ADN foráneo se siguió el protocolo de Hanahan (1983) en el cual se usan tratamientos con dos soluciones: TFBI (CaCl₂ 10mM, KCl 100mM, Acetato de potasio 30mM, MnCl₂ 50mM y glicerol 15%) y TFBII (MOPS 10mM, KCl 10mM, CaCl₂ 75mM y glicerol 15%). Se dejó crecer la cepa bacteriana en 5ml de medio Luria Bertani (LB) con los antibióticos correspondientes. A la mañana siguiente, se hizo una dilución 1:20 y se dejó crecer hasta obtener una D.O.₆₀₀ ≈ 0.48 (fase exponencial de crecimiento). Posteriormente se colocaron las células en hielo por 5 minutos y luego se centrifugaron a 2325g a 4°C por 15 minutos. Se descartó el sobrenadante, se agregaron 40ml de la solución TFBI y se agitó con vortex hasta disolver el pellet. Se repitió este proceso

incubando en hielo y centrifugando por 5 minutos más. Se descartó el sobrenadante, se agregó 4ml de la solución TFBII y se agitó con vortex nuevamente. Se incubó en hielo por 15 minutos y se alicuotó con un volumen de 100µl en tubos eppendorf previamente enfriados, conservando a una temperatura de -80°C hasta su uso.

Transformación bacteriana: se siguió el protocolo de Green y Sambrook (2012), añadiendo 10ng/ul del ADN plasmídico por cada 100µl de células competentes. Las muestras se incubaron en hielo por 30 minutos y posteriormente se realizó un choque térmico colocándolas en baño de maría a 42°C por 3 minutos y luego en hielo por 2 minutos más. Se añadió 1ml de medio LB y se dejó incubando a 37°C en un bloque de temperatura por 1 hora. Luego, se centrifugó a 16.2 g por 5 minutos, se descartó el sobrenadante hasta tener un volumen final aproximado de 200µl y se resuspendió el pellet bacteriano. Posteriormente, se sembraron 100 µl en placas con medio LB agar más el antibiótico y las placas se dejaron incubando a 37°C por aproximadamente 24h.

Verificación de los plásmidos: se tomó una colonia transformante portadora de cada plásmido y se procedió con las siguientes técnicas:

I. **Extracción de ADN:** con el fin de lisar las células y extraer el ADN plasmídico se siguió el protocolo proporcionado por QIAGEN del kit de extracción “QIA prep. Spin Miniprep”, el cual está basado en lisis alcalina.

II. **Digestión con enzimas de restricción:** en la tabla 1 se muestran las enzimas de restricción utilizadas para identificar cada plásmido del sistema BACTH. Una vez agregados todos los componentes para la reacción se dejaron incubando a 37°C por 2 horas y luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1%.

Tabla 1. Enzimas de restricción usadas para verificación de los plásmidos del sistema BACTH.

Plásmido	Enzimas	Tamaño de los fragmentos* (pb)
pKT25	EcoRI + SacII	2147
		907
		390
	VspI	2407
		1037

pKNT25	Vsp I	2538 872
pKT25-zip	EcoRI + SacII	2147 907 504
pUT18	EcoRI + SspI	2105 920
pUT18c	EcoRI + SspI	2628 392
	Pvu II + Ssp I	1876 1144
pUT18c-zip	Pvu II + Ssp I	1876
		764
		482

*El tamaño aproximado de los fragmentos se obtuvo previamente usando el programa pDRAW32.

III. Electroforesis en gel de agarosa: se preparó un gel de agarosa al 1% y se añadió bromuro de etidio (concentración final 0,01%). Se corrió el gel a 100V por aproximadamente 30 minutos y fue revelado en el transiluminador “BioRad Molecular imager Gel Doc XR+” usando el programa Image Lab. 5.2.1.

Evaluación de interacciones proteína-proteína a través del sistema BACTH: para evaluar las interacciones proteína-proteína se realizó una transformación en dos pasos dentro de la cepa *E. coli* BTH101, introduciendo primero el plásmido pKT25-EccB₃ y luego el pUT18c-genoteca MTB, siguiendo el protocolo de transformación bacteriana mencionado anteriormente.

I. Selección de colonias de interés: se sembraron las células transformantes en medio MacConkey/Maltosa con IPTG, kanamicina y carbenicilina. Las placas fueron incubadas a 30°C y 37°C y la interacción pudo ser detectada entre 1-4 días (EUROMEDEX).

Las interacciones positivas fueron reflejadas por la presencia de colonias con una coloración rojo intenso, mientras que cuando el resultado fue negativo se observaron colonias pálidas.

Los controles positivos para el ensayo fueron las construcciones pKT25-*zip* y pUT18C-*zip*. Adicionalmente se usaron las construcciones pKT25-EsxA y pUT18C-EsxB como controles positivos pues se ha demostrado que forman heterodímeros. Como controles negativos se utilizaron dos vectores que no interactúan tal como la construcción plasmídica pKT25-EccB₃ y el plásmido pUT18c vacío.

II. Confirmación de las interacciones: para confirmar las interacciones obtenidas y excluir falsos positivos, se siguió el protocolo de Battesti y Bouveret (2012). Los tres pasos tienen como finalidad observar nuevamente el crecimiento de colonias rojas que indiquen interacción.

Como primer paso, una vez obtenidas las colonias positivas se procedió a cultivarlas nuevamente en medio MacConkey/Maltosa. Una vez verificado que las colonias crecen rojas nuevamente, se aisló el ADN plasmídico total utilizando el kit de extracción “QIA prep. Spin Miniprep” (QIAGEN), se transformó en la cepa de *E. coli* BTH101 y se sembraron en medio MacConkey/Maltosa. Al confirmar el crecimiento de colonias rojas por segunda vez, se procedió al tercer y último paso en el que se transformó el ADN plasmídico total en la cepa *E. coli* XL1-blue y las transformantes fueron seleccionadas sólo con cabcenicilina con el fin de obtener únicamente el ADN plasmídico de pUT18c – genoteca MTB. Luego, este ADN se transformó tanto en la cepa *E. coli* BTH101 que contenía la construcción pKT25-EccB₃ como dentro de la cepa con el plásmido pKT25 vacío.

Adicionalmente, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% con las muestras de ADN extraídas, las cuales fueron previamente digeridas con la enzima *HindIII* con la finalidad de calcular la concentración de ADN de las muestras.

Ensayo de la actividad de la β -galactosidasa: posterior al ensayo cualitativo se procedió a evaluar cuantitativamente la eficiencia de complementación entre las proteínas híbridas a través de la medición de la actividad de la β -galactosidasa. Para llevar a cabo este ensayo se siguió el protocolo descrito por el fabricante (Euromedex) derivado de Miller (1972). Esta actividad puede ser medida espectrofotométricamente usando sustratos cromogénicos que son incoloros pero que al ser hidrolizados producen compuestos coloreados. En esta investigación, las medidas se realizaron en células permeabilizadas usando ONPG como sustrato, que en presencia de β -galactosidasa es convertido en galactosa y o-nitrofenol. El o-nitrofenol es amarillo en solución acuosa y se puede seguir el curso de la reacción monitoreando la D.O. a una longitud de onda de 420nm (Miller, 1972; Green y Sambrook, 2012).

Esta actividad es usualmente expresada en unidades por mg de peso seco bacteriano (una unidad corresponde a 1nmol de ONPG hidrolizado por minuto a 28°C). Siguiendo el protocolo, las colonias de *E. coli* que presentaron interacción proteína-proteína en el ensayo cualitativo se dejaron crecer en 5 ml de medio LB con IPTG más los antibióticos a 37°C y en agitación continua durante toda la noche. Luego, el cultivo fue diluido 1:5 con medio M63 para un volumen final de 2.5ml y se midió la D.O.₆₀₀ del cultivo bacteriano. Posteriormente, las células fueron permeabilizadas añadiendo 1 gota de tolueno y 1 gota de SDS 0.1%, ya que el tolueno y el SDS rompen parcialmente la membrana celular, permitiendo que pequeñas moléculas como el ONPG puedan difundir dentro de las células (Miller, 1972). Se agitó con vortex por 10 segundos y se dejó en agitación continua a 37°C por 40min, colocando un algodón a los tubos para permitir que el tolueno se evapore.

Inmediatamente, 500µl del cultivo de células se añadieron a 500µl de buffer PM2 con β-mercaptoetanol y se incubaron a 28°C. La reacción enzimática comenzó al añadir 250µl de ONPG (0.4% ONPG en buffer PM2 sin β-mercaptoetanol) y al desarrollarse una coloración amarilla, tomando un tiempo de 7 minutos, la reacción se detuvo con 500µl de Na₂CO₃ 1M. Esta última solución al estar concentrada cambia el pH a 11 causando que la β-galactosidasa se inactive. Posteriormente, se midió la D.O.₄₂₀ de cada tubo y la actividad enzimática A (unidades/ml) se calculó de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$A = \frac{200 \times (DO_{420} \text{ muestra} - DO_{420} \text{ control})}{\text{minutos de incubación}} \times \text{factor de dilución}$$

Quedando la actividad expresada en unidades por ml, donde el factor 200 corresponde al inverso del coeficiente de absorción de ONPG. Los resultados se expresan luego en unidades por mg de peso seco bacteriano que se determina a partir de la D.O.₆₀₀ del cultivo, considerando que 1ml de cultivo a D.O.₆₀₀= 1 corresponde a 300µg de peso seco bacteriano.

Análisis estadístico: la diferencia entre las medias de las cuatros muestras analizadas con respecto a sus controles negativos fue analizada a través de la prueba t de Student, utilizando el programa PAST 3. Los resultados se consideraron significativos cuando $p < 0,05$.

Identificación de los genes que interactúan con EccB₃: finalmente, mediante secuenciación, se identificaron los segmentos de los genes de MTB contenidos en los plásmidos seleccionados de la genoteca con el uso del sistema BACTH. Para el diseño de los iniciadores, se escogió que fueran complementarios en las regiones a 100pb antes y después del sitio de corte de la enzima *Sma*I del plásmido pUT18c y su secuencia se señala en la tabla 2. Los iniciadores fueron diseñados en OligoExplorer y la secuenciación fue llevada a cabo por Macrogen en Seúl, Korea.

Tabla 2. Iniciadores utilizados para la identificación de los genes de *Mycobacterium tuberculosis*.

Plásmido	Iniciadores	Secuencia 5' – 3'
pUT18c-genoteca MTB	SecpUT18C-F	GCC GAC GTT CGA AGT TCT CG
	SecpUT18C-R	GAG CAG ACA AGC CCG TCA GG

Análisis con programas bioinformáticos: las secuencias nucleotídicas obtenidas de las cuatro muestras fueron sujetas a análisis bioinformáticos. La búsqueda de similitud de secuencias e identificación de los genes se desarrolló empleando BLAST, usando el banco de datos de EnsemblBacteria (http://bacteria.ensembl.org/Mycobacterium_tuberculosis_h37rv/Tools/Blast), así como el banco de datos del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>), eligiendo las secuencias identificadas como parte del genoma de *M. tuberculosis* que presentaron identidad cercana al 100%. Luego, se descargó la secuencia completa del gen identificado de la base de datos de Mycobrowser (<https://mycobrowser.epfl.ch/>) y se buscó la posible función de estos genes usando también la base de datos de Tuberculist (<http://svitsrv8.epfl.ch/tuberculist/>). Posteriormente, se realizó un alineamiento a través del programa MEGA 7.0 para comprobar los criterios que garanticen que la secuencia clonada puede expresarse, es decir, que el inserto esté en la orientación correcta de transcripción y que además esté en el mismo marco de lectura del dominio T18.

Por otra parte, se utilizaron los programa CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw/>) y Gpos-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gpos-multi/>) para predecir localización subcelular de proteínas, el servidor TMHMM (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) para predecir regiones transmembrana, el servidor SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para predecir la posibilidad de secreción no-clásica de proteínas, Cofactory (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Cofactory/>) para predecir la especificidad por los cofactores FAD, NAD o NADP y el programa Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/>) para realizar un modelado topológico de las proteínas.

RESULTADOS

Ensayo cualitativo para la detección de clones que presenten interacciones proteína-proteína entre la proteína EccB₃ y otras proteínas de *M. tuberculosis*.

En primer lugar, para asegurar que el ensayo y por ende este trabajo de investigación se llevara a cabo exitosamente, se verificó que los plásmidos originales pertenecientes al sistema BACTH fuesen los correctos y que no tuviesen ninguna construcción genética clonada. Para ello se utilizaron las enzimas de restricción presentadas en la tabla 1 y al visualizarlos en una electroforesis en gel de agarosa 1% pudo observarse el siguiente patrón de bandas que permitió la identificación de cada plásmido:

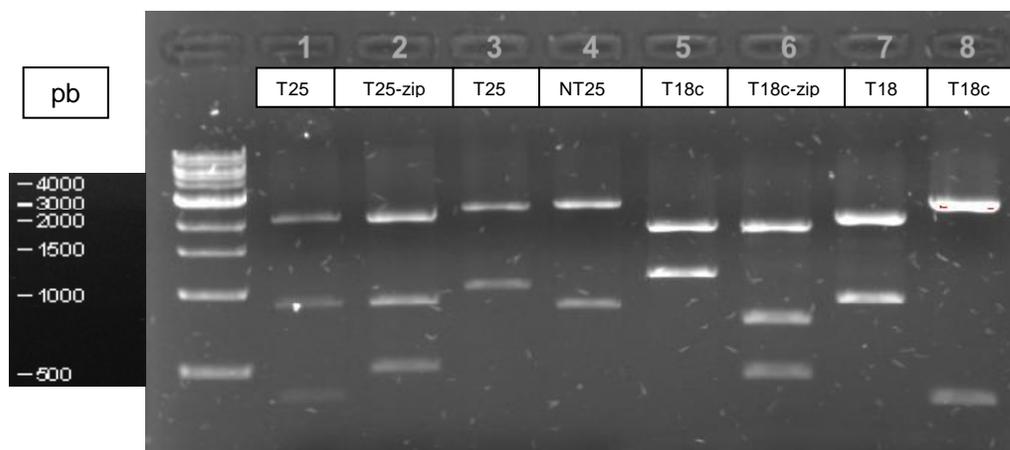


Figura 7. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de los plásmidos del sistema BACTH. Se observa el patrón de bandas esperado para las enzimas utilizadas en cada plásmido. El primer carril sin identificar corresponde al marcador de peso molecular 1kb (New England Biolabs). Los plásmidos del carril 1 y 2 fueron digeridos con las enzimas EcoRI y SacII. Los plásmidos del carril 3 y 4 fueron digeridos con la enzima VspI. Los plásmidos del carril 5 y 6 fueron digeridos con las enzimas PvuII y SspI. Los plásmidos del carril 7 y 8 fueron digeridos con las enzimas EcoRI y SspI.

