

Identificación de genes de *Mycobacterium tuberculosis* que se expresan bajo condiciones de estrés anaeróbico

Viviana López Biol.*
Andrés Lorente Microbiol.*
Juan Manuel Anzola Biol.*
Marcela Lozano Microbiol.*
Jesús Blanco MSc.*
Patricia Del Portillo Microbiol.*
María Mercedes Zambrano PhD.*

Resumen

Objetivo: identificar genes de *M. tuberculosis* que se inducen bajo condiciones de limitación de oxígeno para estudiar su posterior efecto sobre la viabilidad del patógeno. **Materiales y Métodos:** se crecieron cultivos de la cepa no patógena *M. smegmatis* mc²155 en cajas de microcultivo bajo condiciones de estrés anaeróbico. Se construyó una biblioteca genómica de *M. tuberculosis* H37Rv en el plásmido pGFP, la cual fue introducida dentro de *M. smegmatis*. A partir de observación de las células de *M. smegmatis* recombinantes bajo luz UV se identificaron clones que indujeran la expresión del gen reportero bajo condiciones de limitación de oxígeno. Los plásmidos recombinantes de estos clones fueron aislados y los insertos secuenciados. Las secuencias obtenidas fueron analizadas comparándolas con el genoma completo de *M. tuberculosis*. **Resultados:** Se estandarizaron las condiciones

in vitro para realizar estudios por estrés anaeróbico usando la micobacteria *M. smegmatis*. El tamizaje de la genoteca de *M. tuberculosis* dentro de *M. smegmatis* llevó a la identificación de 3 posibles fragmentos genómicos que inducen la expresión de *gfp* en condiciones de estrés anaeróbico. La secuencia de estos insertos reveló que contenían posibles secuencias reguladoras, dos de ellas corriente arriba de los genes para las proteínas hipotéticas Rv2603 y Rv3267 de *M. tuberculosis* y la otra para un marco abierto de lectura no identificado. **Conclusiones:** Utilizando librerías genómicas y una micobacteria no patógena como *M. smegmatis* es posible identificar genes de *M. tuberculosis* posiblemente involucrados en resistencia a condiciones de estrés. **Palabras clave:** *M. tuberculosis*, estrés anaeróbico, librerías genómicas, proteína fluorescente verde, *gfp*.

Infectio 2001; 5(4): 213-222

* Corporación Corpogen, Bogotá, Colombia

Correspondencia: María Mercedes Zambrano, Corporación Corpogen
Carrera 5 No. 66-88, Bogotá, Colombia
Email: corpogen@colomsat.net.co

Introducción

A pesar de las medidas tomadas para erradicar la tuberculosis, ésta es todavía la enfermedad infecciosa que más muertes provoca en el mundo. Aunque hace unas décadas se pensó que había dejado de ser una enfermedad que amenazara a la humanidad, a partir de los años 80 se observó un alarmante resurgimiento de la misma debido en parte a la aparición de cepas resistentes a múltiples drogas, al abandono de las terapias por parte de los enfermos y a la asociación con la infección del virus del SIDA (1,2).

Los problemas para erradicar la enfermedad están íntimamente asociados con la peculiar patogénesis de *Mycobacterium tuberculosis*, el agente causal de la enfermedad, que es capaz de causar tanto un proceso agudo de enfermedad como una infección latente asintomática. Durante la fase latente, el patógeno permanece en el interior del tejido infectado durante años o incluso décadas y puede, en un momento dado, dar lugar a una reactivación de la enfermedad. La magnitud del problema de la latencia es asombrosa puesto que se ha estimado que aproximadamente un tercio de la población mundial puede estar infectada con el bacilo en este estado (3). Las drogas que existen en la actualidad no son efectivas contra el bacilo durmiente, lo cual significa que pueden ocurrir millones de casos de reactivación en el futuro a menos que se desarrollen nuevas estrategias para su control.

Se sabe muy poco acerca del estado fisiológico del bacilo de la tuberculosis durante la latencia y de los mecanismos que utiliza para sobrevivir dentro de su hospedero y causar reactivación de la enfermedad. Se cree que las lesiones en las cuales se establece la latencia presentan condiciones adversas para el microorganismo como privación de oxígeno, carencia de nutrientes, pH bajo y la presencia de radicales tóxicos de oxígeno (4). La identificación de genes involucrados en impartirle al microorganismo la capacidad de sobrevivir y resistir este estrés ambiental podría con-

tribuir al entendimiento de los mecanismos implicados en el establecimiento y mantenimiento de los bacilos latentes y, en un futuro, al desarrollo de drogas efectivas para su control. Aunque se conoce poco acerca de los genes involucrados en este estado, hasta el momento se han reportado dos posibles candidatos implicados en la capacidad de *M. tuberculosis* para persistir dentro del ratón. Uno de ellos es el gen para la isocitrato liasa que es esencial para el metabolismo de los ácidos grasos y el otro es un gen involucrado en la síntesis de anillos de ciclopropano del ácido micólico (5, 6).