Adicionalmente, se verificó que la construcción plasmídica pKT25-eccB₃ fuese la correcta a través de la digestión con las enzimas PstI y VspI y posterior visualización del patrón de bandas. Los resultados se muestran en la figura 8, donde la suma de los pesos de las bandas corresponde al peso total de la construcción que es de 5065 pb aproximadamente.

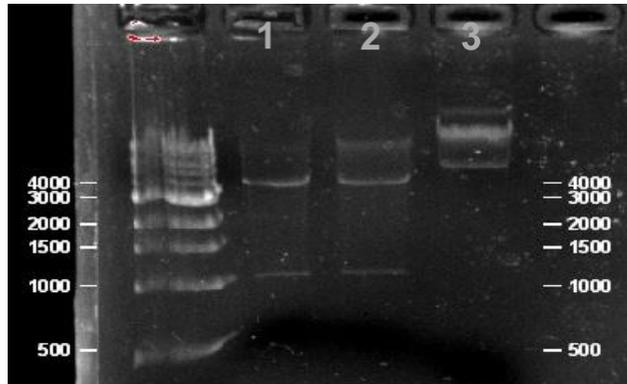


Figura 8. Electroforesis en gel de agarosa 1% para la verificación de la construcción plasmídica pKT25-*eccB*₃. El primer carril sin identificar corresponde al marcador de peso molecular 1kb (New England Biolabs). En el carril 1 se digirió con la enzima PstI. En el carril 2 se digirió con la enzima VspI. En el carril 3 se colocó la muestra sin digerir.

Una vez verificado que en efecto todos los plásmidos del sistema BACTH, así como la construcción que llevaba el gen de interés *eccB*₃, presentaron el patrón de bandas esperado, se procedió a realizar el ensayo cualitativo BACTH.

En total se realizaron tres ensayos usando el medio de cultivo diferencial/selectivo MacConkey suplementado con Maltosa, IPTG (inductor del operón lactosa) y los antibióticos kanamicina y carbenicilina.

Fueron utilizados dos controles positivos, el primero correspondió a las construcciones pKT25-*zip* vs. pUT18c-*zip*, los cuales son propios del sistema BACTH y el segundo corresponde a las construcciones pKT25-*EsxA* vs. pUT18c-*EsxB*, los cuales contienen a los genes *esxA* y *esxB* que se ha comprobado existe interacción entre ambos. Como control negativo, se utilizó la construcción plasmídica pKT25-*eccB*₃ vs. pUT18c vacío debido a que estos no deberían ser capaces de heterodimerizar por la falta de otro gen fusionado al vector pUT18c que codifique una proteína que interactúe con *EccB*₃. Y como condición experimental, se utilizaron las construcciones pKT25-*eccB*₃ vs. pUT18c–genoteca MTB, actuando la proteína *EccB*₃, perteneciente al sistema de secreción ESX-3 de *Mycobacterium tuberculosis*, como la proteína cebo, frente a una genoteca de esta misma bacteria actuando como presa.

A continuación se presentan los resultados obtenidos en placas para cada ensayo. Las placas correspondientes al primer ensayo, y del cual fue conseguida una colonia rojiza indicando interacción proteína-proteína (nombrada como muestra #1), no se muestran pues no se tomaron fotos de estas en un primer momento y las placas fueron desechadas. Se muestran entonces las placas a partir del segundo ensayo cualitativo (figura 9), del cual fueron conseguidas dos colonias independientes indicando interacción proteína-proteína (nombradas como muestras #2 y #3):

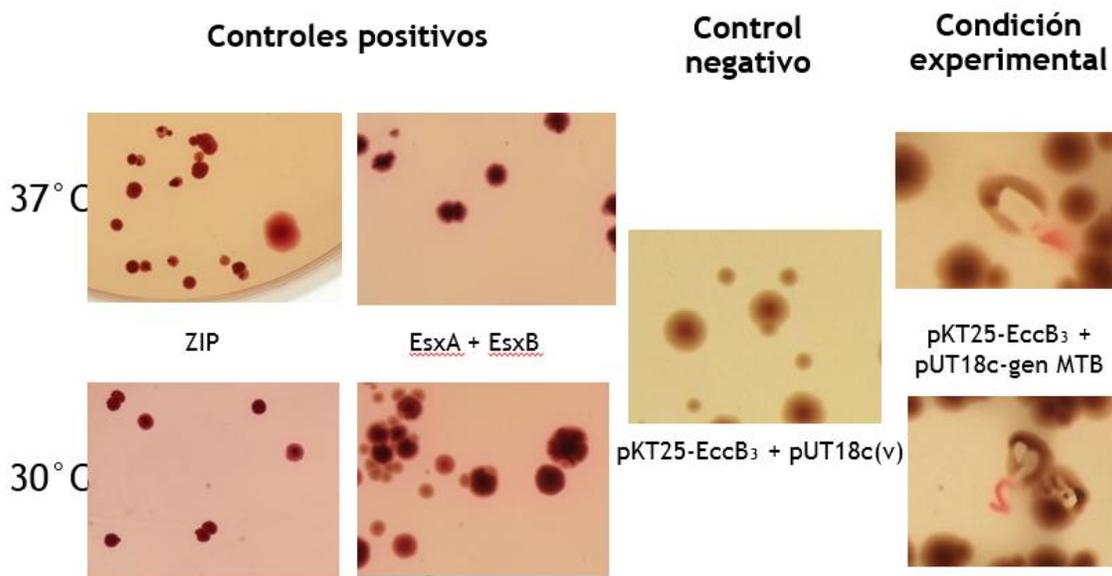


Figura 9. Colonias obtenidas durante el segundo ensayo BACTH. Se muestran los dos controles positivos utilizados: Zip y EsxA-EsxB , el control negativo y la condición experimental de la cual fueron tomadas sólo dos colonias rojizas.

Las colonias aparentemente positivas para interacción proteína-proteína obtenidas hasta el momento, nombradas como #1, #2 y #3, fueron conservadas en glicerol a -80°C hasta su uso posterior durante la confirmación de interacciones.

Luego, fue realizado un tercer ensayo cualitativo bajo las mismas condiciones que los anteriores. Durante el mismo se encontraron tres colonias aparentemente positivas y los resultados se observan en la figura 10.

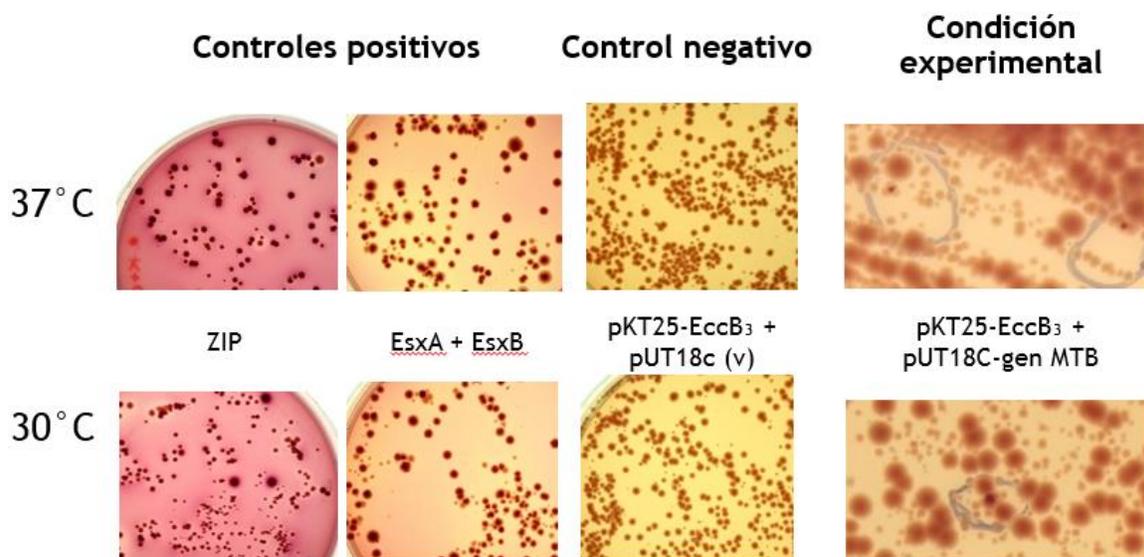


Figura 10. Colonias obtenidas durante el tercer ensayo BACTH. Se muestran los dos controles positivos utilizados: Zip y EsxA-EsxB, el control negativo y la condición experimental de la cual fueron tomadas tres colonias rojizas.

Una vez realizados estos ensayos cualitativos se procedió a seguir los tres pasos de verificación mencionados en la metodología. Para ello se utilizaron las colonias en las que se observó un aparente resultado positivo para interacción proteína-proteína. El primer paso de verificación consistió en repicar las colonias nuevamente en medio MacConkey/Maltosa para observar si el crecimiento de las colonias resultantes seguía teniendo una coloración rojiza. Las muestras #1, #2 y #3 mostraron nuevamente resultados positivos y de las muestras obtenidas en el tercer ensayo sólo una de ellas fue positiva, denominándose muestra #4, por lo que las dos restantes fueron descartadas. Estos resultados son mostrados en la figura 11.

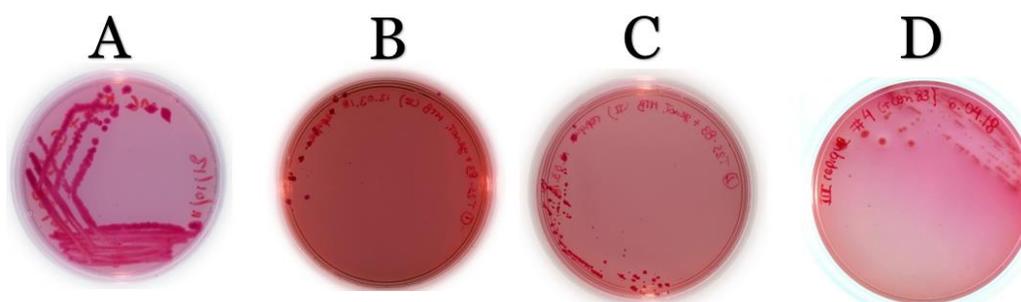


Figura 11. Primer paso de confirmación de interacciones proteína-proteína. Se muestran los repiques en medio MacConkey/Maltosa de A: la muestra #1 obtenida durante el primer ensayo cualitativo BACTH; de B y

C: las muestras #2 y #3, respectivamente, obtenidas durante el segundo ensayo cualitativo BACTH; de D: la muestra #4 obtenida durante el tercer ensayo cualitativo BACTH.

Superado el primer paso para confirmar las interacciones se procedió a realizar el siguiente paso de verificación. Este consistió en transformar nuevas células de *E. coli* de la cepa BTH101 con el ADN plasmídico total aislado a partir de las cuatro muestras, obteniendo igualmente los siguientes resultados positivos:

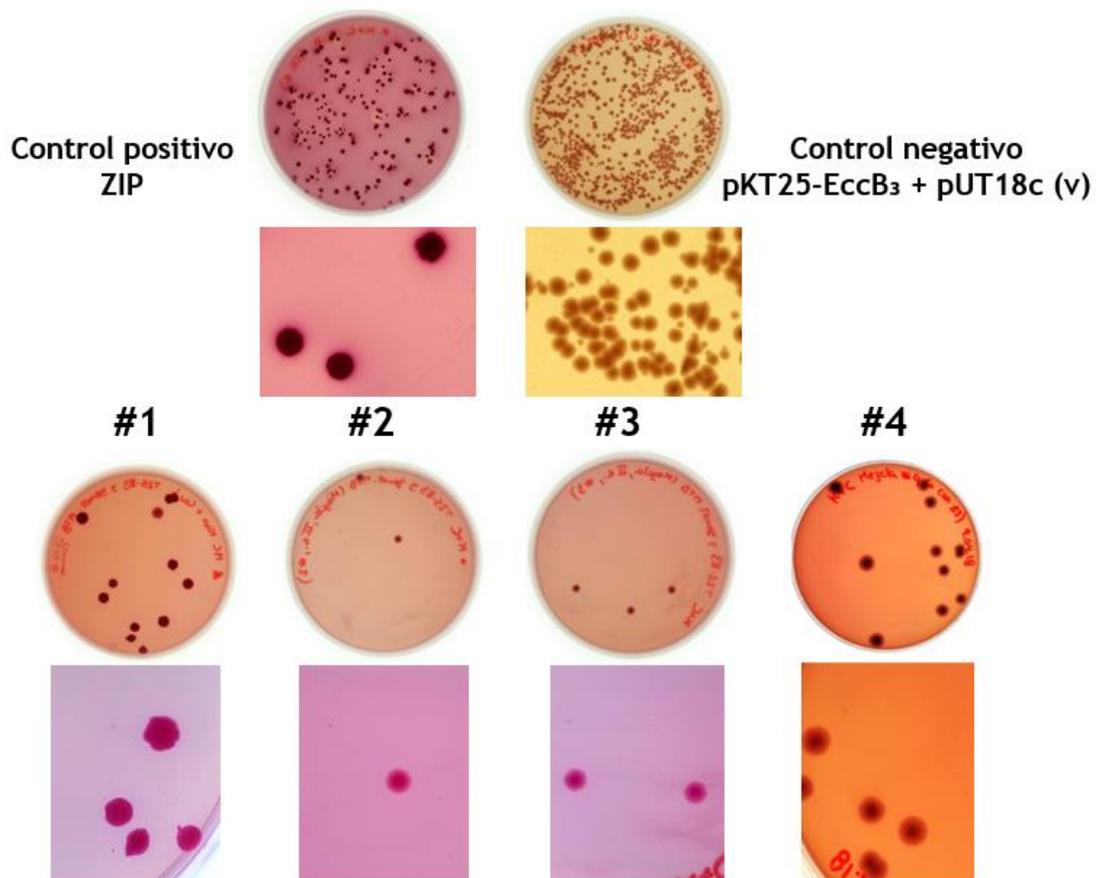


Figura 12. Segundo paso de confirmación de interacciones proteína-proteína. Se muestran, en medio MacConkey/Maltosa, el control positivo Zip, control negativo y las nuevas colonias transformantes con el ADN plasmídico total de las muestras #1, #2, #3 y #4, así como el acercamiento de las colonias.