Dadas las condiciones en las que se encuentra *M. tuberculosis* dentro del hospedero, se ha propuesto que la limitación de oxígeno es el factor principal en la inducción del estado de latencia. A pesar de que *M. tuberculosis* requiere oxígeno para su crecimiento, éste puede sobrevivir cuando la depleción de oxígeno se hace de forma gradual de tal forma que permita la adaptación del bacilo y el establecimiento de un estado de persistencia no replicativa característico de la latencia (7). El establecimiento de una forma más resistente a condiciones anaeróbicas ha sido también reportada para *M. smegmatis*, sugiriendo que esta micobacteria no patógena, de rápido crecimiento, puede ser utilizada como modelo para entender los mecanismos de latencia (8, 9). Se cree que en el estado de latencia la micobacteria controla su actividad biosintética para conservar energía, explota fuentes alternativas de energía y establece mecanismos para estabilizar sus componentes celulares y reducir la necesidad de realizar procesos celulares costosos (7). El presente estudio describe la estrategia utilizada para identificar genes posiblemente involucrados en la capacidad de *M. tuberculosis* para sobrevivir bajo condiciones de limitación de oxígeno. El tamizaje de una genoteca de *M. tuberculosis* llevó a la identificación de posibles promotores que se inducen bajo condiciones microaerófilas. Estos resultados sirven como un primer paso en la descripción de nuevos genes involucrados en la persistencia de este importante patógeno.



Materiales y Métodos

Cepas y condiciones de crecimiento

En este estudio se utilizaron las cepas *Escherichia coli* JM109 y *M. smegmatis* mc²155 (10). Las células de *E. coli* fueron crecidas a 37°C en medio Luria Bertani (LB) sólido o líquido, con agitación (11), suplementado con 50 µg/ml de Kanamicina (Km), en caso de ser necesario. *M. smegmatis* se cultivó a 37°C en medio sólido Middlebrook 7H10 o en medio líquido LB o Middlebrook 7H9 (Difco, Detroit, MI) con 0.05% (v/v) de Tween 80, 0.2% glicerol (v/v), suplementados con 15 µg/ml de Km de ser necesario. Los cultivos en cajas de microcultivo de 96 pozos se hicieron en 200 µl de medio. Los ensayos de expresión en medio sólido se realizaron en cajas de Petri incubadas en un recipiente herméticamente cerrado en el cual se colocó una vela encendida para reducir la concentración de oxígeno y simular un ambiente de limitación de oxígeno. Los ensayos en líquido fueron realizados en 3ml en tubos de ensayo de 13mm X 100mm sin agitación. La viabilidad celular se determinó plaqueando diluciones del cultivo sobre medio sólido.

Estandarización de las condiciones de estrés

Una colonia de *M. smegmatis* mc²155 crecida por un día sirvió de inóculo para pocillos de una caja de microcultivo conteniendo 200 µl de LB. Para estrés anaeróbico, se inocularon dos pocillos, a uno de los cuales se adicionó 50 µl de aceite mineral estéril para limitar la disponibilidad de oxígeno. Los cultivos fueron incubados a 37°C y se les hizo medidas de viabilidad celular en diferentes tiempos. Los experimentos de estandarización fueron realizados por triplicado.

Construcción de genoteca y tamizaje

El ADN genómico de *M. tuberculosis* H37Rv fue aislado según métodos descritos (12) y sometido a hidrólisis parcial con la enzima de

restricción Sau3A I, siguiendo protocolos establecidos (11). El ADN parcialmente digerido fue ligado al vector pGFP (13) previamente digerido con BamHI y defosforilado con fosfatasa alcalina (GIBCO-BRL, Gaithersburg MD) y esta mezcla fue introducida en *E. coli* para obtener grandes cantidades de ADN puro de la genoteca (Qiagen Inc, CA). La genoteca fue introducida en *M. smegmatis* mc²155 mediante electroporación (10) y las colonias transformantes fueron colocadas individualmente y por duplicado en pozos de cajas de microcultivo de 96 pozos conteniendo 7H9. Tras cinco días de incubación a 37°C, una réplica se congeló a -80°C como stock para ensayos posteriores. Los cultivos de la otra réplica se cubrieron añadiendo 50 µl de aceite mineral a cada pozo y se continuó la incubación a 37°C. A estos cultivos se les hizo un seguimiento periódico cada 4 días usando una lámpara manual de luz ultravioleta (UV) de 315 nm. Se seleccionaron clones que expresaban *gfp* entre 15 y 35 días de incubación bajo limitación de oxígeno y con ellos se hizo un segundo tamizaje en cajas de 96 pozos, con y sin limitación de oxígeno. De clones seleccionados se procedió a hacer una última ronda de tamizaje en la cual se crecieron en medio líquido y en medio sólido. Los controles se hicieron incubando las células bajo las mismas condiciones pero sin limitación de oxígeno.