Posteriormente, al observar que las muestras cumplieron con el primer y segundo paso para confirmar interacciones proteína-proteína entre la proteína EccB₃ y otras proteínas de

Mycobacterium tuberculosis, hasta el momento desconocidas, se procedió a realizar el último paso de verificación.

Este último paso consistió en transformar la cepa de *E. coli* XL1-Blue con el ADN plasmídico total de las cuatro muestras y seleccionar sólo con el antibiótico que confiere resistencia el plásmido pUT18c (ampicilina) en el cual se insertó la genoteca de *Mycobacterium tuberculosis*, de manera que las colonias que crecieran únicamente portaran el plásmido obtenido a partir de la genoteca. Se aisló este ADN plasmídico y se transformó en nuevas células de *E. coli* BTH101 que ya contenían la construcción pKT25-EccB₃ y también en células que contenían el plásmido pKT25 vacío, este último utilizado como control negativo para asegurar que la muestra no corresponde a un falso positivo. En la figura 13 se pueden observar los resultados obtenidos en cada caso.

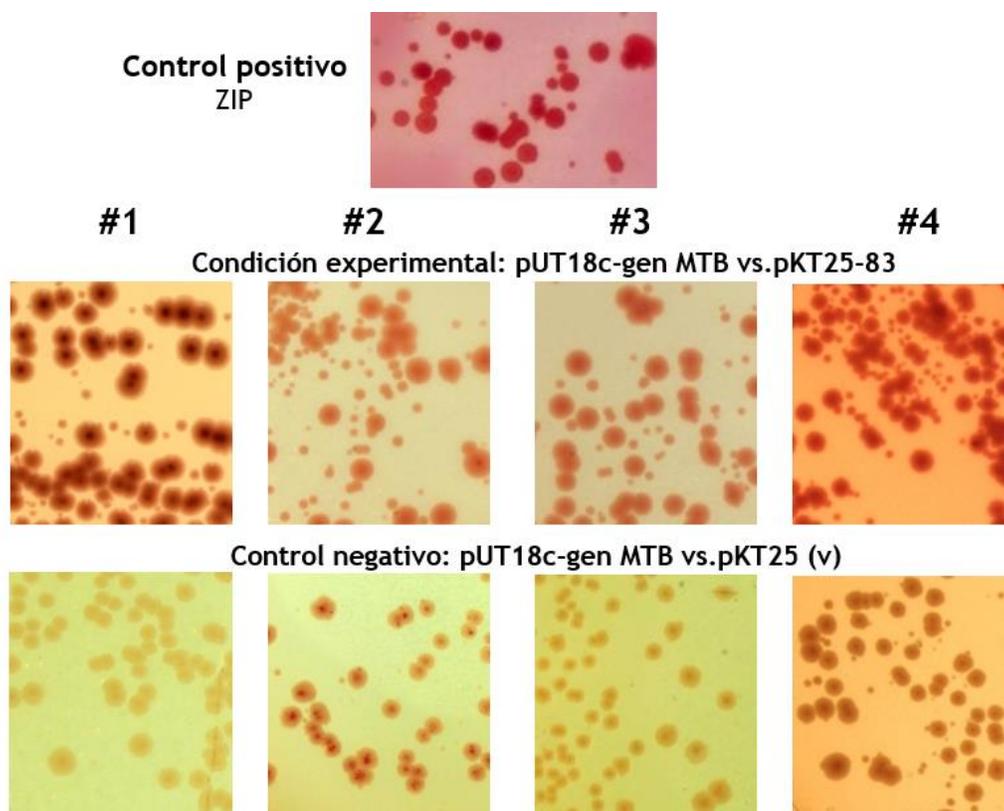


Figura 13. Tercer paso de confirmación de interacciones proteína-proteína. Se muestran, en medio MacConkey/Maltosa, el control positivo Zip, control negativo y las nuevas colonias transformantes con el ADN plasmídico aislado pUT18c-gen MTB.

Con este último paso se concluyó el ensayo cualitativo incluyendo el proceso de verificación y confirmación de interacciones utilizando el medio de cultivo diferencial/selectivo MacConkey/Maltosa. Fue posible observar que las cuatro muestras obtenidas parecen cumplir con los criterios cualitativos del ensayo BACTH para interacción proteína-proteína. Sin embargo, durante el tercer paso de verificación (figura 13) se pudo observar que la muestra #2 arrojó algunas colonias rojizas en el control negativo.

Medición de la actividad de la β -galactosidasa para cuantificar la complementación funcional entre las proteínas híbridas.

Antes de proceder con el ensayo cuantitativo se realizó un ensayo previo con los controles, siendo el positivo las construcciones pKT25-zip vs. pUT18c-zip nombradas como ZIP, y siendo el negativo las construcciones pKT25-EccB₃ vs. pUT18c (v).

La finalidad del mismo fue estandarizar el tiempo durante el cual se llevaría a cabo la reacción enzimática, que va desde el momento en que se agrega el sustrato cromogénico ONPG hasta que se detiene la reacción con Na₂CO₃. Para ello se utilizaron 8 tiempos de prueba: 0.5, 2, 4, 6, 8, 10, 15 y 20 minutos y se midió la absorbancia a 420nm. Como puede observarse en la figura 14, aproximadamente a partir del minuto 7 comienza a haber una estabilización en la absorbancia del control positivo.

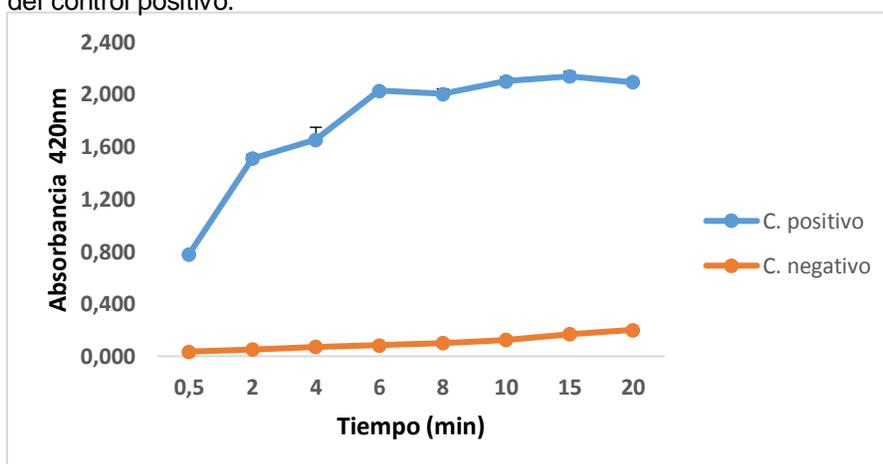


Figura 14. Representación de la absorbancia vs tiempo del control positivo ZIP y control negativo durante ensayo de la actividad de β -galactosidasa. Se aprecia la diferencia entre ambos controles, presentando el

positivo una mayor absorbancia debido a la alta producción de la enzima β -galactosidasa. Las barras de error representan la desviación estándar.

Posteriormente, se procedió a realizar el ensayo cuantitativo utilizando las muestras aparentemente positivas para interacción proteína-proteína con EccB₃ obtenidas durante el ensayo cualitativo. Para ello se utilizaron de cada muestra las transformantes obtenidas cuando se aisló el ADN de pUT18c – genoteca MTB y se incorporó en células nuevas de *E. coli* BTH101 que ya contenían el plásmido pKT25-EccB₃, así como las obtenidas cuando se transformó en células que solo contenían el plásmido pKT25 vacío (control negativo), las cuales se observan en la figura 13. Adicionalmente, se midió la actividad de la β -galactosidasa de los controles positivos ZIP y EsxA-EsxB (AB), así como la de los controles negativos pKT25-EccB₃ vs. pUT18c (v) y la cepa BTH101 vacía.

En la figura 15 se muestran los valores de actividad de la β -galactosidasa para cada caso. Se puede notar que el control positivo ZIP tiene un valor bastante alto con respecto al resto de las muestras, incluso con respecto al otro control positivo utilizado (EsxA-EsxB) el cual presentó valores de actividad semejantes a los controles negativos. También se observa que la muestra #1 mostró bajos niveles de actividad con respecto a las demás muestras analizadas.

Adicionalmente, para determinar si los valores obtenidos de cada muestra y su respectivo control negativo eran estadísticamente diferentes entre sí, se realizó la prueba t de Student utilizando el programa PAST3. La hipótesis nula planteada fue que las muestras comparadas presentan medias iguales y por ende no existe diferencia entre ellas. Si el valor $p > 0.05$ la hipótesis nula no se rechaza y si $p < 0.05$ la hipótesis nula se rechaza, es decir, si hay diferencia entre las muestras. Los resultados mostraron que únicamente las muestras #2, #3 y #4 son estadísticamente diferentes a sus controles negativos.

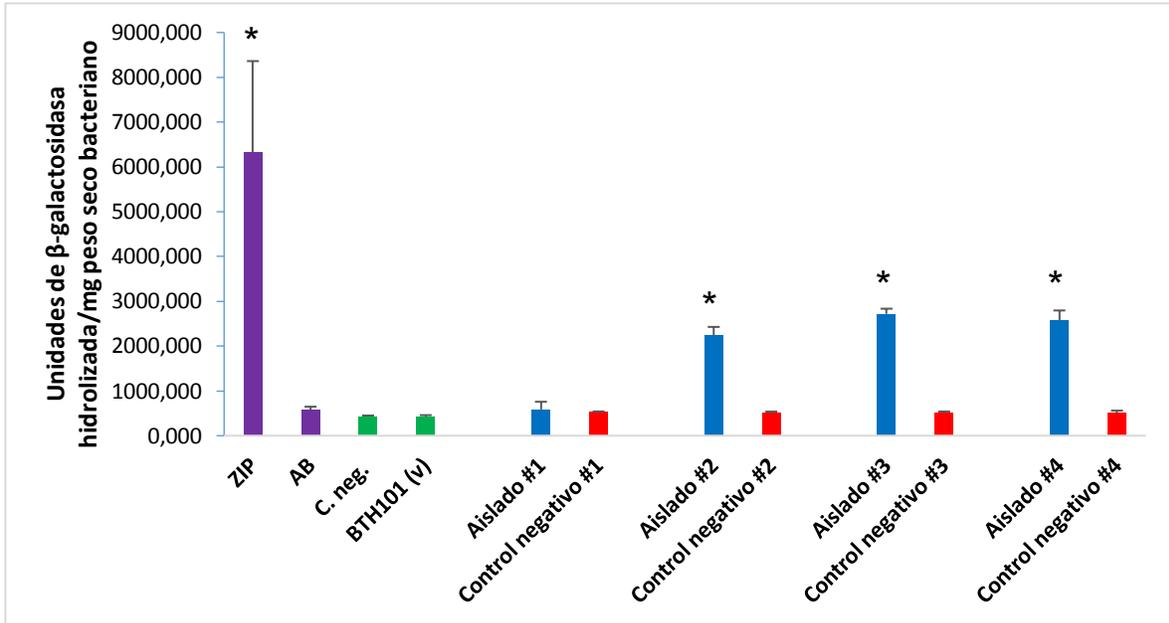


Figura 15. Actividad de la β -galactosidasa de las muestras obtenidas durante el ensayo cualitativo. Se representan los valores promedio así como sus respectivas barras de error, las cuales representan menos del 12% con respecto al promedio (exceptuando el caso del control positivo ZIP). Los * indican que son significativamente diferentes ($p < 0.05$) de los valores de los controles negativos, calculado a través de una prueba t de Student.

A continuación, se calculó qué tan alto fue el valor de actividad de las muestras con respecto a los controles negativos. Este valor debería ser entre 4 – 5 veces para decir que hay una interacción entre la proteína EccB₃ y las cuatro codificadas por los genes de *M. tuberculosis*. Los resultados arrojaron que el control positivo ZIP presenta un nivel de actividad 14 veces mayor que el control negativo y que las muestras #2, #3 y #4 tiene un valor entre 4-5, a diferencia del control positivo EsxA-EsxB y la muestra #1 que mostraron un comportamiento similar y cuyo valor fue menor a 2. Estos resultados pueden visualizarse en la figura 16.

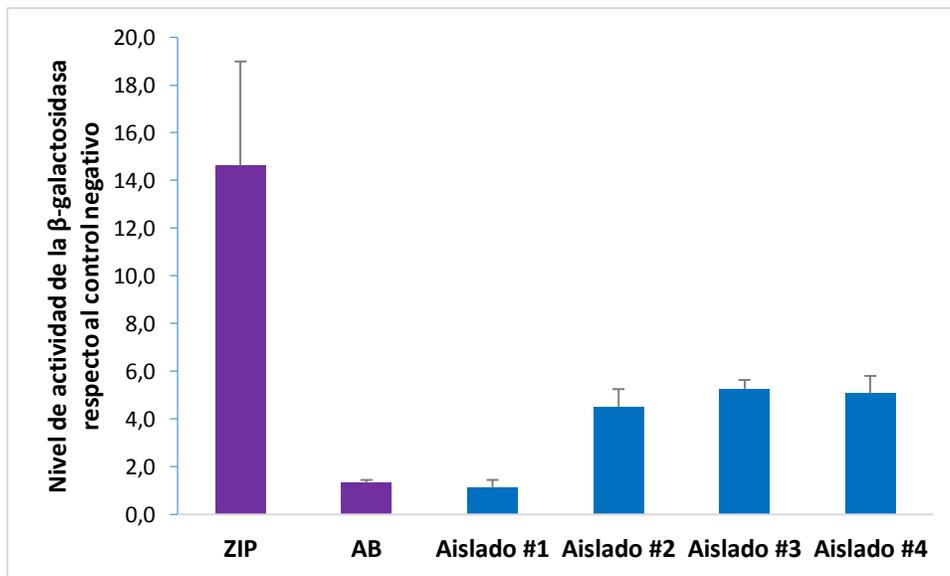


Figura 16. Nivel de actividad de la β -galactosidasa respecto a los controles negativos. Se representan los valores promedio y sus respectivas barras de desviación estándar. Se pueden observar valores altos del control positivo ZIP, lo que no es el caso para el control positivo AB cuyo nivel es similar a los controles negativos. Las muestras #2, #3 y #4 presentaron también valores altos con respecto a los controles negativos, sin embargo, la muestra #1 mostró un comportamiento similar al control positivo AB.

Identificación de los genes de *M. tuberculosis* que codifican proteínas capaces de interactuar con EccB₃

Una vez obtenido el ADN plasmídico aislado de las cuatro muestras se procedió a cortar con la enzima de restricción *HindIII* para calcular la concentración de los mismos y enviar las muestras a secuenciar. Al realizar la electroforesis en un gel de agarosa 1% se pudo obtener el patrón de bandas observado en la figura 17. Al calcular la concentración de ADN plasmídico usando el programa Image Lab. 5.2.1, se obtuvo los resultados expresados en la tabla 3. Sin embargo, para concentrar el ADN se procedió a aislar nuevamente y posteriormente se secó al vacío la solución de ADN de las muestras #2 y #4 usando el ADN Speed Vac hasta obtener una concentración final de 100ng/ μ l o mayor.

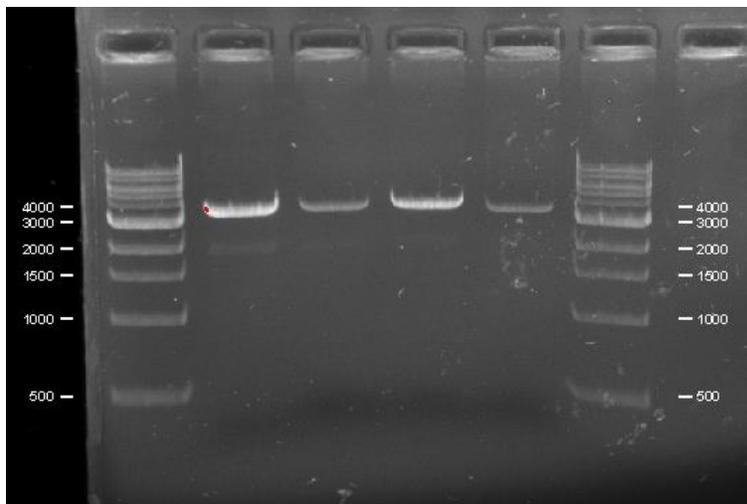


Figura 17. ADN linealizado de las cuatro muestras positivas para interacción proteína-proteína con EccB₃. Desde el carril 2 al 5 se visualizan las muestras de la #1 a la #4, respectivamente. Se utilizó el marcador de peso molecular NEB 1kb.

Tabla 3. Concentración de ADN de los cuatro plásmidos aislados (pUT18c-gen MTB).

	Concentración inicial (ng/ul)	Concentración final (ng/ul)
Muestra #1	84,7	213,7
Muestra #2	25,5	49,3
Muestra #3	62,7	126,6
Muestra #4	17,1	48,5

Una vez obtenidos los resultados de la secuenciación, se realizó con éstos una búsqueda empleando BLAST con el fin de encontrar a qué genes de *M. tuberculosis* corresponden las secuencias obtenidas. Para esto se emplearon los portales EnsemblBacteria y BLASTn (NCBI) y utilizando la base de datos de Mycobrowser se descargó la secuencia completa de los genes identificados e igualmente se indagó sobre la posible función de estos. Se identificó a la muestra #1 como parte del gen *rv1610*, a la muestra #2 como parte del gen *hemY*, a la muestra #3 como parte del gen que codifica para la proteína PE_PGRS30, y por último a la muestra #4 como parte del gen que codifica para la proteína PPE5.

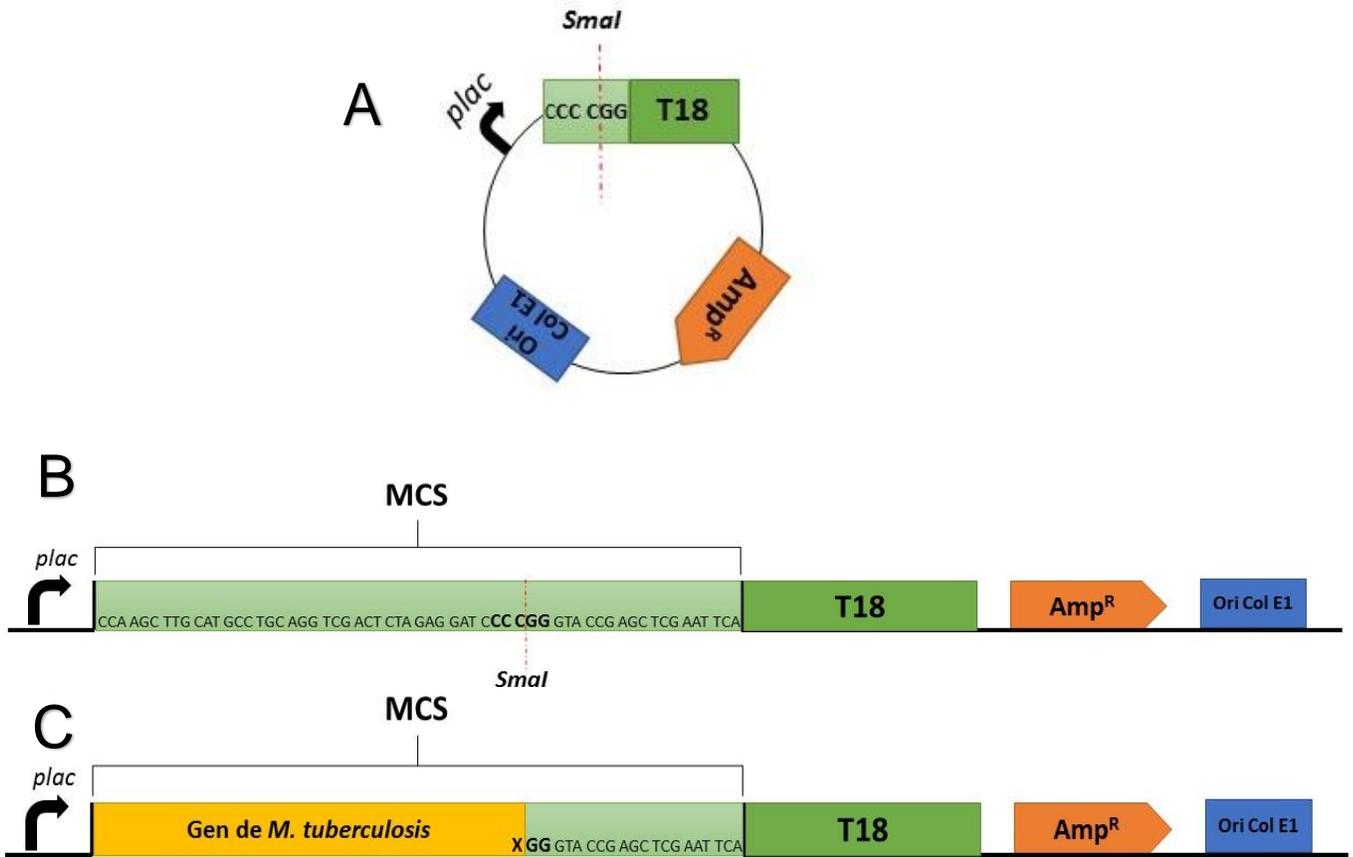


Figura 20. Esquematización del plásmido pUT18. En A: plásmido pUT18 en su forma circular, se señala el punto de corte de la enzima *Sma*I. En B: plásmido pUT18 linealizado, se indica la secuencia del MCS y en negrita y con una línea roja punteada la secuencia y punto de corte de la enzima *Sma*I. En C: construcción plasmídica de pUT18 con la inserción de un gen de *M. tuberculosis*, para que el gen esté en marco con T18 se señala en negrita el triplete XGG, siendo X cualquier base nucleotídica sobrante con respecto al marco de lectura del gen de MTB.

Las secuencias obtenidas fueron alineadas con el plásmido con la finalidad de eliminar la secuencia compartida entre ambos y obtener sólo el fragmento del gen. Luego, estos fragmentos fueron alineados con las secuencias completas de los genes en cada caso y a partir de la secuencia de proteínas traducida se observó si faltaban o no bases para completar un codón, utilizando la secuencia en tripletes de los genes completos.

Como pudimos observar tanto en el ensayo cualitativo como cuantitativo, las muestras #2 (hemY) y #4 (PPE5) arrojaron resultados positivos para interacción con la proteína EccB₃. Tomando en cuenta esto, existe la posibilidad de que a pesar de que estos genes no están en marco con T18 aun pudiesen expresarse debido a un deslizamiento transcripcional o un cambio de marco traduccional.

Para evidenciar la posible existencia de un desplazamiento transcripcional (*transcriptional slippage*), se alinearon las muestras #2 y #4 con el plásmido pUT18 utilizando el programa MEGA 7.0. Luego, utilizando únicamente la porción de la secuenciación obtenida que es idéntica al plásmido, se añadieron las deleciones que serían necesarias para que los genes de las muestras #2 y #4 se expresen como proteínas fusionadas al dominio T18 (1 deleción en el caso de la muestra #2 y 2 deleciones en el caso de la muestra #4). Posteriormente, se buscó el codón de STOP más próximo (fue TGA) y en la región resultante se buscó secuencias de dinucleótidos CA, TA y/o AT, pues cuando hay deleciones en la transcripción es más probable que el deslizamiento ocurra después de la transcripción de alguna de estas secuencias (Traverse y Ochman, 2017). Luego, considerando que en el complejo de elongación de la transcripción se encuentra un híbrido de ADN:ARN de 9 nucleótidos (Sidorenkov y col. 1998), se contaron los 7 nucleótidos hacia atrás después de una secuencia CA, TA y/o AT y se observó si ésta coincidía entre las dos secuencias (plásmido pUT18 y muestra) en la mayoría de estos nucleótidos. Para ambas muestras se encontraron secuencias donde podría ocurrir un desplazamiento transcripcional y estas se muestran en las figuras 29 y 30.

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name		
1. muestra DNA		A T C G C G A A C G C A T C G A C T T G T T G T G G A A A A T C G C T C G C G C C C	
2. pUT18 (mRNA)		G A T C G C G A A C G C A T C G A C T T G T T G T G G A A A A T C G C T C G C G C	

Figura 29. Posible secuencia de desplazamiento transcripcional en la muestra #2. En la caja se ubica la secuencia AT y hacia atrás los 7 nucleótidos restantes. La flecha señala la siguiente base a transcribir luego del desplazamiento.

DNA Sequences		Translated Protein Sequences	
Species/Abbrv	Group Name	*	*
1. Muestra4 DNA		G A T C G C G A A C G C A T C G A C T T G T T G T G G A A A A T C G C T C G C G C C	
2. pUT18		G G A T C G C G A A C G C A T C G A C T T G T T G T G G A A A A T C G C T C G C G C C	

Figura 30. Posible secuencia de desplazamiento transcripcional en la muestra #4. En la caja se ubica la secuencia AT y hacia atrás los 7 nucleótidos restantes. La flecha señala la siguiente base a transcribir luego del desplazamiento.

Luego, teniendo en cuenta el posible lugar de desplazamiento, se alineó con el fragmento T18 del plásmido para determinar la porción que se estaría expresando en estos casos, encontrando que se expresaría desde el aa 47 en el caso de la muestra #2 y desde el aa 46 en el caso de la muestra #4.

Adicionalmente, para evidenciar la posible existencia de un cambio de marco a nivel traduccional (*translational frameshift*), se alinearon las muestras #2 y #4 con el plásmido pUT18 utilizando el programa MEGA 7.0 y se utilizó únicamente la porción de la secuenciación obtenida que es idéntica al plásmido. En esta secuencia se buscó para el caso de la muestra #2 un cambio de marco -1, caracterizado por la presencia de un heptanucleótido X XXY YYZ (siendo X, Y y Z nucleótidos diferentes), sin embargo esta secuencia no fue localizada. Para el caso de la muestra #4 se buscó un cambio de marco +1, caracterizado por la presencia de la secuencia CUU UGA, esta secuencia tampoco fue localizada. Además, estas secuencias de cambio de marco traduccional se buscaron en el fragmento de los genes identificados, sin embargo no fueron localizadas.

Por otra parte, fueron utilizados varios programas bioinformáticos para obtener la mayor información posible sobre las proteínas identificadas. Para predecir la localización subcelular se utilizó el programa CELLO v.2.5 (<http://cello.life.nctu.edu.tw>), el cual arrojó que la proteína Rv1610 es una proteína mayormente de membrana, con dominio pequeños tanto extracelular como citoplasmáticos; también arrojó que la proteína HemY es una proteína mayormente citoplasmática y que la proteína PPE5 es una proteína mayormente extracelular. Para confirmar

estos resultados se utilizó el programa Gpos-mPLoc (<http://www.csbio.sjtu.edu.cn/bioinf/Gpos-multi/>) el cual arrojó que la proteína Rv1610 es una proteína de membrana, HemY es una proteína citoplasmática y PPE5 una proteína citoplasmática.

También se utilizó el programa TMHMM (transmembrane prediction server, <http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) con la proteína Rv1610 para predecir regiones transmembrana (figura 33), indicando que presenta cuatro dominios transmembrana que van desde los aminoácidos (aa) 19-41, 61-83, 90-112 y 141-163, así como porciones citoplasmáticas desde los aa 1-18, 84-89 y 164-235 y porciones extracelulares desde los aa 42-60, 113-140, a diferencia de las proteínas HemY y PPE5 en las cuales no fueron encontradas regiones transmembrana.