Análisis de clones

Los plásmidos seleccionados fueron introducidos directamente de *M. smegmatis* a *E. coli* por electroducción (14). El ADN plasmídico fue purificado usando columnas de Qiagen (Qiagen Inc., CA) y analizado por cortes con las enzimas de restricción BamHI y HindIII (Gibco-BRL). Las digestiones fueron visualizadas en geles de agarosa al 1% teñidos con bromuro de etidio (0.5 µg/ml). La secuenciación de los insertos se llevó a cabo en un secuenciador ABI 373 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA) empleando el primer GFPseq (5' GCCCATTA-ACATCACCATC 3'). Se utilizó el algoritmo BLAST (15) para la búsqueda de homologías en las base de datos -GenBank. El programa

Omiga 2.0 (Oxford Molecular Group 1999) fue utilizado para buscar marcos abiertos de lectura y ubicación de promotores en la secuencia de los insertos.

Resultados

Estandarización de condiciones de estrés

Como primer paso en este estudio, se buscó estandarizar las condiciones in vitro que pudieran simular condiciones de estrés anaeróbico para *M. smegmatis*. En este ensayo se buscó una condición que limitara el crecimiento de *M. smegmatis* sin eliminar completamente al bacilo, de tal manera que éste estuviera sometido a condiciones de estrés por un período de tiempo en el cual se pudiera evidenciar inducción génica. La viabilidad de *M. smegmatis* sometida a anaerobiosis, generado al cubrir los pozos de cultivo con aceite mineral, disminuye con respecto al control (Figura 1). La incubación prolongada del control sin aceite mineral también afecta el crecimiento, aunque en menor medida.

Construcción de librería e identificación de promotores

Una librería genómica de la cepa patogénica *M. tuberculosis* H37Rv fue construida dentro del plásmido de fusión transcripcional pGFP que porta el gen reportero *gfp* carente de secuencias reguladoras (13). Esta genoteca fue electroporada dentro de *M. smegmatis* mc²155 y, como se observa en la Figura 2, la inducción de la proteína fluorescente verde bajo luz UV es fácil de observar. Con esta genoteca se hizo un tamizaje de 2,400 colonias individuales bajo condiciones de limitación de oxígeno (Figura 3). En un primer ensayo las colonias se crecieron en medio 7H9 dentro de pozos de cajas de microcultivo de 96 pozos y, luego de 4 días de incubación, los pozos se sellaron con la adición de aceite mineral para limitar el oxígeno. El seguimiento de estas células llevó a la identificación de 288 clones en los cuales se encendía el gen reportero *gfp* entre 15 y 30

FIGURA 1

Viabilidad de *M. smegmatis* sometida a condiciones microaerofílicas. Las curvas muestran la viabilidad de cultivos control (cuadros relleno) y células sometidas a estrés por anaerobiosis (diamantes). ufc: unidades formadoras de colonias

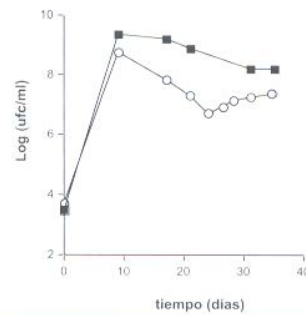


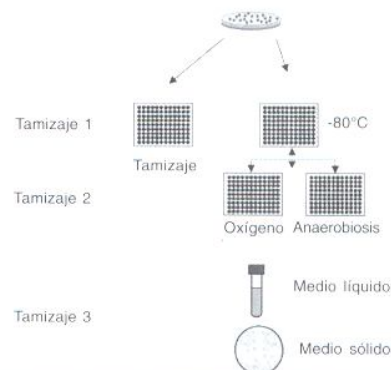
FIGURA 2

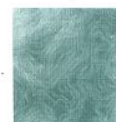
Genoteca de *M. tuberculosis* H37Rv en pGFP. La foto muestra colonias transformantes de *M. smegmatis* crecidas en medio sólido y visualizadas bajo luz UV



FIGURA 3

Diagrama de flujo del tamizaje de la genoteca de *M. tuberculosis* bajo condiciones de estrés anaeróbico





días de incubación después de haber sido sellados con aceite mineral. De esta manera se buscaba asegurar que la expresión de *gfp* se debiera únicamente a la incubación prolongada bajo condiciones anaeróbicas y no por otros factores. Partiendo de células guardadas a -80°C , estos 288 clones se volvieron a someter a las mismas condiciones de anaerobiosis en paralelo con duplicados control en los cuales no se limitó el oxígeno. El seguimiento de las micobacterias incubadas con y sin aceite mineral redujo el número a 36 clones potencialmente portadores de secuencias reguladoras que expresaban el gen reportero únicamente bajo condiciones anaeróbicas.

Estos 36 clones se sometieron a un tamizaje adicional creciéndolos por duplicado en: a) medio líquido 7H9 en tubos de ensayo, y b) medio sólido 7H10. Una vez crecidos, una réplica se sometió a condiciones de limitación de oxígeno mientras que la otra se mantuvo como control. El seguimiento con luz UV de los clones permitió identificar 7 clones de interés (14, 36, 46, 64, 70, 72, y 77), de los cuales solamente 5 se encendieron tanto en medio líquido como en medio sólido.