Considerando que las proteínas PPE están asociadas a los sistemas de secreción ESX y que estos sistemas se caracterizan por la ausencia de señales de secreción clásicas, se procedió a utilizar el programa SecretomeP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SecretomeP/>) para predecir la posibilidad de secreción no-clásica de la proteína PPE5, indicando que es secretada de esta manera. Por otra parte, considerando que los cofactores FAD, NAD o NADP son esenciales para una diversidad de reacciones entre las que se encuentran los procesos de óxido –reducción y que un gran número de proteínas dependen de ellos para llevar a cabo sus funciones biológicas (Villavicencio, 2012), se utilizó el programa Cofactory (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Cofactory/>) para predecir la especificidad de las proteínas obtenidas por estos cofactores y los resultados arrojaron que la proteína HemY presenta un dominio específico para el cofactor FAD.

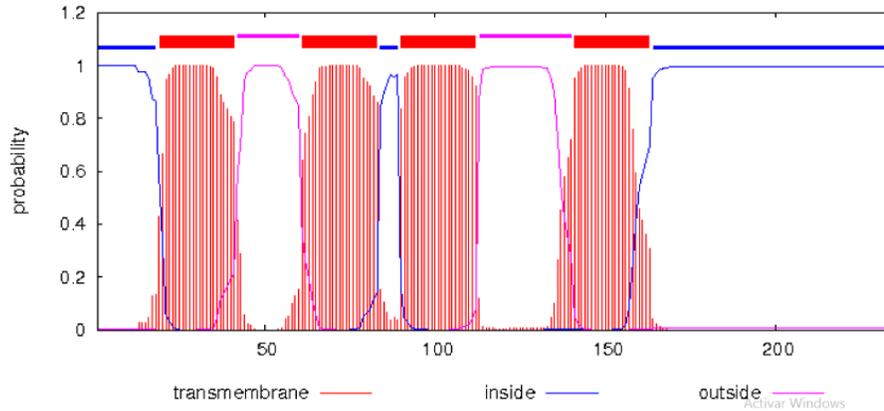
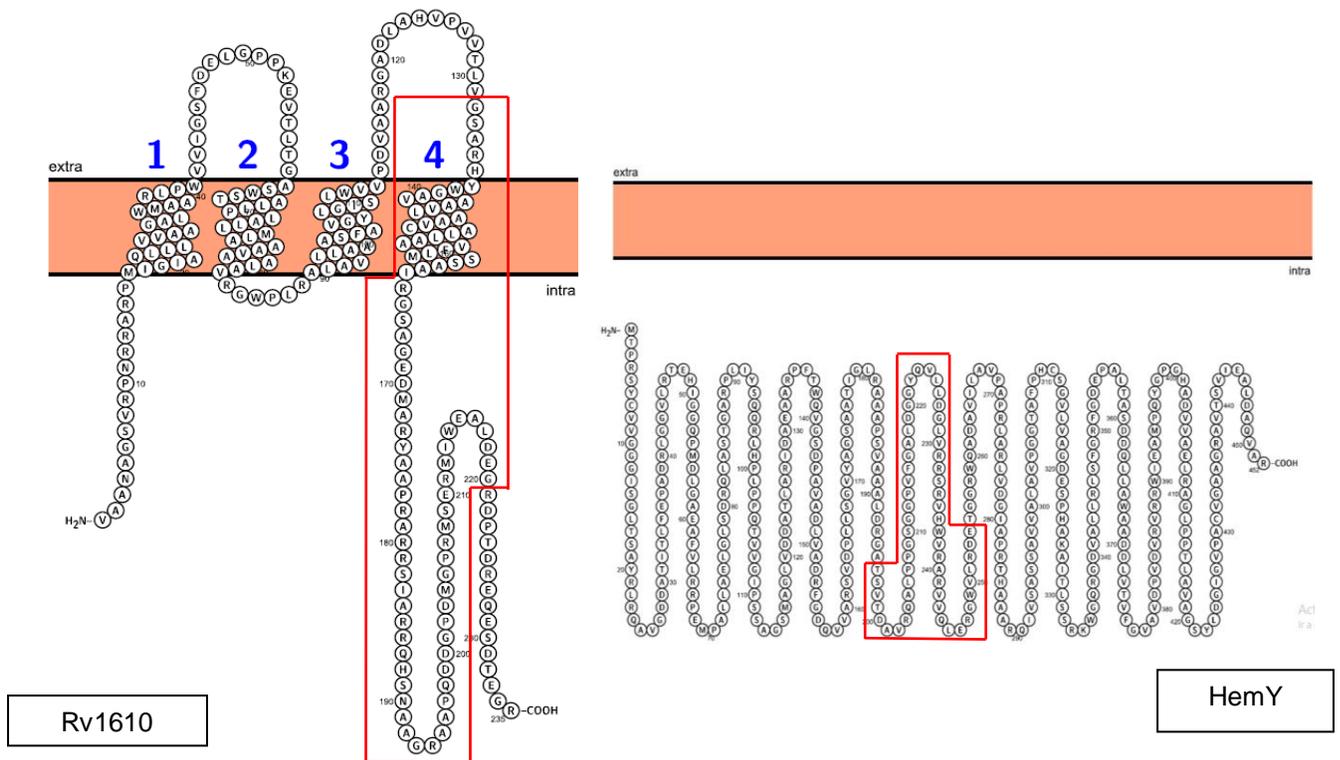


Figura 31. Predicción de regiones transmembrana, citoplasmáticas y extracelulares de la proteína Rv1610 utilizando el programa TMHMM.

También fue utilizado el programa Protter (<http://wlab.ethz.ch/protter/>) para realizar un modelado topológico de las proteínas, lo que podría ayudar a descifrar a qué nivel pudo haber ocurrido la interacción entre ambas proteínas. El modelado de las proteínas Rv1610, HemY y PPE5 se visualiza en la figura 32 y el modelado de la proteína EccB₃ en la figura 33.



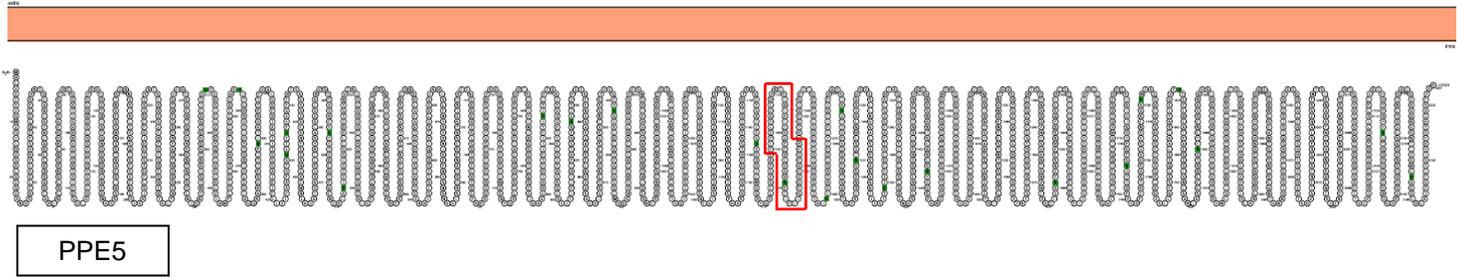


Figura 32. Modelado topológico de las proteínas Rv1610, hemY y PPE5 usando el programa Protter. Región superior: Rv1610 (izquierda) y HemY (derecha). Región inferior: PPE5. Se señala con segmentos rojos el fragmento obtenido de las proteínas en la secuenciación, es decir, las regiones con las que las proteínas aparentemente interactúan con EccB₃.

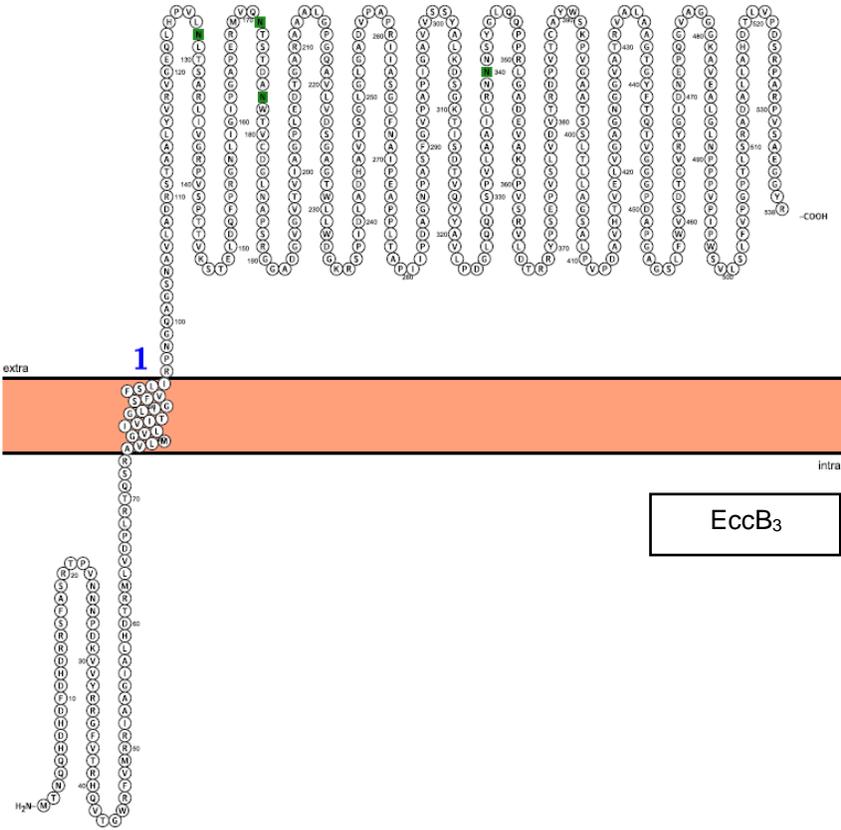


Figura 33. Modelado topológico de la proteína EccB₃ usando el programa Protter. Se observa que posee una región transmembrana, una pequeña región citoplasmática y una región más grande a nivel del espacio periplásmico.

DISCUSIÓN

Elucidar posibles interacciones proteína-proteína ha sido sujeto de intensas investigaciones y comúnmente constituye una de las más altas prioridades en el intento de entender algunos procesos biológicos particulares (Borloo y col., 2007). En este trabajo hemos usado un sistema de dos híbridos bacteriano basado en la reconstitución, mediado por interacción, de una cascada de señalización dependiente de AMPc (Karimova y col., 1998) para revelar posibles interacciones proteína-proteína entre la proteína EccB₃, la cual es un componente conservado del sistema de secreción ESX-3, y el resto de las proteínas codificadas por el genoma de *Mycobacterium tuberculosis*.

Utilizando este sistema de dos híbridos bacteriano, específicamente a través del ensayo cualitativo en placas, se pudo demostrar que las cuatro muestras obtenidas, es decir, los cuatro genes de *Mycobacterium tuberculosis* fusionados al plásmido pUT18 en cada caso, codifican proteínas que posiblemente son capaces de interactuar con EccB₃. Sin embargo, en la figura 13 se observó que la muestra #2 durante el tercer paso de confirmación de las interacciones fue la única que en cuyo control negativo desarrolló algunas colonias con coloración rojiza, lo que nos hizo pensar que esta muestra era un falso positivo debido a que ocurre una aparente interacción con el vector pKT25 vacío. Sin embargo, esta muestra no fue excluida de los siguientes ensayos debido a que para el mismo control negativo se observaron niveles bajos de actividad de la β-galactosidasa, incluso parecidos a los de la cepa BTH101 sin plásmidos.

Los dominios T25 y T18 de la adenilato ciclasa son incapaces de interactuar al ser expresados por separado y por ende generar la actividad propia de la enzima (Karimova y col., 1998). Los pasos de confirmación de las interacciones fueron realizados con la finalidad de descartar la presencia de falsos positivos en las cuatros muestras obtenidas durante el ensayo cualitativo. Karimova y col. (2000) sugieren que la aparición de falsos positivos tiene orígenes diferentes. El primero puede deberse a que las células hospederas adquieran fenotipos Lac⁺ o Mal⁺ independientemente de las proteínas híbridas expresadas debido a reversión espontanea de Cya⁻ a Cya⁺, sin embargo las probabilidad de que esto pase son muy bajas. Para evitar esto fue

realizado el segundo paso de confirmación (figura 12) debido a que los autores indican que debe transformarse nuevamente los plásmidos en nuevas células competentes *cya*⁻, encontrando resultados positivos para las cuatro muestras, por lo que se descarta la posibilidad de un falso negativo por esta razón. El segundo origen se refiere a la inserción en uno de los plásmidos de un gen que codifique un fragmento de una adenilato ciclasa que sea catalíticamente activa en *E. coli* o que se haya insertado en uno de los plásmidos un gen que codifique una proteína que sea capaz de unirse directamente al fragmento T25 (en este caso), restaurando así la actividad de la adenilato ciclasa. Feller y Lewitzky (2012) sugieren que esto puede deberse a proteínas “pegajosas” o autoactivantes, que al ser expresadas de manera recombinante forman agregados que pueden unirse a proteínas irrelevantes de *E. coli* u otras células hospederas de manera inespecífica. Al transformar los plásmido de interés nuevamente en células que poseían el plásmido pKT25 vacío se encontró resultados positivos en la muestra #2, lo que sugiere que de alguna manera el gen fusionado a T18 codifica una proteína capaz de unirse directamente al plásmido T25 para reconstituir la actividad de la adenilato ciclasa (figura 13).

En *E. coli*, la expresión del gen *lacZ*, que codifica para la enzima β -galactosidasa, está regulado positivamente por el complejo AMPc/CAP y es por esto que las medidas de la actividad de la β -galactosidasa en cultivos líquidos de células bacterianas ofrecen una manera conveniente para cuantificar la interacción entre dos proteínas híbridas (Ouellete y col., 2001). Además, según Griffith y col. (2002), la β -galactosidasa es uno de los reporteros de expresión genética, tanto para procariontes como eucariotes, más utilizados en biología molecular debido a que su actividad puede monitorearse usando una gran variedad de sustratos cromogénicos y fluorogénicos.