Análisis de los clones

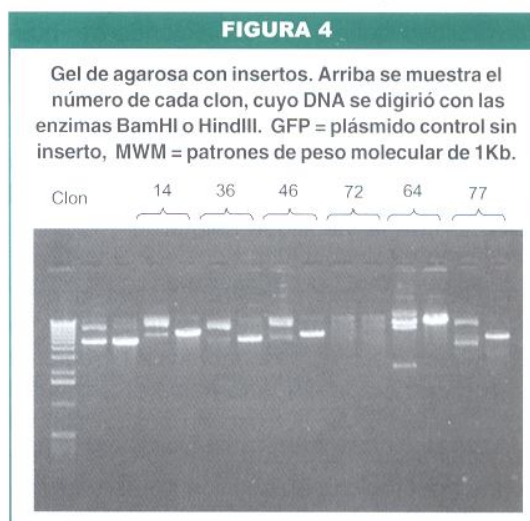
Los plásmidos recombinantes dentro de los clones de interés (14, 36, 46, 64, 70, 72, y 77) fueron introducidos en *E. coli* por electroducción y analizados mediante digestión con enzimas de restricción (Figura 4). De esta manera se demostró que estos plásmidos contenían insertos diferentes. Estos insertos fueron secuenciados y analizados utilizando el algoritmo BLAST y el genoma completo de *M. tuberculosis* H37Rv (15, 16), lo cual permitió determinar la ubicación de los insertos clonados en pGFP en el genoma de *M. tuberculosis*. Las secuencias obtenidas mostraron que los insertos en la mayoría de los casos estaban compuestos por más de un fragmento, correspondientes cada uno a diferentes regiones del genoma de *M. tuberculosis*. Los fragmentos de los clones 64, 70, 72, y 77 correspondían además a secuencias situadas en medio de una

proteína. Debido a la ausencia de secuencias reguladoras evidentes, estos cuatro clones no se siguieron analizando.

El análisis inicial de la secuencia del inserto correspondiente al clon 14 indicó que se trataba de un solo fragmento de 491 pares de bases (pb) ubicado en el centro del gen para la proteína PpsA de *M. tuberculosis*. Este inserto está orientado en el clon 14 de tal forma que la transcripción de *ppsA* ocurre en sentido contrario con respecto al sentido de la transcripción del gen reportero *gfp*. Sin embargo, un análisis más detallado de la secuencia reveló un marco abierto de lectura (ORF), en sentido correcto con respecto a *gfp*, lo suficientemente grande como para dar origen a una proteína de 340 aminoácidos (Figura 5A). La secuencia del inserto en el clon 36 reveló la presencia de tres fragmentos. De estos, el segundo fragmento, ubicado en el segmento 116/162 de *M. tuberculosis*, consta de 308pb y contiene el comienzo del gen de la proteína hipotética Rv2603c y la región corriente arriba de éste (Figura 5B).

Discusión

El presente trabajo constituye una aproximación sistemática para aislar promotores de *M. tuberculosis* que se inducen bajo estrés anaeróbico, mediante la búsqueda de señales



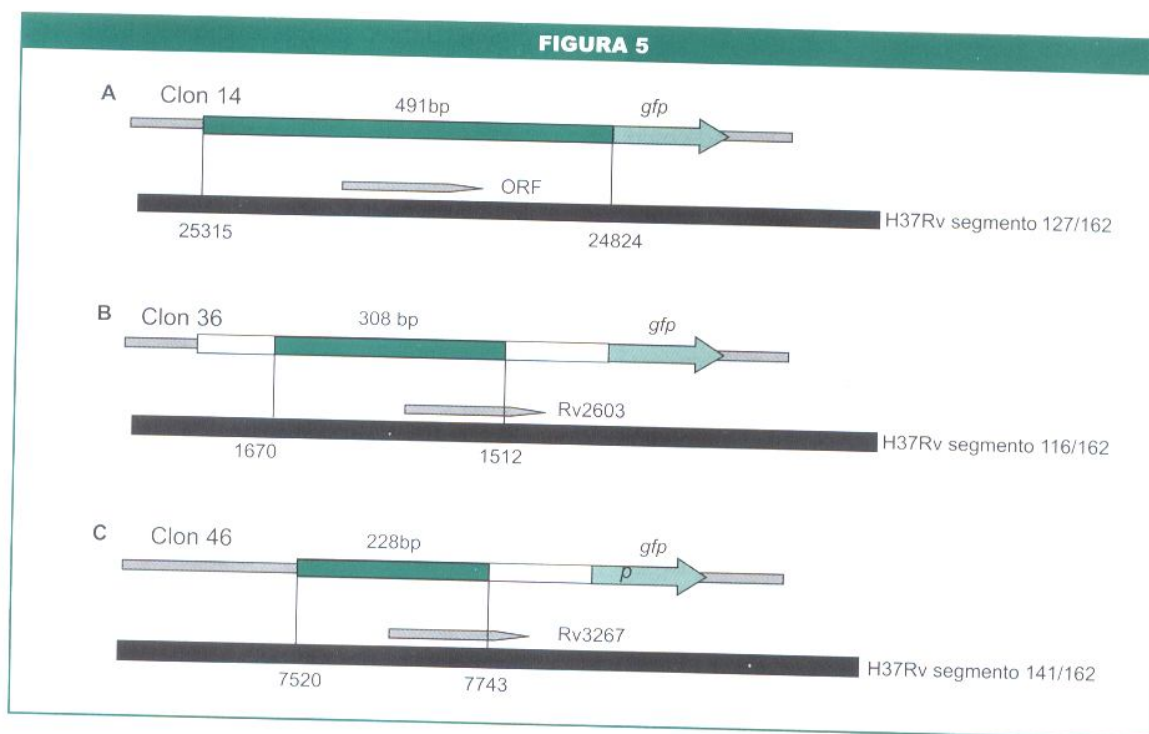


Diagrama de los insertos contenidos en los clones 14 (A), 36 (B) y 46 (C). La línea superior representa el plásmido; la flecha indica la posición y sentido de la transcripción del gen reportero *gfp*. El tamaño de los insertos de interés se indica arriba en pares de bases (bp). La correspondencia con el genoma de *M. tuberculosis* H37Rv (línea sólida de abajo) y la localización exacta (números de abajo) se muestran para los insertos de interés. Las flechas pequeñas (en gris) indican los marcos abiertos de lectura (ORF) o proteínas hipotéticas (16). El clon 46 contiene dos fragmentos de ADN de *M. tuberculosis*. Uno de ellos, de 235pb, contiene parte del gen de la proteína ModA y aparentemente carece de secuencias reguladoras. El otro fragmento, que consta de 228pb, corresponde al segmento 141/162 del genoma completo de *M. tuberculosis* y contiene el extremo 5' del gen de la proteína hipotética Rv3267 y la región corriente arriba.

transcripcionales que conduzcan a la expresión de un gen reportero en *M. smegmatis*. La estandarización inicial de cultivos en pozos de microcultivo definió las condiciones de incubación para realizar el tamizaje de la genoteca. En estos ensayos se observó una disminución en el número de colonias viables en torno a un orden de magnitud respecto al control, tras 35 días de incubación, sin que hubiera una total inhibición de la viabilidad celular.

Estudios anteriores muestran que al incubar micobacterias en medio líquido sin agitación o con agitación suave, se establece un gradiente de disminución de oxígeno hacia el fondo del tubo (17, 18, 8, 19). El uso de aceite mineral también ha sido reportado para obtener condiciones anaeróbicas en cultivos de *M. tuberculosis* (20). Debido al estado en el cual se en-

cuentra la micobacteria dentro de lesiones en el hospedero, se ha argumentado que el bacilo de la tuberculosis en estos cultivos anaeróbicos es fisiológicamente análogo al estado no replicativo del microorganismo durante una infección latente (7). En este ensayo, los cultivos permanecieron en incubación sin agitación, permitiendo una adaptación lenta de *M. smegmatis* a las condiciones de anaerobiosis. Esto se evidencia en las curvas de viabilidad (Figura 1), validando así el uso de esta aproximación experimental. Estos ensayos definen entonces las condiciones necesarias para realizar tamizaje de un gran número de colonias individuales de *M. smegmatis* en placas de microcultivo, en un sistema sencillo y eficaz para estudiar la dinámica micobacteriana ante ambientes adversos.

El tamizaje de la genoteca de *M. tuberculosis*,



construida en pGFP y analizada dentro de *M. smegmatis*, llevó a la identificación de siete clones potencialmente interesantes en los cuales la expresión de *gfp* se indujo bajo condiciones limitantes de oxígeno. El análisis de las secuencias obtenidas reveló que la gran mayoría contenía más de un fragmento de ADN genómico. Esto probablemente se debe a que los fragmentos obtenidos por hidrólisis parcial con Sau3A I se ligaron entre sí ya que no fueron defosforilados antes de construir la genoteca. La secuencia de los insertos también reveló que muchos de ellos contenían fragmentos ubicados en la mitad de genes o frente a genes orientados en sentido contrario con respecto a la transcripción del gen reportero *gfp*. Aunque no es claro porqué estos insertos logran inducir la expresión de *gfp* bajo las condiciones estudiadas aquí, es posible que contengan secuencias que puedan funcionar como promotores crípticos para la expresión.