Durante el ensayo previo de la actividad de la β -galactosidasa (figura 14) fue posible notar que el control negativo mantiene una absorbancia relativamente baja y estable, como era de esperarse, debido a que la producción de la enzima es baja o nula. Según Dove y Hochschild (S/F) es importante tener en cuenta que cierta cantidad de actividad β -galactosidasa podría ser aparente en los controles negativos, reflejando transcripción basal a partir del promotor que conduce la expresión de gen reportero *lacZ*. Esto es diferente en el caso del control positivo ZIP,

donde existe una alta producción de esta enzima y se observó que comenzó a alcanzar una estabilidad en la absorbancia aproximadamente a los 6-7 minutos, lo que implica que aún si se deja correr más tiempo, la absorbancia no seguirá aumentando debido a que el sustrato se agota. Debido a esto se decidió tomar 7 minutos como el tiempo utilizado para llevar a cabo la reacción enzimática durante los posteriores ensayos cuantitativos.

Los resultados obtenidos durante el ensayo cuantitativo (figura 15) reflejaron una alta actividad por parte del control positivo ZIP con un promedio de 6329 unidades de β -galactosidasa/mg de peso seco bacteriano. Esto coincide con el valor señalado por el fabricante EUROMEDEX, el cual indica que la complementación entre T25-zip y T18-zip puede estar entre 6000-8000 unidades/mg, lo que podría explicar por qué la desviación estándar fue alta en este caso. Para el caso del control positivo EsxA-EsxB se obtuvo un valor promedio más bajo del esperado (579 unidades/mg), considerando que durante el ensayo cualitativo las colonias obtenidas fueron de un color rojizo y que estudios previos llevados a cabo inicialmente por Berthet y colaboradores en el año 1998 han confirmado la secreción de las proteínas EsxA y EsxB como un complejo heterodimérico. Esto quizás puede deberse a que en *M. tuberculosis* la unión de estas proteínas es guiada por proteínas chaperonas que ayudan a estabilizar la unión, al no encontrarse estas en *E. coli* esto pudo disminuir la estabilidad y por ende resultar en un bajo nivel de actividad de la β -galactosidasa. En el caso de los controles negativos tanto generales (pKT25-EccB₃ vs. pUT18c y BTH101 vacía) como los utilizados en cada muestra (pKT25 vacío vs. pUT18-gen MTB), todos siguieron la misma tendencia, obteniendo un valor promedio de 484 unidades/mg.

Cuando se asocian proteínas híbridas, EUROMEDEX indica que los rangos de actividad de β -galactosidasa pueden ubicarse entre 700 y 7000 unidades/mg, dependiendo de la eficiencia de complementación funcional. Las muestras obtenidas previamente en el ensayo cualitativo reflejaron actividades altas para las muestras #2, #3 y #4, cuyos valores promedio fueron de 2240, 2720 y 2566 unidades/mg, respectivamente. Esto fue diferente para el caso de la muestra #1, la cual arrojó un valor promedio de 586 unidades/mg. Para considerar que existe una interacción entre las proteínas híbridas, el nivel de actividad de la β -galactosidasa debe ser al menos 4 o 5

veces más alta que la medida en los controles negativos (Karimova y col., 2005; Dove y Hochschild, S/F; Karimova y col., 2017; Olson y col., 2018). La figura 16 nos permitió hacer esta comprobación y los resultados coincidieron con lo planteado anteriormente, encontrando que los valores de actividad de las muestras #2, #3 y #4 son entre 4 y 5 veces más altas que los controles negativos, lo que no fue el caso para la muestra #1. Debe recordarse que durante el ensayo cualitativo la muestra #2 fue catalogada como posible falso positivo debido a que se encontró colonias rojizas en su respectivo control negativo (figura 13), sin embargo, durante el ensayo cuantitativo el valor de actividad de la β -galactosidasa de este control fue similar al resto de los controles negativos, lo que nos hizo pensar que esta muestra pueda no ser un falso positivo.

Los fragmentos de gen de la genoteca de *M. tuberculosis* que probablemente interactúan con EccB₃ fueron identificados realizando una búsqueda a partir de los resultados de la secuenciación, con el uso de la herramienta BLAST, como las proteínas: Rv1610 (muestra #1), una proteína de membrana conservada asociada a la biosíntesis de triptófano (Trp); hemY (muestra #2), una proteína citosólica involucrada en la biosíntesis de porfirina y del grupo hemo; PE_PGRS30 (muestra #3), miembro de la familia de proteínas PE/PPE y la cual es requerida para la virulencia de MTB (De Maio y col., 2014); y PPE5 (muestra #4), miembro también de la familia de proteínas PE/PPE y cuya función es aún desconocida.

A pesar de los valores obtenidos en el ensayo cuantitativo, el análisis de las secuencias evidenció que el fragmento de gen encontrado en la muestra #1 está en el mismo marco de lectura de la región que codifica el dominio T18 (figura 21) y por ende podría expresarse como proteínas fusionadas. Al comparar con el control positivo EsxA-EsxB, los valores fueron similares, por lo que no se descarta que pueda haber una interacción entre el fragmento de Rv1610 y la proteína EccB₃. Battesti y Bouveret (2012) señalan que en el caso de proteínas de membrana se ha observado más frecuentemente señales débiles inespecíficas de interacción que en el caso de proteínas solubles, lo que probablemente se deba a la aglomeración de proteínas en la membrana, por lo que es muy importante desarrollar controles específicos, como por ejemplo los híbridos MalF y MalG que interactúan fuertemente. Tomando esto en cuenta y considerando que

tanto EccB₃ como Rv1610 son proteínas transmembrana, deben desarrollarse más ensayos que permitan confirmar si realmente existe una interacción entre ambas.

A pesar de que con PGRS_30 (muestra #3) se obtuvo resultados positivos tanto en el ensayo cualitativo como cuantitativo, los resultados de la secuenciación indicaron que presenta la orientación invertida, por lo que hacen falta más estudios que permitan explicar por qué esta proteína aún bajo estas condiciones pareciera estar expresándose.

Por otra parte, la detección de clones positivos para interacción tanto en el ensayo cualitativo como cuantitativo para las muestras #2 y #4 nos hace pensar que tal vez puedan estarse expresando tales proteínas a pesar de no estar en marco de lectura con el dominio T18 o bien que puedan ser falsos positivos. Karimova y col. (2005) indican que debido a que este ensayo de dos híbridos es llevado a cabo en *E. coli*, es posible que parte de la complementación detectada se deba a una asociación indirecta entre las dos proteínas híbridas desencadenada por una proteína endógena que actúe como puente entre ambas. Tales interacciones indirectas, mediadas por un tercer socio no deben descartarse fácilmente.

Un estudio llevado a cabo por Karimova y col. (2012) determinó que entre los clones obtenidos usando una genoteca, solo 1/6 de estos albergaba fragmentos de ADN insertados en la orientación correcta y en marco con el fragmento T25 (en ese caso). Ouellete y col. (2017), señalan que en principio, el gen que codifica una pareja potencial de la proteína cebo, o un fragmento de su secuencia codificante, podría estar insertada en la orientación correcta y en marco con el fragmento T18 o T25, según sea el caso. Sin embargo, en algunos casos los genes clonados fuera de marco pueden todavía expresarse en parte como una fusión auténtica con el fragmento T18 o T25 debido a un deslizamiento transcripcional (*transcriptional slippage*) o un cambio de marco traduccional (*translational frameshift*). Tales clones fuera de marco podrían ser encontrados cuando el gen codificado tiene tendencia a ser tóxico para las células hospederas, ya sea intrínsecamente o cuando se expresa como una proteína de fusión.

En este trabajo no puede comprobarse que las proteínas hemY o PPE5 sean tóxicas para *E. coli*, sin embargo haciendo uso del sistema BACTH se están sobre expresando ambas proteínas y considerando que hemY está involucrado en la biosíntesis del grupo hemo y que altas concentraciones de hierro si se considera tóxico para las células, esta posibilidad no se descarta. Tomando en cuenta nuestros resultados (figuras 29 y 30), la ocurrencia de un deslizamiento transcripcional tampoco se descarta. Según Schumann (2006), el desplazamiento en la transcripción (*transcriptional slippage*) involucra tanto la incorporación de nucleótidos adicionales como la delección de estos en el ARNm debido a la elongación de la ARN polimerasa. Durante la elongación, un híbrido de 9 nucleótidos entre el ARNm y el ADN en el complejo de elongación de la transcripción mantiene a la ARN polimerasa en registro con la secuencia transcrita (Sidorenkov y col., 1998; Vassylyev y col., 2007). El mecanismo propuesto para el desplazamiento involucra la disociación del híbrido y la reparación del ARNm con el ADN en una posición desplazada. El resultado es poblaciones heterólogas de ARNm que difieren en el número de nucleótidos en comparación con la secuencia original, lo que lleva a la síntesis de más de un producto útil a partir de un único gen (Baranov y col., 2005). A pesar de que este fenómeno usualmente sucede cuando hay secuencias homopoliméricas de 9 As o 9 Ts, los eventos de deslizamiento hacia adelante, que resultan en delecciones de transcripción, no dependen de cadenas homopoliméricas y son más probables inmediatamente después de la transcripción de los dinucleótidos CA, TA o AT en *E. coli*. Además, para que sea más probable que ocurra este fenómeno debe haber una complementariedad de más de 3 nucleótidos entre el ARNm y la nueva posición en el ADN, preferiblemente hacia el extremo 3' (Traverse y Ochman, 2017).

Aquí, para que el marco de lectura se mueva al mismo marco del fragmento T18 debe haber dos delecciones en el ARNm de la muestra #2 y una delección en el ARNm de la muestra #4. En el análisis de estas secuencias, no hubo presencia de cadenas homopoliméricas pero si se detectó la presencia del dinucleótido AT y complementariedad entre cuatro nucleótidos aguas arriba, lo que promovería el reinicio de la transcripción. Según Traverse y Ochman (2017), las bases comúnmente encontradas después de las delecciones son en orden de ocurrencia A, T y C, y aunque G no es común, no se descarta que pueda presentarse. El primer nucleótido que se

transcribiría luego la delección de dos nucleótidos en el caso de la muestra #2 es una C mientras que para el caso de la delección de un nucleótido en la muestra #4 es una G. Tomando en cuenta esto, es posible que pueda ocurrir un deslizamiento transcripcional en estos casos, lo que pudiera comprobarse realizando una RT-PCR.

En el caso de un cambio de marco traduccional o ribosomal (*translational frameshifting*), Chandler y Fayet (1993) indican que suele suceder más durante la elongación que en la iniciación como un mecanismo regulatorio que permite la expresión a partir de un único transcrito (ARNm) de dos o más proteínas alternativas que tienen diferentes propiedades y combinaciones de dominios. La secuencia que autoriza un cambio hacia atrás (-1) en el ribosoma es un heptanucleótido del tipo X XXY YYZ y según Baranov y col. (2002) la secuencia que autoriza un cambio hacia adelante (+1) es CUU UGA, además de otra serie de factores. En ninguna de las secuencias que codifican las proteínas híbridas hemY-T18 y PPE5-T18 fueron localizadas estas secuencias de cambio de marco, sin embargo, debido a que varios factores afectan la posibilidad de un cambio de marco a nivel de traducción, no es posible predecirlos basándose únicamente en la secuencia de nucleótidos.

Ahora bien, considerando que el fragmento del gen Rv1610 estuvo en marco de lectura con el fragmento T18, se describe la información hasta ahora conocida. El Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), describe a Rv1610 como una proteína transmembrana de la familia TIGR02234 asociada al triptófano. Los miembros de esta familia se encuentran en Actinobacterias (*Mycobacterium*, *Corynebacterium*, *Streptomyces*) y están siempre asociados con genes para la biosíntesis de triptófano, encontrando genes ortólogos en *M. smegmatis* (MSMEG_3218), *M. bovis* (Mb1636), *M. leprae* (ML1270) y *M. marinum* (MMar_2412) según la base de datos de Tuberculist. De forma similar, el Instituto Bioinformático Europeo (EMBL-EBI) la define como una proteína hipotética de membrana conservada asociada a la biosíntesis de triptófano.

El fragmento del gen *rv1610* obtenido va desde los aminoácidos 132 al 220, lo que corresponde a una pequeña porción del último dominio extracelular, así como el último dominio

transmembrana y una región del último dominio citoplasmático (figura 32). Esto podría indicar que la interacción entre Rv1610 y EccB₃ puede estar localizada principalmente en estas regiones, más aun, se sugiere que ambas proteínas interactúan principalmente a nivel citoplasmático, sin embargo más pruebas deben realizarse para afirmar esto.

Como se ha señalado, la proteína Rv1610 está asociada a la biosíntesis de triptófano. Abrahams y col. (2017), señalan que las enzimas involucradas en la biosíntesis de triptófano en *M. tuberculosis* están codificadas en el operón *trp* (5' – 3'): *trpE*, *rv1610*, *trpC*, *trpB*, *trpA*. Así, Xie y col. (2003) indican que *M. tuberculosis* posee un gen hipotético conservado (*rv1610*) insertado entre *trpE* y *trpC*, al cual denominaron *chyp*. Los autores encontraron que *rv1610* parece codificar una proteína de membrana con tres segmentos transmembrana de función desconocida. Esto coincide con los resultados obtenidos por el programa TMHMM (figura 33), aunque este programa identifica cuatro segmentos transmembrana, lo obtenido por Xie y col. pudo deberse a que los segmentos 2 y 3 están muy cercanos.

Por otro lado, Loots y col. (2013) señalaron que sitios de unión IdeR y regulación dependiente de hierro fueron identificados río arriba de los genes *pheA* y *trpE* en varias micobacterias. Estos genes codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de fenilalanina, tirosina y triptófano. La expresión de PheA y TrpE se conoce estar regulada negativamente cuando el hierro intracelular está elevado, llevando a reducir la síntesis de fenilalanina y triptófano. Además, a pesar que no están identificados como marcadores, concentraciones reducidas de triptófano y fenilalanina fueron observadas en cepas de *M. smegmatis* que no portan el sistema ESX-3, lo que confirma el rol de ESX-3 en la toma de hierro. A pesar de esto, no es clara la relación específica que puede existir entre la proteína Rv1610 con la proteína EccB₃, que como se ha mencionado pertenece al sistema de secreción ESX-3.