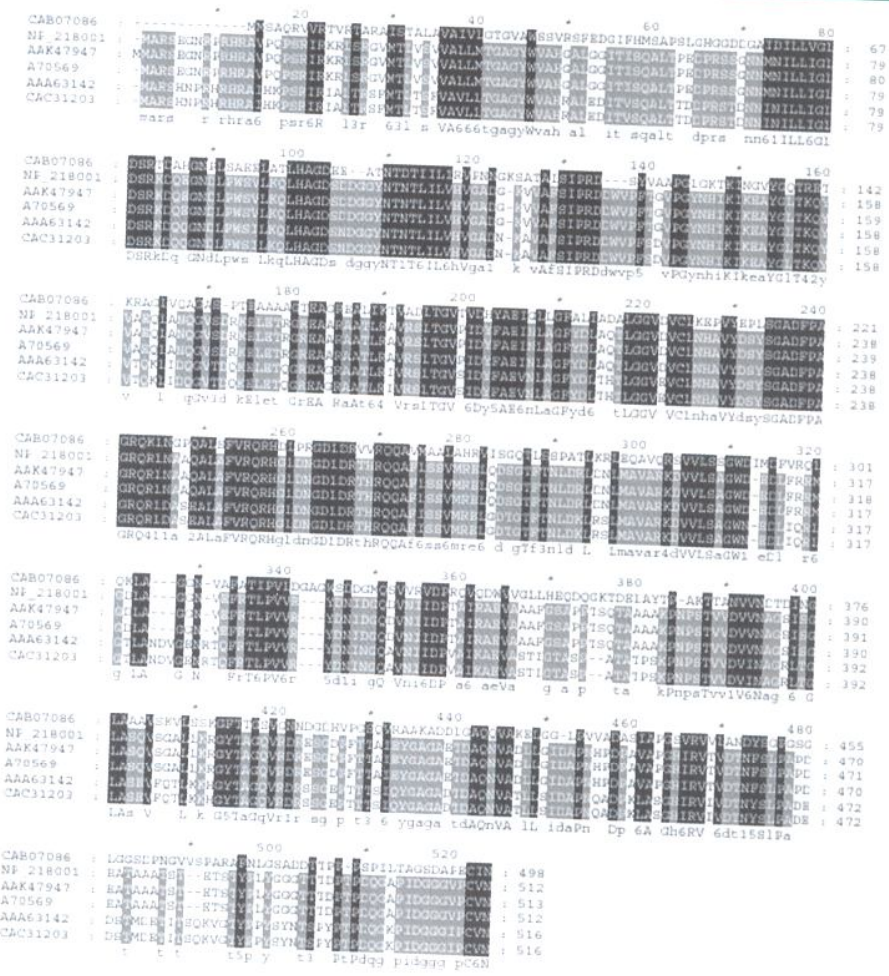
Tres de los siete clones obtenidos (14, 36 y 46) parecen tener posibles secuencias reguladoras responsables de la expresión del gen reportero *gfp*. El análisis detallado del inserto en el clon 14 reveló la presencia de un ORF de 340 aminoácidos y abre la posibilidad de que el inserto contenga secuencias de regulación transcripcional. Hasta el momento, no se ha encontrado homología de este péptido con proteínas conocidas. En el clon 36 se encontró que el segundo inserto contenía parte de la secuencia para el gen de Rv2603 y la región corriente arriba. Este gen codifica para una proteína de función desconocida con alta identidad a proteínas hipotéticas de varios organismos como *M. leprae* y *E. coli*. Para definir con mayor claridad si este fragmento está en realidad dirigiendo la expresión del gen reportero sería necesario hacer un subclonaje que incluyera únicamente la región de interés. De esta manera se podría saber si el fragmento funciona efectivamente como región reguladora de la expresión génica y permitiría además analizar si la expresión es específica para condiciones de limitación de oxígeno.

El clon 46 contiene un fragmento con el sitio de

inicio de la proteína hipotética Rv3267 y la región corriente arriba. Aunque este inserto no se encuentra inmediatamente anterior al gen reportero (Figura 5C) es posible que la transcripción comience en esta región y continúe sin interrupciones a través del segmento contiguo, que codifica para una región interna de la proteína ModA, hasta el gen *gfp*, permitiendo así su expresión. Sería necesario confirmar esto haciendo un subclonaje que incluya solamente la supuesta región reguladora para así analizar su efecto sobre la expresión de un gen reportero. Aunque no fue posible identificar secuencias homólogas a las cajas -10 y -35 de promotores bacterianos conocidos dentro de esta supuesta región reguladora del gen para Rv3267, esto no significa que en esta región no se encuentre un posible promotor. En micobacterias son pocas las secuencias promotoras caracterizadas y muchas de ellas difieren bastante de las secuencias consenso que se tienen para sistemas bacterianos, especialmente las de *E. coli* (21).

Al comparar la proteína Rv3267 con proteínas de otros microorganismos, se encontró identidad con la proteína CpsA de organismos como *Streptomyces coelicolor*, *Streptococcus sp.*, y *Mycobacterium leprae* (Figura 6). Varias proteínas Cps están involucradas en la síntesis del polisacárido capsular de diversos microorganismos. De estas, CpsA funciona como un activador de la transcripción que regula la expresión de los otros genes involucrados en la producción de polisacárido (22, 23). Esto puede ser relevante ya que una de las formas que tiene la micobacteria de expresar genes como respuesta a condiciones adversas, es por medio de la transcripción mediante factores sigma alternativos (18). La regulación de esta transcripción puede estar a cargo de proteínas como la CpsA que, al afectar expresión génica, ayudan en el proceso de adaptación de la micobacteria a condiciones de limitación de oxígeno. Los análisis bioinformáticos de la misma proteína mostraron la presencia de un motivo de unión a ATP/GTP, estos motivos se relacionan en muchos organismos con la transducción de señales. Las

FIGURA 6



Alineamiento de la proteína hipotética Rv3267 de *M. tuberculosis* con proteínas relacionadas. La secuencia deducida de *M. tuberculosis* Rv3267 (CAB07086) está alineada con homólogos usando Clustal X (27). En negro se indican aminoácidos idénticos y en gris aminoácidos conservados. Los números a la derecha indican la longitud de los polipéptidos. NP_218001 = *M.tb*-probable CpsA; AAK47947 = *M.tb*-proteína hipotética conservada; A70569 = *M.tb*-probable CpsA; AAA63142 = *M.leprae*-CpsA; CAC31203 = *M.leprae*-proteína hipotética conservada.

implicaciones que este tipo de proteínas tengan en *M. tuberculosis* son hasta el presente desconocidas. Es por lo tanto necesario seguir profundizando y realizando análisis funcional de estas proteínas con el fin de poder determinar su verdadero papel en la respuesta del microorganismo a condiciones adversas.

Existe un gran interés por identificar genes y proteínas involucradas en la capacidad que tiene *M. tuberculosis* de persistir dentro de su

hospedero. Dentro de los factores que llevan al establecimiento de la latencia, la limitación de oxígeno disponible para el bacilo es quizás el más importante. Debido a esto, se han adoptado diferentes aproximaciones para identificar genes y proteínas que se expresan exclusivamente bajo condiciones de anaerobiosis. En un estudio reciente con *M. bovis* BCG, se identificaron proteínas inducidas bajo limitación de oxígeno en el modelo de latencia definido por Wayne (24). Así mismo, se han identificado pro-



teínas que se expresan bajo condiciones anaeróbicas en *M. tuberculosis* (4) y en *M. smegmatis* (25).

En este estudio, se buscó identificar señales reguladoras necesarias para la expresión del gen reportero *gfp*. El modelo experimental utilizado, que permite el análisis de un gran número de clones de manera relativamente fácil, permitió la identificación de tres posibles regiones reguladoras. Dos de los posibles genes regulados por estas secuencias, Rv2603 y Rv3267, codifican para proteínas de función desconocida y ninguna ha sido descrita en estudios anteriores. Esto no es sorprendente dado que sólo se le han atribuido funciones precisas a un 40% de los casi 4000 marcos abiertos de lectura identificados (16). La otra posible región reguladora puede estar encargada de la expresión de un ORF de función desconocida. En un reporte reciente, el uso de la proteómica logró identificar 6 proteínas no anotadas dentro del genoma de tuberculosis, indicando que no todas los posibles marcos abiertos de lectura han sido identificados (26).

Aunque en este estudio sólo se pudieron identificar tres posibles secuencias reguladoras, es importante notar que sólo se hizo tamizaje de un pequeño número de clones portando la genoteca de *M. tuberculosis*. Para hacer un tamizaje exhaustivo de la genoteca, que porta fragmentos pequeños (0.5 - 1kb) sería necesario analizar más de 5.000 clones individuales. Este estudio constituye entonces una primera aproximación a la identificación de genes novedosos que pudieran estar involucrados en la respuesta del microorganismo a situaciones de limitación de oxígeno. ☻

Abstract

Mycobacterium tuberculosis is capable of persisting for long periods of time within the host causing an asymptomatic latent infection. It has been suggested that of the environmental assaults encountered by the bacilli, lack of oxygen availability is perhaps the most

important one in terms causing *M. tuberculosis* to enter latency in what has been described as a persistent nonreplicating state. In this study we set out to standardize conditions in which *M. smegmatis* could be grown in 96-well microtiter dishes in order to carry out screening of a *M. tuberculosis* DNA library constructed in the transcriptional fusion plasmid pGFP. Screening was then carried out under conditions of anaerobic stress, simulated by covering cultures with mineral oil, and 7 potential clones that induced expression of the reporter gene *gfp* were identified. Sequence analysis of the inserts in these clones revealed that at least three of them had potential transcriptional regulatory regions. Of these, two contained fragments that encoded the 5' end of the genes for the *M. tuberculosis* hypothetical proteins Rv2603 and Rv3267 and upstream regions.