Adicionalmente, Zhang y col. (2013) determinaron que la biosíntesis de triptófano protege a *M. tuberculosis* de la muerte mediada por células T CD4. Las células T CD4 entran al granuloma formado cuando hay una infección pulmonar típica por MTB y estimulan a los macrófagos infectados. Sus resultados sugieren que uno de estos mecanismos de estimulación impone la

necesidad de biosintetizar Trp por parte de la bacteria para no morir debido a que el Trp es requerido para el crecimiento. Para probar que las células T CD4 ayudan a privar a MTB de Trp exógeno, los autores bloquearon la biosíntesis endógena de Trp y determinaron que la cepa auxótrofa murió rápidamente, sugiriendo que la biosíntesis de Trp es un blanco atractivo para drogas bactericidas. También demostraron que la pérdida o inhibición de esta vía biosintética vuelve hipersusceptible a MTB a la muerte mediada por IFN- γ dentro de macrófagos, durante la infección *in vivo* e *in vitro*. Esta observación resalta uno de los mejores mecanismos de protección del hospedero contra organismos invasores: privarlos de nutrientes clave. La infección dispara respuestas del hospedador que secuestra componentes importantes como aminoácidos y hierro (Zhang y col., 2013). Es importante resaltar que aunque la biosíntesis de aminoácidos no ha sido vista como un factor de virulencia en MTB, estos procesos son claramente esenciales y pueden servir como base para el diseño de nuevas drogas (Zhang y Rubin, 2013).

Por otra parte, en caso de que pueda ocurrir un desplazamiento transcripcional (*transcriptional slippage*) tal como fue planteado anteriormente, la proteína EccB₃ sería capaz de interactuar también con las proteínas HemY y PPE5. La proteína HemY, según la base de datos de Mycobrowser y el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI), se describe como una enzima protoporfirinógeno-IX oxidasa dependiente de FAD (lo que coincide con los resultados arrojados por el programa Cofactory), involucrada en la biosíntesis de hemo y porfirina, específicamente en el penúltimo paso de esta vía, catalizando la oxidación de 6 electrones del protoporfirinógeno IX para formar protoporfirina IX. El fragmento del gen *hemY* obtenido va desde los aminoácidos 196 al 254 y al ser una proteína citosólica, la interacción entre esta con EccB₃ debe localizarse estrictamente a nivel citoplasmático.

El grupo hemo constituye el reservorio de hierro más grande en el cuerpo humano, requerido para la función de muchas proteínas celulares, por ejemplo funciona como un transportador de electrones y se requiere para la respiración celular. También es utilizado por muchos patógenos bacterianos como fuente de hierro. Si bien la adquisición de hemo está bien estudiada en otros patógenos bacterianos, poco se sabe en *M. tuberculosis*, además la

contribución de la síntesis de hemo a la patogénesis de bacterias ha sido poco estudiada (Choby y Skaar, 2016; Mitra y col., 2017). Las enzimas terminales de la ruta biosintética de hemo y porfirina, que existen solo en Actinobacterias y Firmicutes: HemQ, HemY y HemH han sido señaladas por Mitra y col. (2017) como tres blancos potenciales para ser usados en el diseño de drogas. En relación al sistema de secreción ESX-3, experimentos llevados a cabo por Serafini y col. (2013) demostraron que la deficiencia de este sistema de secreción disminuyó la capacidad para utilizar hemo como fuente de hierro en *M. tuberculosis* pero no en *M. smegmatis*, lo que los hizo plantearse si ESX-3 está directamente involucrado en la adquisición de hemo o si las vías de sideróforos y utilización de hemo están conectadas en *M. tuberculosis*. Teniendo en cuenta que el sistema de secreción ESX-3 está asociado a la homeostasis de hierro y zinc, el resultado de que la proteína EccB₃ y HemY puedan de alguna manera interactuar, sugiere que pueda estar involucrado en la regulación de la toma de hierro a través del grupo hemo a nivel citosólico.

La proteína PPE5, es un miembro de la familia de proteínas PPE los cuales reciben este nombre por la presencia de motivos Pro-Pro-Glu cerca del extremo N-terminal de sus productos génicos. El fragmento del gen *ppe5* obtenido va desde los aminoácidos 1180 al 1226. Según la base de datos de Mycobrowser su función no ha sido caracterizada, según la base de datos de Tuberculist es una proteína no esencial y según Kruh y col (2010), la expresión *in vivo* de la proteína en pulmones de cerdos se observó a los 30 días después de la infección, es decir, en la fase temprana de la enfermedad donde las lesiones consistían en inflamación y áreas de necrosis central. Aunque la función exacta se desconoce, en general estas proteínas residen en el envoltorio celular y están implicadas en el incremento de variación antigénica, lo que coincide con el resultado arrojado por los programas Gpos-mPLOC y SecretomeP de localizarse a nivel citoplasmático y luego de ser secretada permanecer a nivel ya sea periplásmico o en la envoltura celular. Kohli y col. (2012), indican que los dominios globulares de las proteínas les confieren funciones especiales y específicamente esta proteína presenta 4 de estos dominios. Comúnmente, las proteínas PPE están asociadas a ser secretadas por los sistemas de secreción tipo VII o ESX (Abdallah y col., 2007) y suelen ser responsables de la virulencia de MTB debido a que son potentes antígenos de células T y B y podrían ayudar a evadir la respuesta inmune del

hospedero. Adicionalmente, Gey van Pittius y col. (2006), sugieren que los codones de inicio alternativos, las deleciones e inserciones en marco y en cambio de marco así como la inserción de elementos transponibles contribuyen a la variación antigénica de estas proteínas. Podría sugerirse que esta proteína es transportada al espacio periplásmico hacia el envoltorio celular por el sistema ESX-3, y que la proteína EccB₃ tendría un papel importante en este proceso.

Tomando en cuenta que utilizar el sistema de dos híbridos representa solo una parte hacia la identificación de interacciones proteína-proteína y la caracterización de su función, esta técnica debe combinarse con otros ensayos para comprobar que la interacción entre las proteínas antes mencionadas sea real. Además, Karimova y col. (2012) señalan que varios aspectos técnicos relacionados a los sistemas de dos híbridos deben tomarse en cuenta y con los que debe tenerse algo de precaución: la ocurrencia de falsos positivos y falsos negativos representan el principal problema.

En principio, debido a que durante la construcción de los iniciadores se pensaba que la genoteca estaba construida en el plásmido pUT18c y no en el pUT18, los resultados obtenidos de la secuenciación no nos permitieron determinar si los fragmentos del genoma de MTB estaban también en marco con el promotor. Es por esto que deben diseñarse nuevos iniciadores que permitan confirmar esta información. Adicionalmente, tomando en cuenta los resultados obtenidos, como el plásmido aislado solo contenía un fragmento de las secuencias codificantes de las proteínas Rv1610, hemY y PPE5, se recomienda clonar la secuencia completa de cada gen en el plásmido pUT18 y comprobar nuevamente la interacción con la proteína EccB₃. Además, aislando el ARN de las muestras y posteriormente realizando una RT-PCR podría demostrarse si las proteínas híbridas Rv1610-T18, hemY-T18 y PPE5-T18 están efectivamente expresándose.

Karimova y col. (2002) recomiendan también la identificación bioquímica de los complejos de proteínas utilizando inmunodetección, inmunoprecipitación y copurificación, así como también la espectrometría de masas y realización de ensayos mutagénicos que permitan romper las interacciones previamente detectadas de forma tal de caracterizar las interacciones. Adicionalmente, para verificar que la producción de las proteínas híbridas recombinantes es

correcta, Battesti y Bouveret (2012) recomiendan realizar un Western blot, usando anticuerpos contra los dominios fusionados. Por ejemplo, para el caso de proteínas recombinantes fusionadas a T18 se utiliza calmodulina biotinilada. De esta manera, se buscaría evidencia de que la interacción es específica y así mostrar una relevancia fisiológica.

Para finalizar, los resultados presentados en este trabajo de investigación sirven como una primera aproximación al estudio de la red de interacciones que involucran a la proteína EccB₃. Las redes de interacción proteína-proteína para diferentes bacterias patógenas podrían ayudar en la búsqueda de blancos específicos para ser usados en terapias antimicrobianas, así como para detectar candidatos a drogas que rompan tales interacciones (Karimova y col., 2002).

CONCLUSIONES

- Haciendo uso del sistema de dos híbridos de adenilato ciclasa bacteriano (BACTH) se lograron obtener cuatro clones que contenían fragmentos de genes que codifican proteínas que podrían interactuar con EccB₃.
- A través del ensayo cuantitativo se logró observar altos niveles de actividad β-galactosidasa para tres de los cuatro clones, siendo estos entre 4 y 5 veces más altos que el nivel de actividad de los controles negativos.
- Los resultados de la secuenciación evidenciaron que el gen que codifica para la proteína transmembrana Rv1610 fue el único que estuvo en marco de lectura con el fragmento T18.
- Se encontró que el fragmento de gen que codifica para la proteína PE_PGRS30 (muestra #3) no estaba en la orientación correcta de transcripción. A pesar de esto, se desconoce la razón por la que se observaron valores positivos tanto a nivel cualitativo como cuantitativo.
- Mientras se analizaban las secuencias obtenidas de los fragmentos de los genes *hemY* (muestra #2) y *ppe5* (#4) se evidenció que no estaban en marco de lectura con el fragmento T18. Sin embargo, se encontró un patrón de secuencias que podrían conducir a un deslizamiento transcripcional y por ende permitiría la posible expresión de estos genes, reflejado en los altos valores de actividad β-galactosidasa arrojados.

BIBLIOGRAFÍA

- Abdallah, A., Gey van Pittius, N., DiGiuseppe, P., Cox, J., Luirink, J., Vandenbroucke, C., Appelmelk, B, y colaboradores. 2007. Type VII secretion—mycobacteria show the way. *Nat Rev Microbiol*, **5**: 883–891.
- Abrahams, K., Cox, J., Futterer, K., Rullas, J., Órtega-Muro, F., Loman, N., Mynihan, P., y colaboradores. 2017. Inhibiting mycobacterial tryptophan synthase by targeting the inter-subunit interface. *Scientific Reports*, **7**: 9430.
- Ates, L., Houben, E., Bitter, W. 2016. Type VII secretion: a highly versatile secretion system. *Microbiol Spectrum* **4(1)**.
- Baranov, P., Gesteland, R., Atkins, J. 2002. Release factor 2 frameshifting sites in different bacteria. *EMBO reports*, **3(4)**: 373 – 377.
- Baranov, P., Hammer, A., Zhou, J., Gesteland, R., Atkins, J. 2005. Transcriptional slippage in bacteria: distribution in sequenced genomes and utilization in IS element gene expression. *Genome Biology*, **6(3)**: R25.
- Battesti, A., Bouveret, E. 2012. The bacterial two-hybrid system based on adenylate cyclase reconstitution in *Escherichia coli*. *Methods*, **58(4)**: 325–334.
- Berggard, T., Linse, S., James P. 2007. Methods for the detection and analysis of protein-protein interactions. *Proteomics*, **7**: 2833-2842.
- Berthet, F., Rasmussen, P., Rosenkrands, I., Andersen, P., Gicquel, B. 1998. A Mycobacterium tuberculosis operon encoding ESAT-6 and a novel low-molecular-mass culture filtrate protein (CFP10). *Microbiology*, **144**: 3195 – 3203.
- Bitter, W., Houben, E., Bottai, D., Brodin, P., Brown, E., Cox, J., Derbyshire, K. y colaboradores. 2009. Systematic Genetic Nomenclature for Type VII Secretion Systems. *PLoS Pathog* **5(10)**.
- Borloo, J., De Smet, L., Vergauwen, B., Van Beeumen, J., Devreese, B. 2007. A β -Galactosidase-Based Bacterial Two Hybrid System To Assess Protein-Protein Interactions in the Correct Cellular Environment. *Journal of Proteome Research*, **6**: 2587-2595.

- Bottai, D., Serafini, A., Cascioferro, A., Brosch, R., Manganeli, R. 2014. Targeting Type VII/ESX Secretion Systems for Development of Novel Antimycobacterial Drugs. *Current Pharmaceutical Design*, **20 (27)**: 4346-4356.
- Cabañas, P., Huerta, A. 2014. Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo Nano*, **7(13)**: 28-36.
- Cárdenas-Perea, M., Cruz, O., Gándara, J., Pérez, M. 2014. Factores de virulencia bacteriana: la “inteligencia” de las bacterias. *Elementos*, **94**: 35-43.
- Casal, M., Guerrero, A., Martín, N., Moreno, S., Nogales, M. 1999. Procedimientos en Microbiología Clínica. Capítulo 9: Diagnóstico microbiológico de las infecciones por micobacterias. Editor: Juan J. Picazo. Madrid, España.
- Chan, P., Chun, H., Corley, E., Jeong, I., Kim, C., Lane, C., Mandler, A., y colaboradores. 2017. Inhibition of protein-protein interactions in *Mycobacterium tuberculosis*. Tesis, Universidad de Maryland, College Park, Estados Unidos.
- Chandler, M., Fayet, O. 1993. Translational frameshifting in the control of transposition in bacteria. *Molecular Microbiology*, **7(4)**: 497 – 503.
- Choby, J., Skaar, E. 2016. Heme Synthesis and Acquisition in Bacterial Pathogens. *Journal of Molecular Biology*, **428(17)**: 3408 – 3428.
- Cole, S., Brosch, R., Parkhill, J., Garnier, T., Churcher, C., Harris, D., Gordon, S. y colaboradores. 1998. Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, **393**: 537–544.
- Daleke, M., Ummels, R., Bawono, P., Heringa, J., Vandenbroucke-Grauls, C., Luirink, J., Bitter, W. 2012. General secretion signal for the mycobacterial type VII secretion pathway. *PNAS*, **109(28)**: 11342–11347.
- De Maio, F., Maulucci, G., Minerva, M., Anosheh, S., Palucci, I., Iantomasi, R., Palmieri, V., y colaboradores. 2014. Impact of Protein Domains on PE_PGRS30 Polar Localization in Mycobacteria. *PLoS ONE*, **9(11)**: e112482.
- Dove, S., Hochschild, A. S/F. A Bacterial Two-Hybrid System Based on Transcription Activation. *Methods in Molecular Biology*, **261**: 231-246.