Referencias

1. De Cock K.M. et al. Research issues involving HIV-associated tuberculosis in resource-poor countries. *JAMA*, 1996; 276: 1502-1507.
2. Snider DEJ. and J.R. La Montagne, The neglected global tuberculosis problem: a report of the 1992 world congress on tuberculosis. *J. Infect. Dis.*, 1994; 124: 376-382.
3. Parrish, NM, JD. Dick, and WR. Bishai, Mechanisms of latency in *Mycobacterium tuberculosis*. *Trends Microbiol.* 1998; 6: 107-112.
4. Yuan Y, DD. Crane, and CE. Barry III, Stationary phase-associated protein expression in *Mycobacterium tuberculosis*: function of the mycobacterial α -crystallin homolog. *J. Bacteriol.* 1996; 178: 4484-4492.
5. McKinney, J.D., et al., Persistence of *Mycobacterium tuberculosis* in macrophages and mice requires the glyoxylate shunt enzyme isocitrate lyase. *Nature*, 2000; 406: 735-38.
6. Glickman, M.S., J.S. Cox, and J.W.R. Jr., A novel mycolic acid cyclopropane synthetase is required for cording, persistence, and virulence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Mol. Cell.*, 2000; 5: 1-20.

7. **Wayne, L.G. and C.D. Sohaskey**, Nonreplicating persistence of *Mycobacterium tuberculosis*. *Annu. Rev. Microbiol.*, 2001; 55: 139-63.
8. **Dick, T., B. Heng Lee, and B. Murugasu-Oei**. Oxygen depletion induced dormancy in *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol. Lett.*, 1998; 163: 159-164.
9. **Lim, A. and T. Dick**, Plate-based dormancy culture system for *Mycobacterium smegmatis* and isolation of metronidazole-resistant mutants. *FEMS Microbiol. Lett.*, 2001; 200: 215-219.
10. **Snapper, S.B., et al.**, Isolation and characterization of efficient plasmid transformation mutants of *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Microbiol.*, 1990; 4:1911-1919.
11. **Sambrook, J., E.F. Fritsch, and T. Maniatis**, *Molecular cloning: a laboratory manual*. second ed. 1989, Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
12. **Del Portillo, P., L.A. Murillo, and P. M.E.**, Amplification of a species-specific DNA fragment of *Mycobacterium tuberculosis* and its possible use in diagnosis. *J. Clin. Microbiol.*, 1991; 29: 2163-2168.
13. **Martínez, A., S. Torello, and R. Kolter**, Sliding motility in mycobacteria. *J. Bacteriol.*, 1999: 181.
14. **Baulard, a., et al.**, Rapid mycobacterial analysis by electrofusion between *Mycobacterium* spp. and *Escherchia coli*. *Nucleic Acids Res.*, 1992; 20:410.
15. **Altschul, S.F., et al.**, Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of database search programs. *Nucleic Acids Res.* 1997; 25:3389-3402.
16. **Cole, S.T. and e. al.**, Deciphering the biology of *Mycobacterium tuberculosis* from the complete genome sequence. *Nature*, 1998; 393: 537-544.
17. **Wayne, L.G.**, Dynamics of submerged growth of *Mycobacterium tuberculosis* under aerobic and microaerophilic conditions. *Am. Rev. Respir. Dis.* 1976; 114: 807-911.
18. **DeMaio, J., et al.**, A stationary-phase stress-response sigma factor from *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 2790-2794.
19. **Wayne, L.G.**, Cultivation of *Mycobacterium tuberculosis* for research purposes, in *Tuberculosis: pathogenesis, protection and control*, B.R. Bloom, Editor. 1994, American Society for Microbiology: Washington, DC. p. 73-83.
20. **Cunningham, A.F. and C.L. Spreadbury**, *Mycobacterial stationary phase induced by low oxygen tension: cell wall thickening and localization of the 16-kilodalton a-crystallin homolog*. *J. Bacteriol.* 1998; 180: 801-808.
21. **Bashyam, M.D., et al.**, A study of the mycobacterial transcriptional apparatus: identification of novel features in promoter elements. *J. Bacteriol.*, 1996; 178: 4847-4853.
22. **Griffin, A.M., V.J. Morris, and M.J. Gasson**, The *cpsABCDE* genes involved in polysaccharide production in *Streptococcus slivarius* ssp. *thermophilus* strain NCBF 2393. *Gene*. 1996; 183: 23-27.
23. **Cieslewicz, M.J., et al.**, Functional analysis in type Ia group B *Streptococcus* of a cluster of genes involved in extracellular polysaccharide production by diverse species of *Streptococci*. *J. Biol. Chem.* 2000; 276: 139-146.
24. **Boon, C., et al.**, Proteins of *Mycobacterium bovis* BCG induced in the Wayne dormancy model. *J. Bacteriol.* 2001; 183: 2672-2676.
25. **Murugasu-Oei, B., A. Tay, and T. Dick**. Upregulation of stress response genes and ABC transporters in anaerobic stationary-phase *Mycobacterium smegmatis*. *Mol. Gen. Genet.* 1999; 262: 677-682.
26. **Jungblut, P.R., et al.**, Proteomics reveals open reading frames in *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv not predicted by genomics. *IAI* 2001; 69: 5905-5907.
27. **Thompson, J.D., Higgins, D.G. y Gibson, T.J.** CLUSTAL W: improving sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, positions-specific gap penalties and weight matrix choice. *NAR*. 1994; 22:4673-4680.