- EUROMEDEX. BACTH System Kit: Bacterial Adenylate Cyclase Two-Hybrid System Kit.
- Falkinham, J.O. III. 2008. Surrounded by Mycobacteria: nontuberculous mycobacteria in the human environment. *J. Appl. Microbiol.* **2**: 356-367.
- Feller, S., Lewitzky, M. 2012. Very 'sticky' proteins – not too sticky after all? *Cell Communication and Signaling*, **10**(15).
- Fields, S., Sternglanz, R. 1994. The two-hybrid system: an assay for protein-protein interactions. *Trends in Genetics*, **10**(8):286-292.
- Flynn, J., Chan, J. 2001. Immunology of Tuberculosis. *Annu. Rev. Immunol*, 19: 93-129.
- Gey van Pittius, N., Sampson, S., Lee, H., Kim, Y., Helden, P., Warren, R. 2006. Evolution and expansion of the *Mycobacterium tuberculosis* PE and PPE multigene families and their association with the duplication of the ESAT-6 (*esx*) gene cluster regions. *BMC Evol Biol*, **6**: 95.
- Glickman, M., Jacobs, W. 2001. Microbial Pathogenesis of *Mycobacterium tuberculosis*: Dawn of a Discipline. *Cell Press*, **104**: 477–486.
- Green, E., Meccas, J. 2016. Bacterial Secretion Systems – An overview. *Microbiol. Spectr.*, **4**(1).
- Green, M., Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: A laboratory manual. CSHL Press, Cuarta edición, volumen I, Nueva York, EEUU.
- Green, M., Sambrook, J. 2012. Molecular Cloning: A laboratory manual. CSHL Press, Cuarta edición, volumen III, Nueva York, EEUU.
- Griffith, K., Wolf, R. 2002. Measuring β -Galactosidase Activity in Bacteria: Cell Growth, Permeabilization, and Enzyme Assays in 96-Well Arrays. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **290**: 397-402.
- Guinn, K., Hickey, M., Mathur, S., Zakel, K., Grotzke, J., Lewinsohn, D., Sherman, D. 2004. Individual RD1-region genes are required for export of ESAT-6/CFP-10 and for virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol Microbiol*, **51** (2): 359-370.
- Hanahan, D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J. Mol. Biol.*, **166**: 557-580.
- Hernández, J. 2009. Componentes micobacterianos involucrados en la interiorización a células no fagocíticas. Tesis Doctoral, Instituto Politécnico Nacional, Distrito Federal, México.

- Houben, E., Korotkov, K., Bitter, W. 2014. Take five- Type VII secretion systems of Mycobacteria. *Biochim Biophys Acta*, **1843 (8)**: 1707 – 1716.
- James, P., Halladay, J., Craig, E. 1996. Genomic Libraries and a Host Strain Designed for Highly Efficient Two-Hybrid Selection in Yeast. *Genetics*, **144**: 1425 – 1456.
- Kapopoulou, A., Lew, J.M., Cole, S.T. 2011. The MycoBrowser portal: a comprehensive and manually annotated resource for mycobacterial genomes [en línea]. <https://mycobrowser.epfl.ch/> Tuberculosis (Edinb). Jan **91 (1)**: 8 – 13.
- Karimova, G., Pidoux, J., Ullmann, A., Ladant, D. 1998. A bacterial two-hybrid system based on a reconstituted signal transduction pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**: 5752 – 5756.
- Karimova, G., Ullman, A., Ladant, D. 2000. A Bacterial Two-Hybrid System that Exploits a cAMP Signaling Cascade in *Escherichia coli*. *Methods in Enzymology*, **328**: 59 – 63.
- Karimova, G., Ladant, D., Ullmann, A. 2002. Two-hybrid systems and their usage in infection biology. *Int. J. Med. Microbiol.*, **292**: 17 – 25.
- Karimova, G., Dautin, N., Ladant, D. 2005. Interaction Network among *Escherichia coli* Membrane Proteins Involved in Cell Division as Revealed by Bacterial Two-Hybrid Analysis. *Journal of Bacteriology*, **187 (7)**: 2233 – 2243.
- Karimova, G., Davi, M., Ladant, D. 2012. The beta-lactam resistance protein Blr, a small membrane polypeptide, is a component of the *Escherichia coli* cell division machinery. *Journal of Bacteriology*, **194**: 5576 – 5588.
- Karimova, G., Gaudiard, E., Davi, M., Ouellette, S., Ladant, D. 2017. Protein-Protein Interaction: Bacterial Two Hybrid. *Bacterial Protein Secretion Systems: Methods and Protocols, Methods in Molecular Biology*, **1615**: 159 – 176.
- Klepp, L., Soria, M., Blanco, F., Bianco, M., Santangelo, M., Cataldi, A., Bigi, F. 2009. Identification of two proteins that interact with the Erp virulence factor from *Mycobacterium tuberculosis* by using the bacterial two-hybrid system. *BMC Mol Biol*, **10**: 3.
- Kohli, S., Singh, Y., Sharma, K., Mittal, A., Ehtesham, N., Hasnain, S. 2012. Comparative genomic and proteomic analyses of PE/PPE multigene family of *Mycobacterium tuberculosis*

H37Rv and H37Ra reveal novel and interesting differences with implications in virulence. *Nucleic Acids Research*, **40(15)**: 7113 – 7122.

- Koster, M., Bitter, W., Tommassen, J. (2000) Protein secretion mechanisms in Gram-negative bacteria. *Int. J. Med. Microbiol.*, **290**: 325-331.
- Kruh, N., Troudt, J., Izzo, A., Prenni, J., Dobos, K. 2010. Portrait of a Pathogen: The *Mycobacterium tuberculosis* Proteome *In Vivo*. *PLoS ONE*, **5(11)**.
- Le Chevalier, F., Cascioferro, A., Majlessi, L., Herrmann, J., Brosch, R. 2014. *Mycobacterium tuberculosis* evolutionary pathogenesis and its putative impact on drug development. *Future Microbiol.*, **9(8)**: 969-985.
- Ligon, L. S., Hayden, J. D., Braunstein, M. 2012. The ins and outs of *Mycobacterium tuberculosis* protein export. *Tuberculosis (Edinb)*, **92**: 121–132.
- Liu, J., Barry, C., Nikaido, H. 1999. *Mycobacteria: Molecular Biology and Virulence*. Cap. 12: Cell wall: physical structure and permeability. Segunda edición, edit. Blackwell Science, USA.
- Loots, D., Reinart, J., Newton-Foot, M., Gey van Pittius, N. 2013. A metabolomics approach exploring the function of the ESX-3 type VII secretion system of *M. smegmatis*. *Metabolomics*, **9**: 631-641.
- López, G. 2006. Desarrollo de un método para detectar genes de *Mycobacterium tuberculosis* que incrementan la sobrevivencia de micobacterias dentro de macrófagos. Tesis doctoral. Instituto Venezolano de Investigaciones Científicas (IVIC), Centro de Estudios Avanzados. Altos de Pipe, Venezuela.
- Maciag, A., Dainese, E., Rodriguez, M., Milano, A., Provvedi, R., Pasca, M., Smith, I., y colaboradores. 2007. Global Analysis of the *Mycobacterium tuberculosis* Zur (FurB) Regulon. *Journal of Bacteriology*, **189 (3)**: 730-740.
- Madigan, T., Martinko, J., Dunlap, P., Clark, D. 2009. Brock, *Biología de los Microorganismos*. Pearson Educación, S.A., Duodécima Edición, Madrid, España.
- Maulén, N. 2011. Factores de virulencia de *Mycobacterium tuberculosis*. *Rev Med Chile*, **139**: 1605-1610.

- Miller, J. 1972. Experiments in Molecular Genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York, United States of America.
- Mitra, A., Speer, A., Lin, K., Ehrt, S., Niederweis, M. 2017. PPE Surface Proteins Are Required for Heme Utilization by *Mycobacterium tuberculosis*. *mBio*, **8(1)**.
- Olson, M., Goldammer, M., Gaudiard, E., Ladant, D., Ouellete, S. 2018. A Bacterial Adenylate Cyclase-Based Two-Hybrid System Compatible with Gateway Cloning. Two-Hybrid Systems: Methods and Protocols, *Methods in Molecular Biology*, **1794**: 75 – 96.
- Ouellete, S., Karimova, G., Davi, M., Ladant, D. 2017. Analysis of membrane protein interactions with a bacterial adenylate cyclase-based two-hybrid (BACTH) technique. *Current Protocols in Molecular Biology*. **118**: 20.12.1 – 20.12.24.
- Pieters, J., Gatfield, J. 2002. Hijacking the host: survival of pathogenic mycobacteria inside macrophages. *TRENDS in Microbiology*, **10(3)**: 142–146.
- Pizarro, J., Cossart, P. 2006. Bacterial Adhesion and Entry into Host Cells. *Cell*, **124**: 715-727.
- Primm, T., Lucero, C., Falkinham, J. 2004. Health Impacts of Environmental Mycobacteria. *Clin Microbiol Rev*, 98-106.
- Rodríguez, G. 2008. Mycobacterias [en línea]. Instituto de Higiene, Facultad de Medicina, Universidad de la República, Uruguay. <http://www.higiene.edu.uy/cefa/2008/micobacterias.pdf> [Consulta: 26 febrero 2018]
- Rossi, F., Charlton, C. A., Blau, H. M. 1997. Monitoring protein–protein interactions in intact eukaryotic cells by β -galactosidase complementation. *PNAS*, **94(16)**:8405–8410.
- Schumann, W. 2006. Dynamics of the Bacterial Chromosome: Structure and Function. John Wiley & Sons, Alemania.
- Serafini, A., Boldrin, F., Palú, G., Manganelli. 2009. Characterization of a *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 Conditional Mutant: Essentiality and Rescue by Iron and Zinc. *Journal of Bacteriology*, **191(20)**: 6340 – 6344.
- Serafini, A., Pisu, D., Palú, G., Rodriguez, M., Manganelli, R. 2013. The ESX-3 Secretion System Is Necessary for Iron and Zinc Homeostasis in *Mycobacterium tuberculosis*. *PLoS ONE*, **8(10)**.

- Sidorenkov, I., Komissarova, N., Kashlev, M. 1998. Crucial Role of the RNA:DNA Hybrid in the Processivity of Transcription. *Molecular Cell*, **2**: 55 – 64.
- Siegrist, M., Unnikrishnan, M., McConnell, M., Borowsky, M., Cheng, T., Siddiqi, N., Fortune, S. y colaboradores. 2009. Mycobacterial Esx-3 is required for mycobactin-mediated iron acquisition. *PNAS*, **106 (44)**: 18792-18797.
- Simeone, R., Bottai, D., Frigui, W., Majlessi, L., Brosch, R. 2015. ESX/type VII secretion systems of micobacteria: Insights into evolution, pathogenicity and protection. *Tuberculosis*, 1-5.
- Smith, I. 2003. *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. *Clinical Microbiology Reviews*, **16(3)**: 463–496.
- Stanley, S., Raghavan, S., Hwang, W., y Cox, J. 2003. Acute infection and macrophage subversion by *Mycobacterium tuberculosis* require a specialized secretion system. *PNAS*, **100(22)**: 13001–13006.
- Stoop, E., Bitter, W., van der Sar, A. 2012. Tubercle bacilli rely on a type VII army for pathogenicity. *Trends in Microbiology*, **20 (10)**: 477-484.
- Strategene Technical Services, 2014. XL1-Blue Competent Cells [en línea]. <https://www.chem-agilent.com/pdf/strata/200249.pdf>
- Traverse, C., Ochman, H. 2017. Genome-Wide Spectra of Transcription Insertions and Deletions Reveal That Slippage Depends on RNA:DNA Hybrid Complementarity. *mBio*, **8(4)**.
- Tufariello, J., Chapman, J., Kerantzas, C., Wong, K., Vilchéze, C., Jones, C., Cole, L., y colaboradores. 2016. Separable roles for *Mycobacterium tuberculosis* ESX-3 effectors in iron acquisition and virulence. *PNAS*.
- Vassilyev, D., Vassilyeva, M., Perederina, A., Tahirov, T., Artsimovitch, I. 2007. Structural basis for transcription elongation by bacterial RNA polymerase. *Nature*, **448**: 157 – 162.
- World Health Organization. Global Health Observatory Data: Top 10 causes of death [en línea]. http://www.who.int/gho/mortality_burden_disease/causes_death/top_10/en/ [Consulta: 16 noviembre 2017]

- World Health Organization. Reports OMS tuberculosis 2016: Venezuela [en línea]. https://extranet.who.int/sree/Reports?op=Replet&name=%2FWHO_HQ_Reports%2FG2%2FPR OD%2FEXT%2FTBCountryProfile&ISO2=VE&LAN=ES&outtype=html [Consulta: 31 mayo 2018]
- World Health Organization. 2016. Global tuberculosis report 2016.
- World Health Organization. 2018. Tuberculosis: datos y cifras.
- Xie, G., Keyhani, N., Bonner, C., Jensen, R. 2003. Ancient Origin of the Tryptophan Operon and the Dynamics of Evolutionary Change. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **6(3)**: 303–342.
- Zhang, X., Li, D., Fleming, J., Wang, L., Zhou, Y., Wang, D., Zhang, X.E. y colaboradores. 2017. Core component EccB1 of the *Mycobacterium tuberculosis* type VII secretion system is a periplasmic ATPase. *The FASEB Journal*, **29 (12)**: 4804-4814.
- Zhang, Y., Reddy, M., Ioerger, T., Rotchild, A., Dartois, V., Schuster, B., Trauner, A., y colaboradores. 2013. Tryptophan Biosynthesis Protects Mycobacteria from CD4 T-Cell-Mediated Killing. *Cell*, **155**: 1296 – 1308.
- Zhang, Y., Rubin, E. 2013. Feast or famine: the host – pathogen battle over amino acids. *Cellular Microbiology*, **15(7)**: 1079 – 1087.

ANEXO

La genoteca de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv fue clonada en el plásmido pUT18, también vector del sistema BACTH, por Klepp y col. en el año 2009. Para la construcción de esta genoteca, el ADN cromosomal de *Mycobacterium tuberculosis* fue digerido parcialmente con la enzima *AluI* (secuencia de corte: AG/CT). Luego, los fragmentos purificados de ADN fueron ligados a los plásmidos pUT18, los cuales fueron digeridos con la enzima *SmaI* (secuencia de corte: CCC/GGG). Análisis de plásmidos seleccionados aleatoriamente a partir de clones individuales mostraron que el tamaño promedio de los insertos era entre 0,5-1 kpb.